



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA



Liliane Barbosa Amorim

ANÁLISE DA RECUPERAÇÃO DA
SUCEPTIBILIDADE DE UMA COLÔNIA DE
Culex quinquefasciatus RESISTENTE AO
Bacillus sphaericus

RECIFE
2009

LILIANE BARBOSA AMORIM

Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira.

RECIFE
2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A524a Amorim, Liliane Barbosa.

Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus* / Liliane Barbosa Amorim. — Recife: L. B. Amorim, 2009.

116 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha, co-orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira.

1. *Culex*. 2. Resistência a inseticidas. 3. Controle biológico de vetores. 4. Toxinas bacterianas. 5. Receptores da Superfície Celular. 6. Frequência do Gene. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de. III. Título.

CDU 614.449

LILIANE BARBOSA AMORIM

**Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus*
resistente ao *Bacillus sphaericus***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 05/03/2009

BANCA EXAMINADORA

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Orientadora)

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

*Dedico a minha família e ao Monsenhor
José Lins (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho e pela fé que sempre tive, sabendo que tudo no final vai dar certo.

Aos meus pais, Neide e José, pelo amor dedicado em toda a minha vida. Aos meus irmãos, Lidiane e Gomes, pela paciência e pelo carinho. Aos meus avós, pessoas maravilhosas e meus eternos pais. A toda minha família, tios e primos, alguns não sabem o que faço, mas têm esperança em tudo o que faço, e aos que sempre torceram por mim, em especial a minhas priminhas Livia, Mari e Natália.

Às minhas orientadoras, Maria Helena (Chica) e Cláudia Fontes, pela orientação, paciência e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses seis anos de trabalho, além da confiança dada e cobrada ao longo do trabalho. À banca examinadora, pelas contribuições e críticas para o aperfeiçoamento do trabalho. À Alice Varjal, que foi uma excelente parecerista e me ajudou bastante para que a dissertação fosse apresentada no prazo.

Aos meus amigos, que não caberia listar aqui, já que são inúmeros, por serem meus amigos e que aceitam todos os meus defeitos e qualidades. Especialmente a Cecile (Ceci), Michelline (Michus), Larissa (Larys), os meninos do Punkdaria, Dona Amélia, Xande e meus novos amigos (Katrine, Petrus, Nando, Mel e Tati) pelos conselhos, risadas, cachaças e assim vai. Ao Monsenhor José Lins (*in memoriam*), pela bondade, pelos sorrisos, pela força de vontade em ajudar sem olhar a quem e por ter sido a pessoa maravilhosa que foi e que ainda é. Ao André (Dé), que apesar de tudo o que passamos, mostrou que posso ser EU em todos os momentos de alegria e dor, e que aprendi a amar e odiar ao mesmo tempo.

Aos amigos do Departamento de Entomologia do CPqAM pela alegria na convivência e apoio, em especial para Diogo (Di) que é um amigo e pseudo-orientador, a Lalá (minha mãe do insetário), Rose, Deby e Ellyda (meus amores) e Taty Romão pelas dicas moleculares. À Dra. Eugênia Maria Rios da Bioticom, por ceder o material necessário para a realização do trabalho. À turma de mestrado 2007/2009, principalmente a Marina, Ligia, Paula e Flávio, por momentos inesquecíveis, trabalhos realizados e pela amizade. Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), pela oportunidade de estágio e pela estrutura oferecida para realização de trabalhos com qualidade. A CAPES pelo apoio financeiro. A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho, que aqui não foram citados.

Inda tanto nos sobra, por este grandioso país, de doenças e insectos por cuidar!...

Mário de Andrade, em *Macunaíma* (1928).

Procuro homens que tenham infinita capacidade de não saber o que não pode ser feito.

Henry Ford

AMORIM, L. B. **Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus*.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

RESUMO

Bacillus sphaericus (Bs) é um biolarvicida eficiente para o controle de *Culex* sp e o seu principal fator inseticida é a toxina Bin cuja ação depende de sua ligação específica aos receptores Cqm1 presentes no epitélio das larvas. A resistência de *Culex* ao Bs já foi registrada, sendo este caráter herdado de forma recessiva, o que favorece o seu manejo. O objetivo do estudo foi analisar a recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) a partir da introdução de indivíduos susceptíveis nesta colônia na proporção de 1:1, e a manutenção da progênie sem pressão de seleção, sob condições de laboratório. A resistência das larvas R-IAB59 à toxina Bin é devido à ausência da α -glicosidase Cqm1, conferida pelo alelo de resistência *cqm1*_{REC} em homozigose. Inicialmente, a avaliação da colônia R-IAB59 em relação à fecundidade, fertilidade e peso de pupas mostrou um desempenho similar à colônia parental susceptível (S-Lab), sugerindo que a resistência não acarreta custo biológico em relação a estes parâmetros. Amostras de larvas das colônias parentais, S (campo) e R-IAB59, e da progênie (F1-F3-F5-F7-F9-F11) foram avaliadas em relação à susceptibilidade *in vivo*, à frequência da expressão do receptor Cqm1 e do alelo *cqm1*_{REC}. Os bioensaios de múltiplas concentrações mostraram que houve uma redução dos valores de concentrações letais dos biolarvicidas para 50 e 90% das larvas (CL₅₀ e CL₉₀), em relação à colônia R-IAB59, sendo a redução da CL₅₀ mais acentuada do que a da CL₉₀, em todas as gerações. Os bioensaios de dose diagnóstica mostraram que a frequência de larvas R variou entre 45 e 55% nas progênies que foi diretamente correlacionada aos dados obtidos dos ensaios enzimáticos que mostram uma frequência similar de larvas que expressam e não expressam o receptor Cqm1. A análise o alelo *cqm1*_{REC} revelou o genótipo das larvas suscetíveis e resistentes e mostrou que a frequência deste alelo nas gerações parentais S e R foi 0,006 e 0,995, respectivamente. Apesar da ausência de pressão de seleção, a frequência do *cqm1*_{REC} manteve-se elevada, entre 0,64 e 0,80, até a F11. Os resultados obtidos mostram que, apesar da queda do nível de resistência, a frequência do alelo *cqm1*_{REC} permaneceu elevada na ausência de pressão de seleção durante 11 gerações e os dados apontam que este alelo não está associado a um importante custo biológico. A análise deste modelo forneceu informações relevantes para subsidiar estratégias de manejo da resistência do *Culex* do Bs.

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

AMORIM, L. B. **Analysis of the reversal of *Bacillus sphaericus* resistance in a *Culex quinquefasciatus* colony.** 2009. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Bacillus sphaericus (Bs) is an efficient biolarvicide for *Culex* sp control and its main insecticidal factor is the Bin toxin, whose action depends on its specific binding to the Cqm1 receptors present in midgut epithelium of larvae. The occurrence of resistance of *Culex* to Bs has been recorded and is inherited as a recessive trait, which favors its management. The goal of this study was to analyze the recovery of the susceptibility of a *C. quinquefasciatus* colony resistant to Bs IAB59 (R-IAB59), after the introduction of susceptible individuals in this colony at 1:1 ratio and maintenance of the progeny without selection under laboratory conditions. The resistance of larvae R-IAB59 to the Bin toxin is due to the absence of the α -glucosidase Cqm1, which is conferred by the *cqm1_{REC}* allele in homozygosis. The evaluation of parameters of fecundity, fertility and pupae weight showed that the R-IAB59 colony had a similar performance for these parameters when compared with the susceptible colony (S-Lab) under laboratory conditions, suggesting that resistance is not associated to biological cost related to these parameters. Larval samples from the parental colonies, S (Field) and R-IAB59, and from the progeny (F1-F3-F5-F7-F9-F11) were evaluated through bioassays and the frequencies of Cqm1 receptor expression and *cqm1_{REC}* allele were also determined. Multiple concentrations bioassays showed that values of lethal concentrations of Bs for 50 and 90% of larvae (LC₅₀ and LC₉₀) decreased in all generations compared to colony R-IAB59, being the LC₅₀ decrease more accentuated to those found for LC₉₀. Dose diagnostic bioassays showed that the frequency of S and R larvae varied between 45 and 55%, throughout the generations analyzed, and it was correlated to data from the enzymatic assays which showed a similar frequency of larvae expressing, or not, the Cqm1 receptor. The PCR for the *cqm1_{REC}* allele determined the genotypes of larvae and the *cqm1_{REC}* frequency in S and R parental colonies was 0.006 and 0.995, respectively. In the progeny, *cqm1_{REC}* frequency was high and showed variable values, between 0.64 and 0.80, until the F11. Our results demonstrated that, in despite of the decrease of resistance level observed, the *cqm1_{REC}* allele remained in a high frequency in the absence of selection, suggesting that this allele is not associated to important biological cost. The analysis of this model provided relevant information to design strategies for the management of resistance of the *Culex* to Bs.

Key-words: *Culex*, insecticide resistance, pest biological control, bacterial toxins, cell surface receptors, gene frequency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico do <i>Culex quinquefasciatus</i> .	18
Figura 2.	Corte longitudinal do <i>Bacillus sphaericus</i> em fase de esporulação por microscopia eletrônica de transmissão.	23
Figura 3.	Representação dos parâmetros para a avaliação da susceptibilidade de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> ao <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs).	40
Figura 4.	Cruzamento entre indivíduos de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao <i>Bacillus sphaericus</i> IAB59 para estabelecer a colônia IAB59-Rev e sua progênie durante 11 gerações (F1-F11).	42
Figura 5.	Gene do receptor Cqm1 da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs) em <i>Culex quinquefasciatus</i> .	48
Figura 6.	Frequência de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptível (S) e resistente (R) ao <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs) em amostras das gerações parentais (S e R-IAB59) e progênie da colônia IAB59-Rev, submetidas ao bioensaio com uma dose letal do Bs.	55
Figura 7.	Deteção de α -glicosidases (EC 3.2.1.20) em extratos individuais de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	56
Figura 8.	Frequência da expressão da α -glicosidase Cqm1 em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> em amostras das gerações parentais, susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao <i>Bacillus sphaericus</i> , e progênie da colônia IAB59-Rev, resultante do cruzamento das parentais.	57
Figura 9.	Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir dos alelos do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	58
Figura 10.	Frequência dos genótipos para os alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1_{REC}</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> da colônia parental susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao <i>Bacillus sphaericus</i> e da progênie da colônia IAB59-Rev.	59

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 <i>Bacillus sphaericus</i> que apresentaram alterações na susceptibilidade a este agente.	30
Tabela 2.	Desempenho biológico de <i>Culex quinquefasciatus</i> de uma colônia susceptível (CqSF) e uma resistente ao <i>Bacillus sphaericus</i> IAB59 (R-IAB59), avaliado por parâmetros como fecundidade, fertilidade e peso médio de pupas.	50
Tabela 3.	Atividade do <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs) cepa IAB59 para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e das progênes (F1-F9) resultantes do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.	52
Tabela 4.	Atividade do <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs) cepa 2362 para larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e de suas progênes (F1-F9) resultante do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.	54
Tabela 5.	Avaliação da frequência de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptíveis (S) e resistentes (R) ao <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs) por ensaios de susceptibilidade <i>in vivo</i> ao Bs 2362, expressão da α -glicosidase Cqm1 e reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para detecção dos alelos <i>cqm1/cqm1_{REC}</i> .	60
Tabela 6.	Descrição de amostras de indivíduos que apresentaram inconsistência entre o genótipo para os alelos <i>cqm1/cqm1_{REC}</i> e o fenótipo relativo à expressão do receptor Cqm1 em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> nas progênes F1, F3, F5, F7, F9 e F11 da colônia IAB59-Rev.	61
Tabela 7.	Frequências genotípicas observadas (O) e esperadas (E) para os alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1_{REC}</i> em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> nas gerações parentais de indivíduos susceptíveis (S) e resistentes ao <i>Bacillus sphaericus</i> (R-IAB59), e nas progênes F1, F3, F5, F7, F9 e F11 da colônia IAB59-Rev.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDD** – Bioensaio de dose diagnóstica
- Bin** – Toxina binária do Bs
- BMC** – Bioensaios de múltiplas concentrações
- Bs** – *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
- Cpm1** – *Culex pipiens* maltase1
- CPqAM** – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
- Cqm1** – *Culex quinquefasciatus* maltase1
- CqSF** - Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* susceptível ao Bs
- DDT** – Dicloro Difenil Tricloroetano
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- dNTP** – desoxirribonucleotídeos trifosfato
- EC** – Código da enzima dado pela *Enzyme Commission*
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético
- FIOCRUZ** – Fundação Osvaldo Cruz
- GPI** – Glicosil-fosfatidilinositol
- IAB59-Rev** – Colônia de *Culex quinquefasciatus* obtida a partir do cruzamento entre indivíduos de S e R-IAB59, na proporção de 1:1.
- MIV** – Manejo Integrado de Vetores
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- pb** – pares de base
- PBS** – Solução salina tamponada com fosfato
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PM** – Peso molecular
- R-IAB59** – Colônia de laboratório de *Culex quinquefasciatus* resistente ao Bs IAB59
- RecL** – Colônia de laboratório de *Aedes aegypti*.
- RMR** – Região Metropolitana do Recife
- RNA** – Ácido ribonucléico
- RR** – Razão de Resistência

S – Colônia proveniente de campo de *Culex quinquefasciatus* susceptível ao Bs

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

TBE - Tris/Borato/EDTA

TE – tampão estéril

TM – Tratamento em Massa

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

UV – Ultravioleta

VNO – Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)	17
2.1.1 Distribuição, biologia e ecologia	17
2.1.2 Potencial vetorial	19
2.2 Controle de vetores	20
2.3 Bactérias entomopatógenas	21
2.4 <i>Bacillus sphaericus</i> MEYER e NEIDE, 1904 (Bs)	22
2.4.1 Utilização do Bs no controle de mosquitos	23
2.4.2 Toxinas inseticidas	24
2.4.3 Modo de ação da toxina Bin	26
2.5 Resistência de larvas de <i>Culex</i> ao Bs	27
2.5.1 Mecanismos de resistência à toxina Bin	28
2.5.2 Resistência cruzada	29
2.5.3 Resistência e desempenho biológico	31
2.6 Manejo da resistência	32
2.6.1 Utilização do <i>Bacillus thuringiensis</i> e de bactérias entomopatógenas recombinantes ...	33
2.6.2 Influência de migração e refúgios não tratados	33
2.7 Ferramentas para o monitoramento da resistência	34
3 JUSTIFICATIVA	36
4 PERGUNTA CONDUTORA	37
5 HIPÓTESE	38
6 OBJETIVOS	39
6.1 Objetivo geral	39
6.2 Objetivos específicos	39
7 METODOLOGIA	40
7.1 Colônias de mosquitos	41
7.2 Avaliação de parâmetros biológicos	42
7.3 Larvicidas à base do <i>Bacillus sphaericus</i>	43
7.4 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i> ao <i>Bacillus sphaericus</i>	44
7.4.1 Bioensaio de múltiplas concentrações	44

7.4.2 Bioensaio dose diagnóstica	45
7.5 Expressão do receptor α-glicosidase Cqm1 em larvas	45
7.6 Detecção dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1_{REC}</i>	46
7.6.1 Extração do DNA	46
7.6.2 Reação de PCR	47
8 RESULTADOS	49
8.1. Desempenho biológico	49
8.2 Avaliação da susceptibilidade <i>in vivo</i>	51
8.2.1 Susceptibilidade ao Bs cepa IAB59	51
8.2.2 Susceptibilidade ao Bs cepa 2362	53
8.3 Frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes	55
8.3.1 Bioensaio dose diagnóstica	55
8.3.2 Expressão do receptor α -glicosidase Cqm1 em larvas	56
8.3.3 Frequência dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1_{REC}</i>	57
9 DISCUSSÃO	62
10 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES	85
Apêndice A – Artigo publicado	85
Apêndice B – Artigo publicado	91
Apêndice C – Manuscrito para submissão	97
Apêndice D – Participação em cursos, congressos e resumos publicados	115
ANEXOS.....	116
Anexo A – Parecer do CEP/CPqAM	116

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Culex quinquefasciatus é vetor exclusivo do verme filarial *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática, uma doença ainda endêmica na Região Metropolitana do Recife (RMR). Também pode ser vetor de diversos arbovírus de encefalites humanas, como o vírus do Nilo Ocidental responsável por epidemias nos Estados Unidos e que já foi isolado no Caribe, Colômbia e Argentina.

Bacillus sphaericus (Bs) é um importante entomopatógeno para espécies do complexo *Culex*, utilizado em programas de controle de vetores em diversos países, inclusive no Brasil. O principal fator tóxico do Bs é o cristal protéico, produzido durante a fase de esporulação, que contém uma protoxina formada por dois polipeptídeos de 42-kDa (BinA) e 51-kDa (BinB), que agem em sinergia e, por esta razão, a protoxina é denominada binária (Bin). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino (≈ 10) e os polipeptídios BinA e BinB são clivados por serina-proteases para atingir a forma de fragmentos ativos. Em seguida, a toxina Bin liga-se a receptores específicos presentes no epitélio intestinal das larvas. O receptor da toxina Bin, em *C. quinquefasciatus*, é uma α -glicosidase de 60 kDa que está ligada à membrana celular por uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) e foi denominado “Cqm1”. Algumas cepas de Bs apresentam além da toxina Bin, uma segunda toxina binária, como por exemplo, a cepa IAB59, composta pelas toxinas Cry48Aa e Cry49Aa que também agem em sinergia, semelhante à toxina Bin.

Apesar da eficácia e do modo seletivo de ação do Bs, foi demonstrado que populações de *Culex* podem desenvolver resistência a este agente, quando submetidas à pressão de seleção. Recentemente, foi obtida no nosso laboratório uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente à cepa IAB59 (R-IAB59), com uma razão de resistência da ordem de ≈ 40.000 vezes. Nesta colônia, a resistência das larvas à toxina Bin é devido à ausência da α -glicosidase Cqm1. Este mecanismo de resistência é causado por uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (alelo *cqm1_{REC}*) que impede a expressão do receptor Cqm1 na superfície do epitélio, quando presente em homozigose. Por outro lado, o mecanismo de resistência da colônia R-IAB59 à toxina Cry48Aa/Cry49Aa ainda não foi elucidado. Um dos aspectos mais importantes no estudo da resistência é a avaliação de fatores que promovem a recuperação da susceptibilidade. Um destes fatores é a introdução de indivíduos susceptíveis na população resistente, visto que a herança da resistência ao Bs é herdada como um caráter recessivo. Em

campo, sabe-se que a introdução de indivíduos susceptíveis pode ocorrer por migração, pela existência de criadouros não tratados em área sob tratamento, dentre outros fatores. A proposta deste trabalho foi avaliar a recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs IAB59, mediante a introdução de indivíduos susceptíveis e manutenção das progênes sem pressão de seleção, sob condições de laboratório. A primeira etapa do trabalho foi avaliar se a resistência da colônia R-IAB59 estaria associada a um custo biológico. Para tal, parâmetros como fecundidade, fertilidade e estado nutricional das pupas foram avaliados entre as colônias parentais susceptível de laboratório (CqSF) e resistente R-IAB59, a fim de avaliar se a presença dos genes de resistência na colônia acarreta ou não uma diminuição do desempenho biológico.

Em seguida, a susceptibilidade das colônias parentais e progênes ao Bs, cepas IAB59 e 2362, foram avaliadas por meio de bioensaios de concentrações múltiplas que determinam as concentrações letais (CL) do biolarvicida para 50% e 90% das larvas. Este método é comumente adotado e fornece a resposta da mortalidade de *pools* de larvas frente às diferentes concentrações testadas, a fim de estabelecer as CLs. Por outro lado, como o mecanismo de resistência da colônia R-IAB59 à toxina Bin já foi elucidado, foi possível avaliar a frequência de larvas S e R em cada geração da progênie descendente através de outros três métodos descritos a seguir. O primeiro consistiu em avaliar a susceptibilidade de larvas ao Bs 2362 por bioensaios de dose diagnóstica ($> CL_{90}$), a fim de determinar a frequência de larvas S e R. Ensaio enzimáticos detectaram larvas que não expressam a α -glicosidase Cqm1 e permitiram determinar a frequência de indivíduos R, visto que estes não expressam o receptor Cqm1. Como a ausência da α -glicosidase Cqm1 é conferida pelo alelo *cqm1_{REC}* em homozigose, a técnica de PCR alelo-específica foi utilizada tanto para determinar a frequência deste alelo, bem como o genótipo em relação aos alelos *cqm1/cqm1_{REC}* das larvas previamente analisadas para o fenótipo da α -glicosidase Cqm1.

Desta forma, em cada progênie foi possível estabelecer a frequência de S e R em relação à toxina Bin, a partir da avaliação fenotípica e genotípica fornecida pelas ferramentas de diagnóstico disponíveis. A resistência das progênes à toxina Cry48Aa/Cry49Aa foi inferida unicamente por ensaios de toxicidade *in vivo*, já que o mecanismo de resistência a estas toxinas ainda não foi elucidado. O modelo em questão apresenta características ideais para o estudo da estabilidade da resistência sob condições de laboratório e podem trazer importantes contribuições para o estabelecimento de estratégias de detecção e manejo da resistência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)

2.1.1 Distribuição, biologia e ecologia

C. quinquefasciatus é considerado um mosquito trópico-cosmopolita que ocorre nas porções meridionais da Ásia, na África, nas Américas (do sul dos EUA ao norte da Argentina) e na Oceania. No Brasil, sua distribuição é abrangente e sua abundância é influenciada pela presença humana e urbanização (FORATTINI et al., 1993). É um inseto holometábolo, sendo o adulto alado e as formas pré-imaginais aquáticas. O seu ciclo biológico tem duração média entre 10 a 12 dias, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto, porém a duração do ciclo depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura, luz e umidade (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após a cópula, a fêmea que é hematófaga, realiza o repasto sangüíneo geralmente à noite ou durante o período vespertino. Quando atingida a repleção, a fêmea procura um local de repouso até a oviposição, que ocorre entre 48 e 72 horas após o repasto. Os ovos são depositados diretamente sob a lâmina d'água dos criadouros, agrupados em número de 150 a 250, sob a forma de jangada. A seleção do local de oviposição é o principal fator de distribuição da espécie, que é influenciado pelo feromônio de oviposição presente na superfície apical dos ovos que tem a capacidade de atrair as fêmeas para os criadouros já colonizados (BARBOSA et al., 2007; LAURENCE; PICKETT, 1985).

O desenvolvimento pré-imaginal ocorre no ambiente aquático, é composto por quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) e um de pupa (Figura 1). As larvas são filtradoras e alimentam-se preferencialmente na superfície dos criadouros. As pupas não se alimentam, mas permanecem ativas, movimentando-se quando o ambiente é perturbado e os adultos alimentam-se de seiva vegetal. As fêmeas são também hematófagas para maturação de seus ovos e têm o hábito antropofílico, embora possam realizar o repasto sangüíneo em aves ou em outros animais. Os criadouros preferenciais do *C. quinquefasciatus* são coleções de água estagnada, rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, tais como valetas, fossas, caixas de inspeção de esgoto e outros. Após a emergência, os adultos permanecem, preferencialmente, próximos ao local onde ocorreu a oviposição, no ambiente peridomiciliar

ou dentro das casas, para que as fêmeas possam buscar o repasto sanguíneo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Um estudo realizado por Oliveira (1996) em uma área endêmica para filariose no Recife demonstrou que o número de adultos no ambiente domiciliar depende do número de criadouros no intra e peridomicílio, e que sua densidade é maior no período chuvoso, provavelmente devido ao aumento do número dos criadouros. Nesta área, foram registradas densidades que flutuaram entre 20 e 60 adultos por quarto por noite, sendo que nos períodos de chuva este número foi maior do que 100 mosquitos (REGIS et al., 1995).

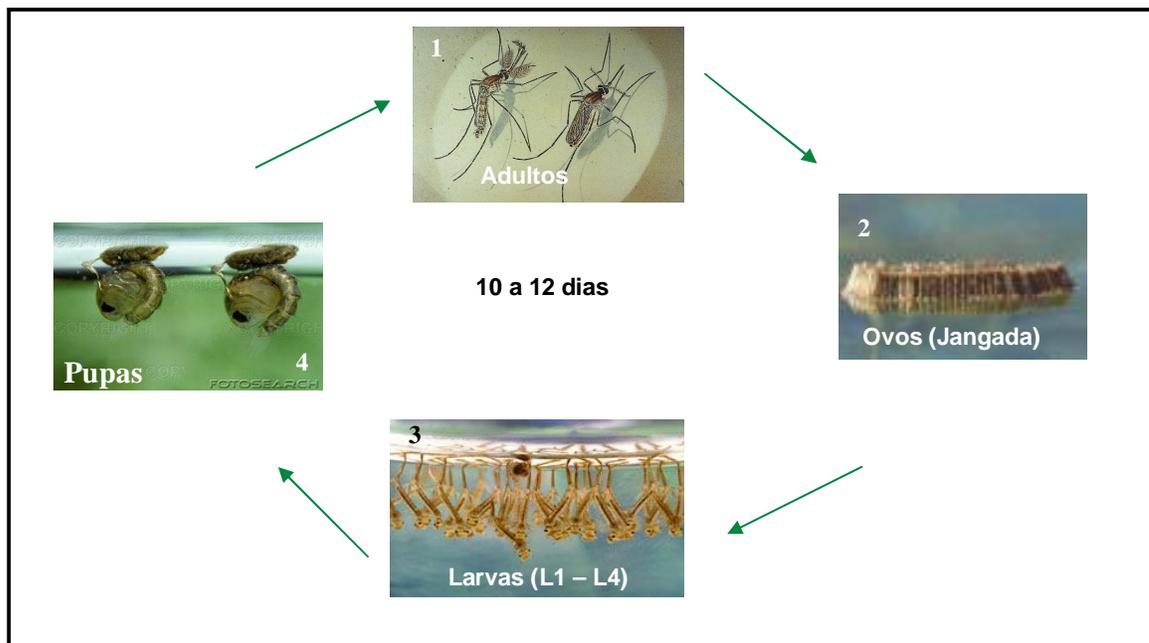


Figura 1. Ciclo biológico do *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: (1) Action Nature (2008); (2) Gulf Coast Mosquito Control (2006); (3) Wildlife Trust (2006); (4) Fotosearch (2008).

Nota: Fêmeas (1) depositam na água ovos agrupados sob a forma de jangadas (2), após a eclosão há quatro estádios larvais (3), em seguida é atingido o estágio de pupa (4), que dará origem aos adultos (1).

2.1.2 Potencial vetorial

C. quinquefasciatus pode ser vetor de agentes etiológicos de doenças humanas, além de causar grande incômodo à população. Segundo a Organização Mundial de Saúde (1992), esta espécie é vetor exclusivo da filariose bancroftiana nas Américas. Esta parasitose é endêmica em várias regiões tropicais sendo estimado 120 milhões de indivíduos em 80 países estejam infectados e que cerca de um bilhão de pessoas residam em áreas de risco de contrair a infecção (FONTES, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). No Brasil, a Região Metropolitana do Recife (RMR) ainda possui áreas endêmicas de filariose linfática e este constitui um importante desafio para a saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

No Brasil, a doença é causada pelo nematóide *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) e sua transmissão é feita através da picada do *C. quinquefasciatus*. O ciclo biológico da *W. bancrofti* é do tipo heteroxênico, possuindo hospedeiro intermediário (mosquito) e definitivo (homem) (REY, 2001). A infecção vetorial ocorre quando a fêmea do mosquito realiza o repasto sanguíneo e ingere microfilárias, forma jovem da *W. bancrofti*, presente no sangue periférico do indivíduo infectado. No mosquito, as microfilárias ao chegarem ao tubo digestivo perdem a bainha e transformam-se em larva de primeiro estágio (L₁). Essas larvas atravessam a parede digestiva do vetor e migram para os músculos torácicos. Após 7 a 10 dias, evoluem para larvas de segundo estágio (L₂), permanecendo neste estágio por 10 a 15 dias, findo os quais atingem o estágio de larva infectante (L₃), que se dirigem para as glândulas salivares do mosquito (REY, 2001). Ao realizar novamente o repasto sanguíneo, as L₃ penetram ativamente na pele do hospedeiro humano, através da lesão causada pela picada do mosquito, alcançam a corrente sanguínea e se alojam nos vasos linfáticos aferentes, onde se desenvolvem até a fase adulta. Quando macho e fêmea se encontram no mesmo vaso linfático ocorre à fase reprodutiva. A longevidade dos adultos nos vasos linfáticos pode atingir de 8 a 10 anos (FONTES, 2003).

Um programa global para eliminação da filariose, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi iniciado em 2000 e, para tal, a associação de medidas como o tratamento em massa (TM) da população humana com uma droga microfilaricida e o controle integrado de vetores são recomendadas para interromper o ciclo de transmissão da doença (OTTESEN et al., 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). No Brasil, a RMR tem sido

alvo do programa, pois ainda apresenta localidades com elevada endemicidade da doença e em 13 delas, com população alvo de cerca de 185.000 pessoas, o TM está sendo realizado associado ao controle do vetor (RECIFE, 2008).

C. quinquefasciatus também tem sido incriminado como vetor de arbovírus de importância para saúde pública. Foi encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalites como St. Louis, Venezuelana (Panamá) e Oropouche (Pará), e tem sido incriminado como vetor de arbovírus em áreas rurais e urbanas. Outro exemplo é a transmissão da encefalite causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO), um arbovírus do gênero *Flavivirus*, que tem como hospedeiro principal as aves migratórias, sendo transmitido ao homem por mosquitos infectados, sobretudo do gênero *Culex*. Epidemias nos Estados Unidos ocorrem desde 1999 e o vírus já foi isolado no Caribe, Colômbia e Argentina (BERROCAL et al., 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003; MORALES et al., 2006). Como a disseminação do VNO pode ocorrer através de aves migratórias, a vigilância ambiental de animais tidos como reservatórios e vetores foi intensificada para impedir a entrada e dispersão do VNO no país (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003). Há uma estimativa de ampliação mundial da transmissão de arboviroses e o *Culex* pode ter um papel estratégico, devido a sua abundância em áreas urbanas. Além do papel de vetor, a alta densidade do *Culex* também pode provocar problemas secundários que têm um impacto na saúde e qualidade de vida das populações expostas.

2.2 Controle de vetores

O controle de insetos vetores pode ser realizado por meio de métodos físicos, como saneamento, adicionar bolas de isopor na superfície das fossas e vedá-las, entre outros, além do emprego de inseticidas químicos ou biológicos. Estes métodos visam à manutenção de baixos níveis populacionais desses insetos a fim de interromper o ciclo de transmissão das doenças, além de diminuir o incômodo causado pela picada dos insetos. Entretanto, fatores como curto ciclo biológico, elevada fecundidade e fertilidade, dificultam o controle populacional de culicídeos.

A partir de 1940, o evento da descoberta dos inseticidas químicos de síntese provocou uma revolução que abriu espaço para que esta ferramenta passasse a ser a mais utilizada no

controle de insetos (HEMINGWAY; RANSON, 2000). O uso de compostos da classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides teve um sucesso sem precedentes em várias campanhas de controle de vetores, sobretudo de espécies implicadas na transmissão da malária (BRADLEY, 1998). No entanto, o uso contínuo e exclusivo por um extenso período, levou ao aparecimento de espécies de insetos resistentes. Em 1951 foi registrado o primeiro caso de populações de *Anopheles* resistentes ao organoclorado Dicloro Difênil Tricloroetano (DDT) e estudos têm demonstrado que diversas ordens de artrópodes apresentavam resistência a uma ou mais classes de inseticidas químicos (GEORGHIOU, 1990; GEORGHIOU; LAGUNES-TEJEDA, 1991). Liu et al. (2004) observaram que populações de *C. quinquefasciatus*, do Alabama e da Flórida, estavam resistentes a organofosforados como o malathion, além de apresentar resistência cruzada a outras classes. Com o aparecimento de populações resistentes tem sido necessário buscar alternativas para o combate dos insetos vetores, utilizando novas técnicas eficazes e seguras para o meio ambiente, inseridas no contexto de um manejo integrado de vetores (MIV). Neste, é preconizada a associação de vários métodos para o controle, tais como agentes físicos, manejo ambiental, inseticidas seletivos, proteção individual, conscientização da população, entre outros (GINSBERG, 2001). No contexto do MIV é necessária a adoção de inseticidas seletivos e os larvicidas à base de bactérias entomopatógenas apresentam características desejáveis, pois possuem um espectro de ação específico para dípteros além da facilidade para sua produção em larga escala e utilização em campo (BECKER et al., 2003; LACEY, 2007, REGIS et al., 2001).

2.3 Bactérias entomopatógenas

As bactérias entomopatógenas têm sido utilizadas desde os anos 60 para o controle de insetos praga na agricultura (BECKER et al., 2003). O seu uso para o controle de dípteros tomou impulso com a descoberta da propriedade inseticida do *Bacillus sphaericus* (Bs) (KELLEN et al., 1965) e do isolamento do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). Nos anos 80, o uso de bactérias entomopatógenas foi intensificado, o Bs (cepa 2362 e 1593) e Bti H-14 eram produzidos em escala comercial e utilizados em programas de controle. Estudos com outras bactérias patógenas de dípteros tais

como *Clostridium bifermentans* (DE BARJAC et al., 1990), *B. thuringiensis* sorovar. *medellin* (ORDUZ et al., 1992), *B. thuringiensis* sorovar. *jegathesan* (DELÉCLUSE; ROSSO; RAGNI, 1995) e *Brevibacillus laterosporus* (ORLOVA et al., 1998) também foram realizados.

Os principais fatores responsáveis pela atividade das cepas tóxicas do Bs e o Bti, são cristais protéicos produzidos durante a fase de esporulação que contém protoxinas para certos gêneros de culicídeos e simulídeos (LACEY, 2007). A ação dessas bactérias ocorre por via oral e depende da sua ingestão pelas larvas dos insetos. O Bs possui atividade larvicida decrescente para espécies de *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, embora o *Ae. aegypti* Linnaeus (1762), espécie de grande importância para a saúde pública, seja refratária ao cristal inseticida do Bs (LACEY; UNDEEN, 1986). Já o Bti é ativo, sobretudo para espécies dos gêneros *Aedes*, *Simulium* e *Culex*, sendo menos tóxico para espécies de *Anopheles* (LACEY, 2007).

2.4 *Bacillus sphaericus* MEYER e NEIDE, 1904 (Bs)

Bacillus sphaericus (Bs) é uma bactéria Gram-positiva, cosmopolita, saprófita, aeróbica, encontrada naturalmente no solo e nos meios aquáticos. Quando o ambiente encontra-se adverso para o seu desenvolvimento vegetativo, o Bs forma esporos arredondados (Figura 2), localizados na região terminal em um esporângio em forma de raquete (KALFON et al., 1984).

A primeira cepa de Bs com potencial larvicida para dípteros foi identificada em 1965 e designada como K. Como esta cepa apresentava baixa atividade larvicida, seus estudos não foram aprofundados (KELLEN et al., 1965). A utilização do Bs como agente inseticida foi adiada até 1970 quando Singer, na Índia, isolou a cepa SSII-1 que apresentou uma boa atividade larvicida (SINGER, 1973), resgatando o interesse no isolamento de novas cepas de Bs ativas. Dentre centenas de cepas de Bs conhecidas, algumas são altamente tóxicas para larvas de mosquitos e foram isoladas de regiões tropicais como, por exemplo, a cepa 1593 da Indonésia (SINGER, 1974), 2297 isolada do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), 2362 da Nigéria (WEISER, 1984), IAB59 de Gana (DE BARJAC et al., 1988) e C3-41 da China (LIU et al., 1989).

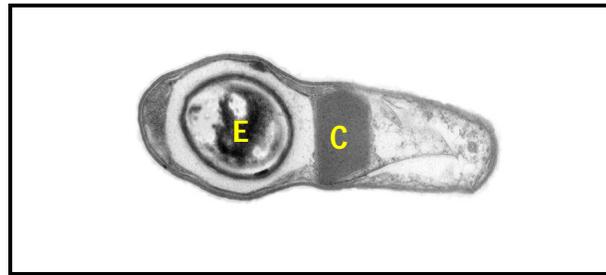


Figura 2. Corte longitudinal do *Bacillus sphaericus* em fase de esporulação por microscopia eletrônica de transmissão.

Nota: E: esporo; C: cristal protéico. Fonte: Modificado de Kalfon et al. (1984).

Como as diferenças morfológicas entre as cepas de Bs são pequenas, a classificação mais utilizada baseia-se na reação de aglutinação flagelar, que agrupa as cepas em sorotipos de acordo com o antígeno flagelar (DE BARJAC et al., 1985; DE BARJAC; VÉRON; COSMAO DUMAOIR, 1980). Outros sistemas de classificação também podem ser utilizados como a homologia do DNA (KRYCH; JOHSON; YOUSTEN, 1980), tipagem de bacteriófagos (YOUSTEN et al., 1980), classificação numérica pelos fatores fenotípicos (ALEXANDER; PRIEST, 1990), análise do padrão de ácidos graxos celulares (FRACHON et al., 1991), ribotipagem (AQUINO-DE-MURO; MITCHELL; PRIEST, 1992) e pela técnica da análise de RAPD/ “Random Amplified Polymorphic DNA” (WOODBURN; YOUSTEN; HILU, 1995). Segundo a classificação da reação de aglutinação flagelar, as cepas mais tóxicas pertencem aos sorotipos H5a5b (1593, 1691, 1881 e 2362), H5 (C3-41), H6 (IAB59) e H25 (2297). Nenhum desses métodos possui um nível de correlação com o nível de toxicidade da cepa e esta característica é determinada através de ensaios de toxicidade *in vivo* (bioensaios) para as larvas de uma determinada espécie, cujos resultados são comparados com a toxicidade já estabelecida de uma cepa padrão.

2.4.1 Utilização do Bs no controle de mosquitos

O Bs tem sido utilizado com sucesso em programas de controle de mosquitos desde a década de 80, em países de clima temperado e tropical. A adoção de produtos à base de bactérias entomopatogênicas para o controle de culicídeos tem sido baseada, sobretudo, em sua inocuidade para organismos não-alvo e para o ambiente (LACEY; SIEGEL, 2000; MULLA *et*

al., 1984). Outra vantagem do Bs é sua estabilidade em criadouros orgânicamente poluídos, preferencialmente colonizados por larvas de *Culex*, além de sua capacidade de se reciclar nos cadáveres das larvas, prolongando a persistência nos criadouros onde o biolarvicida é aplicado (BECKER et al., 1995; NICOLAS; DARRIET; HOUGARD, 1987; SKOVMAND; BAUDUIN, 1997).

Produtos à base de Bs 2362 têm sido usados na França em um programa para o controle de larvas de *Culex pipiens* (THIÉRY; BACK; SINÈGRE, 1996). Na China, durante a década de 90, uma formulação à base da cepa C3-41 foi desenvolvida e utilizada no controle de *Culex* e *Anopheles* em mais de 40 cidades. Nas áreas tratadas a densidade de adultos foi drasticamente reduzida e esse agente de controle foi considerado muito eficiente (YUAN et al., 2000). Barbazan et al. (1997), observaram uma redução de mais de 90% do número de fêmeas coletadas em uma área de Maroua, Camarões, após um ano de tratamento com o Bs. No Brasil, um programa piloto de controle do *C. quinquefasciatus* com biolarvicidas a base do Bs foi desenvolvido entre 1990 e 1995, em Pernambuco, em dois bairros da RMR (Coque e Jardim Brasil) com resultados satisfatórios, pois houve a diminuição do número de adultos por quarto/noite de 60 a 120 antes do tratamento para 16 adultos por quarto após o tratamento (REGIS et al., 1995, 1996, 2000). Desde 2003, larvicidas a base do Bs são utilizados pelas Prefeituras das cidades do Recife e de Olinda no controle do *Culex* em vários bairros destes municípios com o objetivo de reduzir sua densidade populacional em áreas com alto e médio risco relacionado à transmissão da filariose (RECIFE, 2008; SILVA FILHA et al., 2008).

2.4.2 Toxinas inseticidas

As cepas de Bs que possuem maior atividade tóxica são aquelas que produzem a toxina Bin no cristal protéico durante a esporulação e esse é o principal fator inseticida dessa bactéria (DAVIDSON; MYERS, 1981). A protoxina é composta por dois polipeptídeos de 42 (BinA) e 51kDa (BinB), que agem em sinergia e, por isso, ela foi denominada como binária (Bin) (NICOLAS et al., 1993). Os dois polipeptídios são sintetizados em proporções equimolares e a presença de ambos é necessária para a expressão máxima da toxicidade sobre as larvas de mosquitos (BAUMANN et al., 1991). Estudos realizados por Nicolas et al. (1993), demonstraram que BinB não é tóxica isoladamente para larvas de *Culex* e que BinA

pode ser tóxica, porém em altas concentrações, mas essa atividade é ainda inferior àquela da toxina Bin.

Recentemente, foi descoberto que o Bs IAB59 produz outras toxinas além da toxina Bin, depois de observado que populações de *C. quinquefasciatus* resistentes às cepas do Bs 2362 e C3-41, que produzem apenas a toxina Bin, são susceptíveis à cepa IAB59 (PEI et al., 2002). Jones et al. (2007) identificaram duas toxinas da família Cry na cepa IAB59, a Cry48Aa e Cry49Aa de 135 e 53 kDa, respectivamente. A Cry48Aa tem homologia com as toxinas de três domínios da família Cry do *B. thuringiensis* e, a proteína Cry49Aa possui homologia com a família de toxinas binárias, tal como a toxina Bin do Bs e as toxinas Cry35 e Cry36 do *B. thuringiensis*. Semelhante à toxina Bin, as toxinas Cry48Aa e Cry49Aa são produzidas como inclusões cristalinas e sob a forma individual não têm atividade. A presença de ambas em uma concentração equimolar apresenta alta toxicidade para larvas de *Culex* e, por isso, ela é também considerada uma toxina binária (JONES et al., 2007, 2008). É importante ressaltar que na cepa nativa IAB59, há um déficit de produção da Cry48Aa, e a presença desta segunda toxina binária não aumenta a toxicidade, já conferida pela toxina Bin nesta cepa, pois esta toxina parece interagir com outros receptores e formar poros para ação da toxina Bin nas larvas (JONES et al., 2007).

Um grupo de toxinas diferente das toxinas do cristal, as toxinas Mtx, são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria (THANABALU et al., 1991). A primeira Mtx foi isolada do Bs SSII-1 e possui um peso molecular de 100 kDa (protoxina). Essa protoxina é ativada no intestino do inseto por proteinases como a tripsina, sendo clivada em dois fragmentos, um de 70 kDa derivado da região C-terminal e outro de 27 kDa da região N-terminal (THANABALU; HIDLEY; BERRY, 1992). Outras toxinas Mtx foram descritas, a Mtx2 (32 kDa) e Mtx3 (36 kDa) (LIU et al., 1996; THANABALU; PORTER, 1996). As Mtx pouco contribuem para a toxicidade do Bs em cultivos esporulados, pois são degradadas por proteases presentes no meio durante o crescimento bacteriano. Porém, quando expressas como proteínas recombinantes, podem apresentar atividade semelhante à toxina Bin, mostrando o importante potencial destas toxinas (THANABALU; PORTER, 1995; WIRTH et al., 2007).

2.4.3 Modo de ação da toxina Bin

Todos os biolarvicidas comerciais a base de Bs usados no controle de mosquitos são obtidos a partir de cepas produtoras das toxinas Bin, por esta razão, a maior parte dos estudos do modo de ação do Bs tem sido direcionada para a toxina Bin. A inocuidade da toxina Bin para invertebrados não-alvo e vertebrados é também um dado importante para sua utilização no controle de insetos e esta seletividade é devida ao seu modo de ação específico (LACEY; SIEGEL, 2000; MERRITT et al., 2005; MULLA et al., 1984). Após a ingestão pelas larvas do mosquito, o cristal que contém a protoxina, é solubilizado em pH intestinal alcalino (≈ 10) e os polipeptídios BinB e BinA, de 51- e 42- kDa, são clivados por serina-proteases atingindo a forma de fragmentos ativos de 43- e 39- kDa, respectivamente (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987). Em seguida, a toxina Bin liga-se a receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal das larvas de espécies susceptíveis tais como *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *An. gambiae* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA et al., 1997). Larvas de *Aedes aegypti* são refratárias ao Bs, pois não possuem receptores funcionais para a toxina Bin no seu epitélio intestinal (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

Em larvas de *C. pipiens*, estudos mostraram que o componente BinB é o responsável pela ligação com o receptor, enquanto que BinA é responsável, em grande parte, pela toxicidade (CHARLES et al., 1997). A ligação da toxina Bin aos receptores de membrana é uma etapa essencial e determina a seletividade e eficácia do Bs para os culicídeos. O receptor da toxina Bin, em *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*, é uma α -glicosidase de 60 kDa que está ligada à membrana celular do epitélio intestinal das larvas por uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI), e foi denominado “Cpm1” e “Cqm1”, respectivamente (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1999). Em larvas de *An. gambiae*, estudos recentes mostraram que o receptor é uma α -glicosidase ortóloga da Cpm1, denominada Agm3 (OPOTA et al., 2007). Ainda não se conhece o modo de ação da toxina Bin após a ligação específica aos receptores, entretanto, os principais efeitos citopatológicos no epitélio intestinal das larvas tratadas com o Bs são intumescimento das mitocôndrias, formação de vacúolos no citoplasma, ruptura do retículo endoplasmático e danos nas microvilosidades que culminam com a morte das larvas (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2008; SINGH; GILL, 1988). Estudos em sistema de membrana artificial como

lipossomas mostraram que a toxina Bin, especificamente o componente BinA, teria capacidade de formar poros (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).

A toxina Cry48Aa/Cry49Aa da cepa IAB59 possui um modo de ação único, pois ocorre uma sinergia entre a subunidade Cry48Aa que, diferentemente das outras toxinas Cry desta família, necessita de uma proteína acessória que é a Cry49Aa (JONES et al., 2007). A etapa inicial do modo de ação é similar à toxina Bin, ou seja, após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino e os polipeptídios de 135- (Cry48Aa) e 53-kDa (Cry49Aa), são clivados por proteases atingindo a forma da toxina ativa de 60- e 49-kDa, respectivamente. Possivelmente a toxina depende da interação com o epitélio intestinal das larvas, embora os receptores ainda não tenham sido caracterizados (JONES et al., 2007; 2008). O espectro de ação larvicida destas toxinas parece ser limitado para larvas do gênero *Culex* (JONES et al., 2008).

2.5 Resistência de larvas de *Culex* ao Bs

Estudos têm demonstrado que populações de *Culex* podem desenvolver resistência aos biolarvicidas a base de Bs (cepas 2362, 2297 e C3-41) quando submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório ou de campo (Tabela 1). A resistência foi observada pela primeira vez em duas colônias de *C. quinquefasciatus* submetidas à seleção em laboratórios independentes na Califórnia, que atingiram níveis diferentes de resistência, sendo um da ordem de 100.000 vezes (GEORGHIOU et al., 1992; WIRTH et al., 2000) e o outro cerca de 35 vezes (RODCHAROEN; MULLA, 1994). Em campo, foi observada a resistência de populações de *Culex* submetidas a tratamentos contínuos com o Bs na França, Índia, China, Tailândia e Brasil (MULLA et al., 2003; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; SINÈGRE et al., 1994; YUAN et al., 2000). Os níveis de resistência registrados em campo variaram entre 10 e 5.000 vezes, e colônias altamente resistentes (> 100.000 vezes) foram obtidas através de pressão de seleção em laboratório (Tabela 1) (PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000). Duas colônias de *C. quinquefasciatus* com alto nível de resistência ao

Bs, selecionadas sob condições de laboratório, são mantidas no insetário do CPqAM-FIOCRUZ (Tabela 1). A colônia R-2362, apresenta uma razão de resistência (RR) > 162.000 à cepa 2362 e, a colônia R-IAB59 apresenta uma RR de \approx 40.000 à cepa IAB59, sendo a única colônia altamente resistente a esta cepa, até o momento (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002).

2.5.1 Mecanismos de resistência à toxina Bin

A resistência à toxina Bin tem sido investigada em algumas colônias resistentes e há pelo menos dois mecanismos distintos envolvidos (Tabela 1): a. falha na ligação toxina-receptor, por ausência de receptor funcional no epitélio intestinal, sendo este o principal mecanismo descrito (colônias GEO, RLCq1/C3-41, R-2362, R-IAB59 e BP); b. receptores presentes e funcionais, cujo mecanismo e genes envolvidos na resistência ainda são desconhecidos (colônias SPHAE e TUNIS). O estudo da herança da resistência em diferentes populações mostra que este caráter é recessivo (Tabela 1).

O mecanismo molecular da resistência foi estudado nas colônias de laboratório GEO e R-2362, e na população de campo BP, que são resistentes ao Bs 2362 devido a uma falha na ligação da toxina Bin aos receptores (NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Na colônia GEO ocorre uma mutação pontual no gene do receptor (alelo *cpml*_{GEO}), a troca de uma timina por uma adenina na posição 1706, enquanto que na R-2362, o gene *cqml* apresenta uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1334-1352 (alelo *cqml*_{REC}) (DARBOUX et al., 2002; ROMÃO et al., 2006). Na colônia BP dois alelos de resistência diferentes foram caracterizados: o alelo *cpml*_{BP} que possui uma mutação “nonsense” (Gln396Stop) e o alelo *cpml*_{BP-del} que apresenta a inserção de um elemento de transposição (*transposon*) na região do promotor do gene *cpml* que promove uma mudança no processamento do RNAm (DARBOUX et al., 2007).

As mutações nos alelos *cpml*_{GEO}, *cqml*_{REC} e *cpml*_{BP} geram um códon de parada prematuro no gene que impede a tradução da proteína completa contendo a âncora GPI na sua extremidade C-terminal. Estas mutações causam resistência das larvas, pois nestes indivíduos a proteína a ser produzida é secretada no lúmen ao invés de estar ligada à membrana apical do epitélio intestinal ou não é expressa e, portanto, não pode funcionar como receptor da toxina

Bin (DARBOUX *et al.*, 2002; 2007; ROMÃO *et al.*, 2006). Já o alelo *cpm1_{BP-del}* codifica uma proteína truncada que está presente no epitélio intestinal das larvas ligada a âncora GPI, porém não é reconhecida pela toxina Bin devido à perda de 60 aminoácidos que causa alguma mudança no sítio de ligação ou na sua conformação (DARBOUX *et al.*, 2007).

A identificação dos alelos que conferem resistência é fundamental, pois um dos fatores que influenciam a evolução da seleção de resistência é a frequência inicial desses genes de resistência (*r*) nas populações. Por esta razão, a utilização de ferramentas capazes de determinar a frequência de genes *r* à biolarvicidas tem grande importância para evitar a seleção de resistência. No caso da colônia R-IAB59, resistente a todas as toxinas produzidas pela cepa IAB59 (Bin, Cry48Aa/Cry49Aa), o mecanismo de resistência à toxina Bin foi elucidado e é semelhante aquele da colônia R-2362, os indivíduos resistentes são homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}* (D. Chalegre, comunicação pessoal). Por outro lado, o mecanismo de resistência às toxinas Cry48Aa/Cry49Aa ainda não é conhecido.

2.5.2 Resistência cruzada

Estudos revelaram que colônias resistentes às cepas 2362, C3-41, 2297 e 1593 apresentam elevados níveis de resistência cruzada entre si, pois todas produzem, como fator inseticida, a toxina Bin que liga-se ao receptor (Cpm1/Cqm1) do intestino médio do mosquito (NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2001; SILVA FILHA *et al.*, 2004; WIRTH *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2003). Por outro lado, a cepa IAB59 que possui, além da toxina binária, a Cry48Aa/Cry49Aa apresenta atividade para as larvas resistentes às cepas supracitadas, (JONES *et al.*, 2007; PEI *et al.*, 2002, YUAN *et al.*, 2003).

Larvas resistentes à toxina Bin são completamente susceptíveis ao entomopatógeno *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) (AMORIM *et al.*, 2007; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; PEI *et al.*, 2002). O cristal do Bti apresenta quatro protoxinas (Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A), que agem em sinergia e interagem com sítios de ligação no epitélio das larvas, que são diferentes dos receptores Cqm1 e, por esta razão, apresentam ação tóxica para as larvas resistentes à toxina Bin do Bs, da mesma forma que para larvas sensíveis (BUZDIN *et al.*, 2002; CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995; RAVOAHANGIMALALA; CHARLES, 1995).

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 ^a	Ligação toxina-receptor	Alelo <i>r</i> ^b	Forma de ^c herança	Referência ^d
GEO	EUA	Lab	>100.000	Não	<i>cpm1_{GEO}</i>	R/A	1
R-2362	Brasil	Lab	>100.000	Não	<i>cqm1_{REC}</i>	R/A	2
R-IAB59	Brasil	Lab	≈40.000	Não	<i>cqm1_{REC}</i>	R/A	3
RLCq1/C3-41	China	Lab	>100.000	Não	ND	R/A	2
Kochi	Índia	Campo	≈150	ND	ND	ND	4
Coque	Brasil	Campo	≈10	Sim	ND	ND	5
SPHAE	França	Campo	>20.000	Sim	ND	R/S	6
RFCq1	China	Campo	>20.000	ND	ND	ND	7
TUNIS	Tunísia	Campo	≈750	Sim	ND	R/S	8
BP	França	Campo	>5.000	Não	<i>cpm1_{BP}</i> <i>cpm1_{BP-del}</i>	R/S	8
Wat Pikul	Tailândia	Campo	>125.000	ND	ND	ND	9

Nota: ^aRazão entre a concentração letal do *B. sphaericus* para 50% (CL₅₀) das larvas da colônia avaliada e a CL₅₀ observada para uma colônia susceptível usada como referência.

^bAlelo que confere resistência à toxina Bin.

^cR/A: Recessiva autossômica; R/S: Recessiva ligada ao sexo.

ND: não determinado.

^dNielsen-Leroux et al. (1995); 2. Oliveira et al. (2004); 3. Amorim et al. (2007); 4. Rao et al. (1995); 5. Silva-Filha et al. (1995); 6. Nielsen-Leroux et al. (1997); 7. Yuan et al. (2000); 8. Nielsen-Leroux et al. (2002); 9. Mulla et al. (2003).

2.5.3 Resistência e desempenho biológico

A evolução da resistência dos insetos aos inseticidas pode ser influenciada pelo custo biológico, que seria a diminuição do desempenho biológico associada aos genes de resistência na ausência da pressão de seleção. O desempenho biológico geralmente é definido como um sucesso reprodutivo ou a proporção de genes que são mantidos na população. A análise do desempenho biológico é algo complexo, sendo necessária a avaliação de diversos parâmetros para se chegar a uma conclusão definitiva (GASSMAN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). Os parâmetros geralmente utilizados para analisar mudança no desempenho biológico, comparados entre uma colônia susceptível padrão e uma colônia resistente mantida sem pressão de seleção, são fecundidade, que seria o número médio de ovos postos por fêmea; fertilidade que corresponde ao número médio de larvas/ninfas obtidos a partir da eclosão; o tempo médio de desenvolvimento do inseto e o sucesso do acasalamento dos adultos (AMIN; WHITE, 1984; GROETERS et al., 1993). Estudos com colônias de insetos selecionadas para resistência em laboratório mostram que esta característica pode gerar desvantagens reprodutivas, maior susceptibilidade aos inimigos naturais ou ainda um maior percentual de mortalidade (AGNEW et al., 2004; BERTICAT et al., 2002; BOURGUET et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003; RODCHAROEN; MULLA, 1997). Porém, em alguns casos, analisando estes mesmos parâmetros, os genes de resistência confeririam um aumento no desempenho biológico, quando cessada a pressão de seleção (AGNEW et al., 2004; GOULD; ANDERSON, 1991).

Os fatores que influenciam a evolução de resistência dos insetos pragas na agricultura incluem a herança da resistência, a frequência inicial dos alelos de resistência, o comportamento dos insetos, as práticas de manejo das pragas e o custo biológico. Recentemente, diversos estudos têm sido realizados em relação ao custo biológico para insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera, resistentes a plantas transgênicas que expressam toxinas do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (GASSMAN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009; JANMAAT; MYERS, 2003; WENES et al., 2006), e a maioria deles apontam que há um custo biológico associado aos alelos de resistência às toxinas de Bt. Em laboratório, alguns estudos mostraram a diminuição da resistência ao Bt e este declínio foi atribuído a parâmetros relacionados com algum custo biológico, como por exemplo, a diminuição do ciclo de desenvolvimento, taxa de sobrevivência, fecundidade ou insucesso no acasalamento na colônia resistente comparado com os indivíduos susceptíveis, na ausência das toxinas do Bt

(GROETERS et al., 1993; LIU et al., 1999). Contudo, em populações resistentes de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), provenientes do campo, o desenvolvimento do ciclo biológico foi semelhante ao das populações susceptíveis (SAYYED; WRIGTH, 2001). Também não foram observadas diferenças entre as populações resistentes e susceptíveis de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) em relação à sobrevivência e o peso médio das larvas, na ausência das toxinas do Bt (GOULD; ANDERSON, 1991).

Para melhor análise do custo biológico, além das características biológicas, pode ser avaliada a mudança na frequência dos alelos de resistência nas populações não tratadas, pois a diminuição dos alelos, sem a ação de nenhum fator externo, como por exemplo, a migração de indivíduos susceptíveis, indicaria que na ausência da pressão de seleção estes alelos estariam ocasionando algum custo biológico na população (GASSMAN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). Como as colônias susceptíveis de referência são mantidas no laboratório por longos períodos, acredita-se que estas colônias podem estar adaptadas a estas condições, logo, a comparação do desempenho biológico deve abranger diversos parâmetros ou então utilizar uma colônia susceptível obtida em campo e, em paralelo, selecioná-la para obter um nível de resistência e comparar o custo biológico das duas colônias (BOURGUET et al., 2004). O custo biológico pode diminuir durante a evolução através de mecanismos, tais como, a seleção de alelos modificados de outros genes que minimizam os efeitos deletérios dos alelos de resistência, na ausência dos inseticidas. Uma segunda possibilidade seria a substituição de um alelo de resistência que gera um custo biológico, por outro de mesmo locus, que gere um custo biológico menor do que o anterior (BOURGUET et al., 2004).

2.6 Manejo da resistência

A resistência ao Bs, em todas as colônias estudadas, é herdada como um caráter recessivo, o que favorece de forma considerável o manejo da resistência. Um exemplo simples é o tratamento de populações resistentes com outro agente de controle, com modo de ação distinto do Bs, que pode eliminar os indivíduos resistentes e reduzir a frequência dos genes da resistência (r) ao Bs. Outro fator que tem forte influência sobre o *status* da resistência é a introdução de indivíduos susceptíveis na população resistente que também provocaria a redução da frequência alélica dos genes r . Este fator pode ser observado em campo pela migração dos indivíduos de uma área não tratada para uma área tratada, e pela

existência de criadouros não tratados na área tratada que servem como uma fonte de indivíduos susceptíveis. Outros fatores ambientais e climáticos também podem reduzir a pressão de seleção.

2.6.1 Utilização de *Bacillus thuringiensis* e bactérias entomopatógenas recombinantes

O arsenal de proteínas inseticidas com ação em dípteros compreende a toxina Bin do Bs, grande variedade de toxinas Cry e Cyt de cepas de *B. thuringiensis* (sorovarietades *israelensis*, *medellin*, *jegathesan*) e do Bs, além das toxinas Mtx (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE et al., 1996; JONES et al., 2007; LACEY, 2007; LIU et al., 1996). Esta diversidade de toxinas pode proporcionar o desenvolvimento de biolarvicidas com um perfil tóxico complexo e, conseqüentemente, com baixo potencial de seleção de resistência. Recentemente um produto a base de uma mistura de cristais do Bs e do Bti foi desenvolvido e testes preliminares mostraram a sua efetividade no controle de larvas de *C. quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, na Colômbia (GIRALDO-CALDERÓN et al., 2008). Zahiri e Mulla (2003) demonstraram a efetividade da estratégia de mistura do Bs com o Bti, pois não foi observado o desenvolvimento da resistência na colônia selecionada em laboratório por 36 gerações.

Com a utilização da técnica de DNA recombinante, é possível o desenvolvimento de cepas de Bs e Bt recombinantes que expressam os cristais contendo algumas das toxinas do Bti e a toxina Bin do Bs, resultando no aumento da toxicidade para larvas de *Culex* e *Anopheles*, e na ampliação do espectro da toxicidade também para larvas de *Aedes* (FEDERICI et al., 2003; PARK; BIDESHI; FEDERICI, 2003; PARK et al., 2005; PONCET et al., 1997). Essas cepas recombinantes podem ser importantes ferramentas para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência, pois possuem vários fatores tóxicos e têm um espectro de ação mais amplo para os culicídeos.

2.6.2 Influência de migração e refúgios não tratados

Estudos prévios demonstraram que a forma de herança recessiva dos genes que conferem resistência ao Bs faz com que a introdução de indivíduos susceptíveis na colônia

provoque a redução do nível de resistência. Fatores como criadouros não tratados na área, surgimentos de novos criadouros e migração de indivíduos susceptíveis de uma área não tratada para a tratada influenciam no fluxo gênico e podem provocar a diminuição da frequência de indivíduos homozigotos resistentes. Uma população de *C. quinquefasciatus* na área do Coque, em Recife, que apresentou uma razão de resistência de 10 vezes ao Bs, recuperou a susceptibilidade 16 meses após a interrupção do tratamento, mostrando a reversão da resistência, possivelmente em resposta a estes fatores da dinâmica populacional (SILVA-FILHA; REGIS, 1997).

Para o manejo de resistência de insetos pragas às plantas transgênicas que produzem as toxinas do Bt, estratégias como o monitoramento da frequência dos genes de resistência é muito importante, bem como o emprego de refúgios não tratados entre as áreas cultivadas com plantas Bt (TABASHNIK et al., 2008). Neste modelo, a estratégia de alta dose da toxina expressa pelas plantas associada às áreas de refúgios não tratados é baseada na hipótese que, caso haja seleção de indivíduos resistentes, estes possam acasalar com indivíduos susceptíveis oriundos das áreas de refúgio, gerando heterozigotos que são susceptíveis às elevadas doses das toxinas expressas nas plantas, o que evitaria, portanto, o aumento da frequência do gene de resistência (TABASHNIK et al., 2005, 2008; WENES et al., 2006).

2.7 Ferramentas para o monitoramento da resistência

A principal ação para evitar a seleção de resistência é avaliar, periodicamente, a susceptibilidade *in vivo* das populações tratadas. A avaliação da susceptibilidade aos inseticidas é feita, na maior parte dos casos, através de bioensaios *in vivo* que determinam as concentrações letais do inseticida para 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) para *pools* de larvas submetidas a uma curva crescente de concentrações (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1985). Este método mostra a susceptibilidade da população para um grupo de indivíduos, porém, não permite detectar a frequência de indivíduos susceptíveis ou resistentes (R). Por outro lado, bioensaios de dose diagnóstica podem ser feitos para rastrear indivíduos R na população. Neste ensaio é utilizada uma elevada dose do entomopatógeno ($> CL_{90}$) que permite detectar a presença de indivíduos resistentes na população embora não seja possível identificar os indivíduos heterozigotos (ANDOW; ALSTAD, 1998). Por outro lado, se os alelos que conferem resistência são conhecidos, é possível utilizar métodos de PCR que

permitem a detecção direta do alelo e, conseqüentemente, determinar os genótipos dos indivíduos para este loco (CHALEGRE et al., 2009; GAHAN et al., 2007; TABASHNIK et al., 2006).

Neste trabalho, a proposta foi analisar o processo de recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *C. quinquefasciatus* ao Bs IAB59, sob condições de laboratório, propiciado pela introdução de indivíduos susceptíveis na colônia resistente, através de três parâmetros de monitoramento. O primeiro são os bioensaios de susceptibilidade *in vivo* das larvas ao Bs. Como a resistência da colônia R-IAB59 à toxina Bin é conhecida, será possível avaliar se os indivíduos analisados expressam a α -glicosidase Cqm1, que é o receptor da toxina Bin e o genótipo dos indivíduos para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* através de ferramentas moleculares (CHALEGRE et al., 2009; ROMÃO et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Bacillus sphaericus (Bs) é um importante entomopatógeno utilizado em programas de controle de espécies do complexo *Culex* que podem ser vetores de agentes etiológicos de doenças de interesse médico-sanitário. Em Recife e Olinda, as prefeituras estão executando o Programa de Controle da Filariose e, dentre as medidas adotadas, está o controle do vetor *C. quinquefasciatus*, com a utilização do Bs para o tratamento larvicida em criadouros de diversos bairros. Os estudos sobre o modo de ação do Bs são imprescindíveis para dar o suporte científico necessário ao uso sustentável deste biolarvicida em programas de controle. O aparecimento da resistência demonstra a necessidade de estudos do modo de ação dessa bactéria e de estratégias para o seu manejo. No âmbito desse problema, uma das principais questões de interesse é como recuperar o status de susceptibilidade da população de insetos. A colônia resistente R-IAB59, selecionada e mantida em nosso laboratório, apresenta características ideais que fazem dela um modelo ímpar para o estudo da recuperação da susceptibilidade. Os indivíduos possuem um elevado nível de resistência, o mecanismo de resistência é uma alteração no sítio alvo do receptor Cqm1 e o gene que confere a resistência foi identificado e pode ser detectado por meio de ferramentas moleculares, desenvolvidas em estudos prévios por nossa equipe. O modelo de estudo em questão pode trazer contribuições importantes para o conhecimento e a aplicação de estratégias de manejo de resistência ao Bs.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Em quanto tempo ocorre a recuperação da susceptibilidade da colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus*, após a introdução de indivíduos susceptíveis na colônia?

5 HIPÓTESE

A introdução de indivíduos susceptíveis na colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus* levará à redução da frequência do gene de resistência, visto que este é herdado de forma recessiva e, conseqüentemente, haverá uma recuperação da susceptibilidade desta colônia.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar a recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus* (Bs), mediante a introdução de indivíduos susceptíveis sob condições de laboratório, e produzir conhecimentos para estabelecer estratégias de manejo da resistência.

6.2 Objetivos específicos

- a) Comparar o desempenho biológico da colônia resistente ao Bs cepa IAB59 (R-IAB59) com o da colônia susceptível (CqSF);
- b) Estabelecer uma colônia a partir do cruzamento entre indivíduos resistentes e susceptíveis ao Bs IAB59 (colônia IAB59-Rev);
- c) Avaliar a susceptibilidade *in vivo* das larvas das progênes ao Bs cepas IAB59 e 2362;
- d) Determinar a frequência das larvas que expressam a α -glicosidase Cqm1 nas progênes da colônia IAB59-Rev;
- e) Determinar a frequência do alelo de resistência *cqm1*_{REC};
- f) Verificar a correlação entre os ensaios de susceptibilidade *in vivo* com as frequências dos alelos do gene *cqm1* e da α -glicosidase Cqm1 nas amostras analisadas;

7 METODOLOGIA

Neste estudo foram usados diferentes métodos para avaliar a susceptibilidade ao *Bacillus sphaericus* (Bs) em larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias parentais, susceptíveis e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59), e da progênie da colônia IAB59-Rev resultante do cruzamento das parentais (Figura 3). A colônia R-IAB59 é resistente às toxinas Bin e Cry48Aa/Cry49Aa que compõem o perfil tóxico da cepa IAB59. A base molecular da resistência à toxina Bin nesta colônia é conhecida e está associada ao alelo *cqm1_{REC}* que impede a expressão da α -glicosidase Cqm1, receptor da toxina (OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). Devido à disponibilidade de ferramentas moleculares de diagnóstico, a resistência à toxina Bin foi o principal parâmetro analisado neste estudo. As colônias parentais foram avaliadas quanto ao seu desempenho biológico e, em seguida, estas colônias bem como sua progênie oriunda do cruzamento, foram submetidas à análise de susceptibilidade *in vivo* ao Bs IAB59 e 2362, expressão do receptor Cqm1 por ensaios enzimáticos e determinação da frequência dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* por PCR.

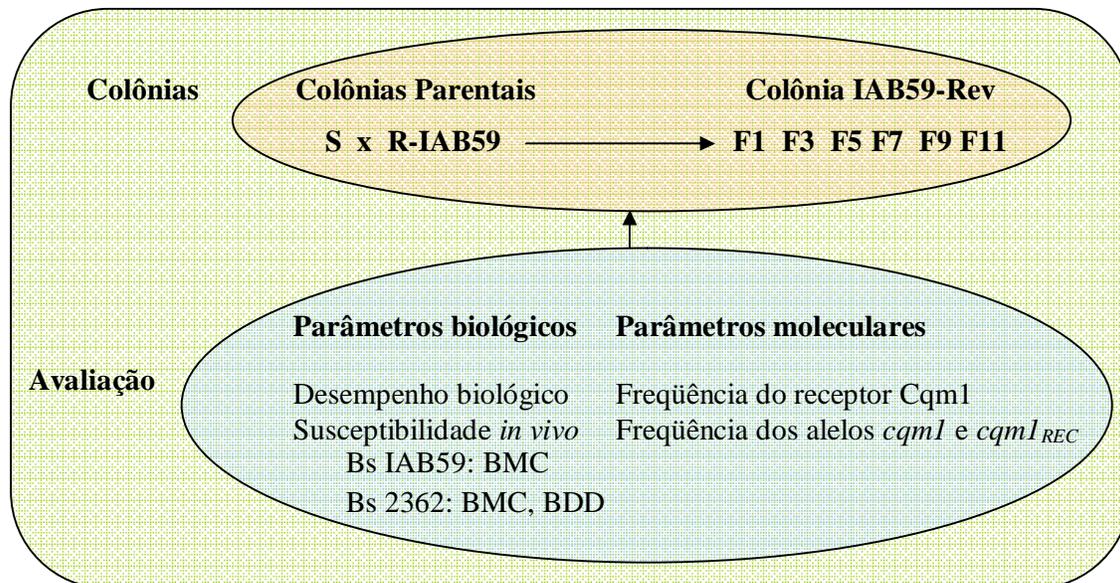


Figura 3. Representação dos parâmetros para a avaliação da susceptibilidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* (Bs).

Nota: Indivíduos das colônias parentais susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao Bs cepa IAB59 foram acasalados na proporção de 1:1 e a progênie resultante foi analisada (F1-F11). **BMC:** Bioensaios de múltiplas concentrações. **BDD:** Bioensaio dose diagnóstica.

7.1 Colônias de mosquitos

Neste estudo foram utilizadas quatro colônias de *C. quinquefasciatus* e uma de *Ae. aegypti*, descritas abaixo. As colônias parentais e progênies foram mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). As formas pré-imaginais, larvas e pupas, foram mantidas em recipientes com água de clorada e alimentadas com ração para gatos. Os adultos foram alimentados com uma solução de sacarose a 10% e as fêmeas fizeram repastos sanguíneos em galinhas (*Gallus gallus*).

- **S.** Colônia parental de *C. quinquefasciatus* susceptível, formada a partir de larvas coletadas em criadouros do bairro de Peixinhos, localizado na Região Metropolitana do Recife (RMR). Esta colônia é formada por indivíduos susceptíveis ao Bs que apresentam o alelo *cqm1* em homozigose e expressam a α -glicosidase Cqm1, estes indivíduos foram utilizados para formação da colônia IAB59-Rev, após o cruzamento com indivíduos resistentes da colônia R-IAB59.
- **CqSF.** Colônia de *C. quinquefasciatus* susceptível ao Bs IAB59, formada a partir de larvas coletadas na RMR e mantida sob condições de laboratório desde 1990. Os dados do desempenho biológico foram obtidos a partir da comparação com esta colônia e a colônia resistente (R-IAB59) e, este método está descrito no item 7.2
- **R-IAB59.** Colônia parental de *C. quinquefasciatus* resistente, selecionada com o Bs IAB59 e apresenta um nível de resistência na ordem de ≈ 40.000 vezes, em relação à colônia CqSF (AMORIM et al., 2007). A resistência à toxina Bin nesta colônia é caracterizada pela ausência do receptor Cqm1 no epitélio intestinal causada pela presença do alelo *cqm1_{REC}* em homozigose (Chalegre, comunicação pessoal; ROMÃO et al., 2006).
- **IAB59-Rev.** Colônia de *C. quinquefasciatus* formada a partir do cruzamento de cerca de 1.200 indivíduos das colônias parentais S e R-IAB59 (Figura 4). Grupos separados de pupas ♀ e ♂ de cada colônia parental e em igual número foram acondicionados em gaiolas para obtenção dos adultos. Após a emergência, os adultos foram adicionados

na proporção de 1:1 (machos:fêmeas, S:R-IAB59) em uma única gaiola, formando a colônia IAB59-Rev, para o acasalamento ao acaso e obtenção da progênie. A colônia foi mantida sob condições de laboratório, sem pressão de seleção, durante 11 gerações para a avaliação. Em cada geração foi obtido um *pool* de centenas de jangadas, e estas foram mantidas até a eclosão das larvas do 1º instar. A partir deste contingente, foi utilizada uma amostra igual ou maior a 15.000 larvas para constituir cada geração, a partir da qual foram coletados os indivíduos utilizados nas análises do estudo.

- **RecL.** Colônia de *Ae. aegypti* estabelecida a partir de amostras de ovos coletadas na RMR, mantida em laboratório desde 1996. Amostras de DNA de larvas desta colônia foram utilizadas como controle negativo na reação de PCR usada para detectar os alelos *cqml* e *cqml*_{REC} descrita no item 7.5.

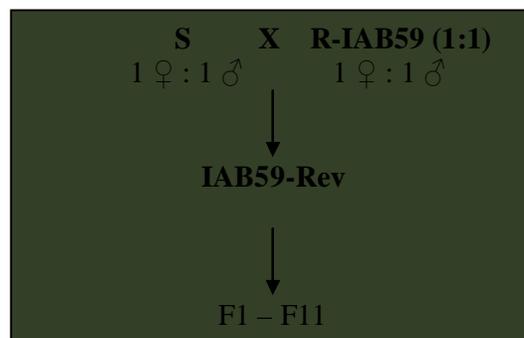


Figura 4. Cruzamento entre indivíduos de *Culex quinquefasciatus* da colônia susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao *Bacillus sphaericus* IAB59 para estabelecer a colônia IAB59-Rev e sua progênie durante 11 gerações (F1-F11).

7.2 Avaliação de parâmetros biológicos

Alguns parâmetros biológicos das colônias parentais CqSF e R-IAB59 foram analisados para determinar se a resistência estava associada à uma redução do desempenho biológico na colônia R-IAB59. Os parâmetros considerados foram a fecundidade e fertilidade das fêmeas, além do estado nutricional das pupas. As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste T com $P \geq 0,05$, usando o programa Microsoft Excel ®.

- **Fecundidade.** Determinada pelo número médio de ovos por jangada correspondente ao 1º ciclo gonadotrófico das fêmeas. Cerca de 30 fêmeas grávidas de cada colônia foram mantidas em gaiolas com recipiente contendo água destilada para a oviposição. Foram coletadas 22 jangadas, randomicamente, e os ovos foram contados utilizando um microscópio estereoscópico. Em seguida, cada jangada foi colocada em um recipiente plástico com 200 mL de água destilada para a eclosão das larvas. Este método foi repetido, totalizando um número final de 44 jangadas, de cada colônia, avaliada.
- **Fertilidade.** Determinada pelo número médio de larvas que eclodiram no período de 48 horas após a oviposição das jangadas analisadas em relação à fecundidade. As larvas foram contabilizadas com o auxílio de um suporte com lâmpada para melhor visualização.
- **Estado nutricional das pupas.** Avaliado pela determinação do peso úmido das pupas, em até 14 horas após a muda. O peso foi determinado a partir de grupos de 25 pupas de cada sexo. Para cada colônia, foram avaliados 20 e 10 *pools* de pupas machos e fêmeas, respectivamente.

7.3 Larvicidas à base do *Bacillus sphaericus*

Para avaliação da susceptibilidade *in vivo* das larvas, foram utilizados larvicidas a base do Bs cepas IAB59 e 2362, produzidos e gentilmente cedidos pelo Dra. Eugênia Rios (Bioticom-Recife, Brasil). Antes do seu uso, cada lote fornecido foi testado para avaliar sua atividade tóxica para a colônia susceptível de referência (CqSF), segundo método de bioensaio descrito no item 7.4.1.

- **Cepa IAB59.** Esta cepa apresenta como fatores tóxicos as toxinas binária (Bin) e Cry48Aa/Cry49Aa, o biolarvicida foi usado sob a forma de pó liofilizado obtido a partir da sua biomassa úmida (R.0323/06). Este lote do Bs IAB59 foi o mesmo utilizado para avaliar a evolução da resistência da colônia R-IAB59, descrita em Amorim et al.(2007).

- **Cepa 2362.** Esta cepa apresenta como fator tóxico apenas a toxina Bin e o biolarvicida foi utilizado sob a forma de biomassa úmida.

7.4 Avaliação da susceptibilidade *in vivo* ao *Bacillus sphaericus*

O bioensaio é o método empregado para avaliar a susceptibilidade *in vivo* das larvas de culicídeos às bactérias entomopatógenas. Neste estudo, foram utilizados dois tipos de bioensaios, com características e objetivos distintos, descritos abaixo.

7.4.1 Bioensaio de múltiplas concentrações

O objetivo dos bioensaios com múltiplas concentrações (BMC) é obter a resposta da susceptibilidade do grupo de larvas de uma colônia, frente a uma curva de concentrações crescentes do biolarvicida que provocam entre 15 e 100% de mortalidade. A partir desta curva é possível determinar as concentrações letais (CL) em mg/L do entomopatógeno para 50% (CL₅₀) e para 90% (CL₉₀) das larvas expostas, após o período de 48 horas. Os BMC foram realizados segundo o protocolo estabelecido pela WHO/Institut Pasteur (1985). Grupos de 20 larvas do 4º estágio foram expostos, em recipientes plásticos com 100 ml de água destilada, sendo testadas 2-3 replicatas de seis diferentes concentrações do biolarvicida, além do grupo controle não tratado. O registro da mortalidade obtida nos testes foi feito após 48 horas de exposição das larvas. Cada bioensaio foi repetido 2 ou 3 vezes e, as CL₅₀ e CL₉₀ foram determinadas pela análise de próbites (FINNEY, 1971), usando o programa SPSS 8.0 para Windows. Nos casos em que os dados obtidos não se adequaram ao modelo de próbites, as CL foram estimadas a partir dos dados da curva. A razão de resistência (RR) foi obtida para comparar as alterações de susceptibilidade de uma população investigada em relação a uma colônia susceptível de referência. A RR é obtida entre a CL da colônia investigada e a CL da colônia susceptível de referência ($RR = CL \text{ da colônia investigada} / CL \text{ da colônia de referência}$). A susceptibilidade das larvas das colônias parentais (S e R-IAB59) e das progênes (F1- F3- F5- F7 e F9) ao Bs cepa IAB59 e 2362 foi avaliada por este ensaio.

7.4.2 Bioensaio dose diagnóstica

O bioensaio dose diagnóstica (BDD) consiste em tratar um grande número de larvas, individualmente, com uma elevada concentração do larvicida para determinar a frequência de larvas com fenótipo resistente na amostra. Os BDD foram realizados utilizando placas com 24 poços, cada larva do 4º estágio foi colocada em um poço com 2 mL de água tratada com 125 mg/L da biomassa úmida do Bs cepa 2362. Esta concentração é cerca de 1.000 vezes superior a CL₉₀ desta biomassa para larvas da colônia S. A partir da leitura da mortalidade, realizada após 48 h, foi estabelecida a frequência de larvas sobreviventes ao ensaio, consideradas resistentes ao larvicida. Em cada ensaio, foram tratadas cerca de 200 larvas de cada progênie (F3-F5-F7-F9-F11), além do grupo controle com 24 larvas não tratadas. O ensaio foi repetido três vezes, para avaliar a frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes nas colônias.

7.5 Expressão do receptor α -glicosidase Cqm1 em larvas

A avaliação da expressão da α -glicosidase Cqm1, receptor da toxina Bin codificado pelo gene *cqm1*, foi realizada através de ensaios enzimáticos *in gel* e, cada amostra, contendo o tórax e abdômen de uma larva fresca ou armazenada à -20 °C, foi macerada em 5 μ l de tampão PBS (NaH₂PO₄ 2.1 mM, Na₂HPO₄ 14 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) e solubilizada 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%, a 20 mA de corrente e a 4 °C. Após a eletroforese, os géis foram incubados três vezes em solução aquosa de Triton X® a 2,5% por 13 minutos à temperatura ambiente. As lavagens com o Triton têm a função de remover o excesso do Tris das amostras, pois este composto é um inibidor da 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-lumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo (M9766, Sigma), durante 20 min a 37 °C, sob leve agitação. As bandas catalíticas presentes nos géis foram visualizadas em um transiluminador ultravioleta (UV) e a α -glicosidase Cqm1 migra em peso aparente de 83 kDa, sob condições semi-desnaturante, segundo Romão et al. (2006). A expressão de α -glicosidase Cqm1 foi

analisada em amostras entre 100 e 200 indivíduos das colônias parentais e da progênie da colônia IAB59-Rev.

7.6 Detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}*

Neste estudo, a resistência à toxina Bin foi avaliada pelo método de PCR alelo-específica para detectar a frequência dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* nas colônias (CHALEGRE et al., 2009). Para evitar problemas de contaminação, os procedimentos de extração de DNA, reação de PCR e separação eletroforética descritos a seguir, foram realizados em ambientes diferentes.

7.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA genômico das larvas foi realizada como descrito em Ayres et al. (2002) ou utilizando o reagente DNAzol® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, que proporcionou maior rapidez na obtenção das amostras. O DNA foi extraído individualmente da cabeça das mesmas larvas utilizadas no ensaio de expressão da α -glicosidase *in gel*.

- **Protocolo segundo Ayres et al. (2002).** A cabeça de larvas foi macerada individualmente em 400 μ L de tampão de lise (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 2 mM, pH 8,0), 7 μ L de solução de proteinase K (10 mg/ml) e 72 μ L de SDS a 10%. Cada amostra foi incubada a 65 °C, por 16 h. Após a adição de 420 μ L 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 μ L de tampão estéril TE® (Invitrogen) composto de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

- **Protocolo DNAzol® (Invitrogen).** A cabeça de larvas foi macerada individualmente em 50 µl do reagente DNAzol® e homogeneizada por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 25 µL de etanol ultrapuro, homogeneizado por 30 segundos e centrifugado a 10.000 g por 5 minutos. Em seguida, o sedimento contendo o DNA foi homogeneizado com 50 µl de etanol a 75% e centrifugado a 10.000 g por 1 minuto. O sedimento foi coletado, deixado secar por 15 segundos e recuperado em 50 µl TE® (Invitrogen).

7.6.2 Reação de PCR

Para as reações de PCR, foram utilizados dois *primers* específicos que flanqueiam a deleção de 19 nucleotídeos (posição 1334-1352) desenhados de acordo com a seqüência de cDNA do gene *cqml* (CHALEGRE *et al.*, 2009) (Figura 5).

As reações foram feitas em volume final de 25 µL contendo 0,2 nM de cada dNTP, 2,5 unidades de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), 5 µL de DNA molde e 1,6 µM de cada *primer*. Cada amostra foi amplificada usando o termociclador BIOMETRA® sob as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 3 minutos, em seguida 35 ciclos (94 °C por 50 s, 55 °C por 50 s, 72 °C por 120 s) seguido por uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador UV. Os tamanhos dos fragmentos amplificados a partir do DNA molde de indivíduos susceptíveis e resistentes à toxina Bin é de 208 e 189 pares de bases, respectivamente (CHALEGRE *et al.*, 2009). Os indivíduos heterozigotos apresentam a amplificação de ambos os fragmentos. Nas reações de PCR, o controle positivo utilizado foi o DNA molde de larvas susceptíveis e resistentes que apresentaram o alelo *cqml* e *cqml*_{REC} em homozigose, respectivamente. Os controles negativos foram uma amostra com o DNA molde do *Ae. aegypti*, a partir do qual não é possível a amplificação deste fragmento gênico, e uma amostra sem conter DNA molde.

A análise da frequência do alelo *cqml*_{REC} foi avaliada em amostras entre 100 e 200 larvas das gerações parentais e da progênie (F1, F3, F5, F7, F9 e F11), os mesmos indivíduos avaliados em relação à expressão de α -glicosidase. A partir dos dados obtidos na análise dos genótipos das larvas, as frequências observadas e esperadas foram determinadas para avaliar

se as populações estavam em equilíbrio para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}*, e o teste qui quadrado (χ^2) foi aplicado.

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 3,84, com significância de 5%.

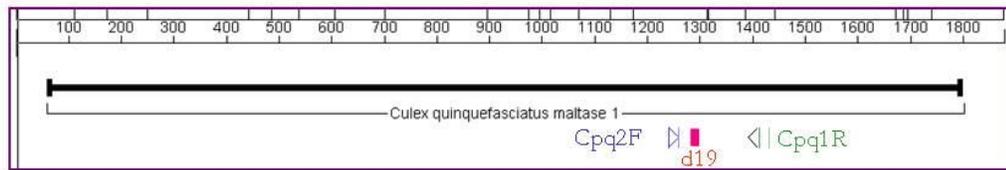


Figura 5. Gene do receptor Cqm1 da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (Bs) em *Culex quinquefasciatus*.

Nota: Cp q2F e Cp q1R são os *primers* que flanqueiam a deleção de 19 nucleotídeos neste gene que confere resistência ao Bs.

8 RESULTADOS

8.1 Desempenho biológico

A primeira etapa do estudo foi investigar se a colônia resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) apresentava diferença no desempenho biológico em relação à colônia susceptível (CqSF). Quanto à fecundidade, foi observada uma redução discreta, porém não significativa (teste T, $P = 0,49$) entre o número médio de ovos por jangada da colônia de referência de 170,8 para 166,5 da R-IAB59, a partir da avaliação de uma amostra de 44 jangadas obtidas das colônias analisadas (Tabela 2). Do total de 7.514 ovos contabilizados para colônia CqSF, houve uma redução de 180 ovos na R-IAB59 (Tabela 2). O parâmetro de fertilidade, representado pelo número médio de larvas de 1º estágio que eclodiram a partir das jangadas analisadas, também foi semelhante entre as colônias CqSF e R-IAB59 ($P = 0,79$) sendo registrada uma média de cerca de 160 larvas do 1º estágio obtida por jangada analisada (Tabela 2). O peso médio das pupas foi similar entre as colônias S e R-IAB59, sendo detectada uma média de 0,044 g para *pools* de 25 pupas machos ($P = 0,16$) e 0,07 g para *pools* de 25 pupas fêmeas ($P = 0,3$), que são morfologicamente maiores do que os machos (Tabela 2). Os resultados obtidos mostram que, em relação aos parâmetros de fecundidade, fertilidade e estado nutricional das pupas, os indivíduos da colônia R-IAB59 não apresentaram diferenças significativas, quando comparados com a colônia S. Devido à ausência de diferenças de desempenho entre as colônias parentais, as progênies da colônia IAB59-Rev não foram analisadas em relação a este parâmetro.

Tabela 2. Desempenho biológico de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (CqSF) e uma resistente ao *Bacillus sphaericus* IAB59 (R-IAB59), avaliado por parâmetros como fecundidade, fertilidade e peso médio de pupas.

Colônia	Fecundidade		Fertilidade		Peso de pupas (g) ^b			
	N° de ovos / jangada		N° L1 ^a / jangada		♂		♀	
	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP
CqSF	7.514	170,8 ± 27,4	7.103	161,4 ± 30,2	500	0,044 ± 0,003	250	0,07 ± 0,007
R-IAB59	7.328	166,5 ± 29,6	7.026	159,7 ± 30,3	500	0,043 ± 0,003	250	0,07 ± 0,005
P^c		0,49		0,79		0,16		0,30

Nota: ^aLarva de 1° estágio^bO peso foi avaliado em 20 *pools* de 25 pupas machos e em 10 *pools* de 25 pupas fêmeas.^cValores de P ≥ 0,05: não há diferença entre as médias, para o teste T de *student*.

8.2 Avaliação da susceptibilidade *in vivo*

Os bioensaios de múltiplas concentrações foram realizados para avaliar a susceptibilidade *in vivo* da progênie da colônia IAB59-Rev ao Bs, cepas IAB59 e 2362, mantidas sob condições de laboratório sem pressão de seleção.

8.2.1 Susceptibilidade ao Bs cepa IAB59

A avaliação foi feita para determinar a susceptibilidade da colônia à cepa IAB59. A colônia parental susceptível (S), analisada nesta avaliação, apresentou $CL_{50} = 0,0018$ mg/L e a colônia parental resistente (R-IAB59) mostrou que esta apresenta um elevado nível de resistência com $CL_{50} = 27,6$ mg/L e a razão de resistência (RR) foi 15.372, em relação à colônia S (Tabela 3). A RR é mais elevada utilizando a CqSF como referência (AMORIM et al., 2007).

A avaliação da colônia IAB59-Rev nas gerações F1, F3, F5, F7 e F9 foi realizada para averiguar o nível de susceptibilidade ao Bs IAB59, resultante do acasalamento entre indivíduos susceptíveis e resistentes. A CL_{50} observada na geração F1 (0,372 mg/L) mostrou uma grande redução com $RR = 206,7$, cerca de 70 vezes menor do que a estimada para a R-IAB59 (Tabela 3). A colônia foi mantida até a F11 e, as análises feitas nas gerações anteriores (F3, F5, F7 e F9) mostraram valores variáveis de CL_{50} , com RR entre 22,8 e 66,7 que se manteve em um patamar baixo, embora mais elevada do que a CL_{50} para a colônia S (Tabela 3). A CL_{90} mostrou uma diferença de comportamento em relação à CL_{50} , pois a redução em relação à parental resistente foi discreta e um elevado nível de RR foi mantido em todas as gerações (Tabela 3). Em alguns casos, a curva de dose-mortalidade obtida não foi adequada para a determinação da CL_{90} pelo programa SPSS 8.0 e o valor foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva. Isto ocorreu devido à composição heterogênea de indivíduos susceptíveis e resistentes nas progênies, como será demonstrado na análise descrita no item 8.3.

Tabela 3. Atividade do *Bacillus sphaericus* (Bs) cepa IAB59 para larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e das progênes (F1-F9) resultantes do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.

Geração	Nº de ensaios	Nº de larvas	CL ₅₀ (IC 95%) ^a	RR CL ₅₀ ^b	CL ₉₀ (IC 95%) ^a	RR CL ₉₀ ^b
S	3	1.140	0,0018 (0,0013 – 0,0034)	1	0,014 (0,0061 – 0,31)	1
R-IAB59	3	640	27,6 (22,5 – 34,7)	15.372	98,7 (69,6 – 164,3)	7.050
F1	3	1.120	0,372 (0,18 – 0,78)	206,7	17,5 (14,9 – 93)	1.250
F3	3	1.080	0,063 (0,061 – 0,78)	35,0	~ 36,0 ^c	2.571
F5	3	840	0,041 (0,008- 0,4)	22,8	~ 12,0 ^c	857,1
F7	3	1.000	0,07 (0,034 – 0,17)	38,9	18,4 (5,1 – 368,6)	1.314
F9	2	600	0,12 (0,06 – 0,23)	66,7	52,6 (11,3 – 582,9)	3.057

Nota:^a Concentração letal (mg/L) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas tratadas após 48 h e, intervalo de confiança (IC) de 95%.

^b RR: Razão de resistência entre a CL para a colônia sob estudo e a respectiva CL para a colônia S.

^c O valor da LC₉₀ foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva de dose-mortalidade.

8.2.2 Susceptibilidade ao Bs cepa 2362

As colônias S e R-IAB59 foram avaliadas em relação a sua susceptibilidade ao Bs 2362 e, como esta cepa apresenta apenas a toxina Bin como fator tóxico, a colônia R-IAB59 apresenta um elevado nível de resistência cruzada ao Bs 2362 (AMORIM et al., 2007). A CL_{50} para a colônia parental susceptível (S) foi de 0,032 mg/L (Tabela 4), enquanto que a R-IAB59 apresentou uma RR 8.778 vezes maior, indicando o elevado nível de resistência à toxina Bin do Bs 2362 (Tabela 4).

A susceptibilidade da colônia IAB59-Rev ao Bs 2362 foi verificada ao longo das gerações. Na primeira progênie analisada, a F3, houve uma queda da CL_{50} e a RR foi de 74,3, cerca de 120 vezes inferior à RR da colônia R-IAB59. Nas gerações subsequentes da IAB59-Rev, F5, F7 e F9, a RR mostrou valores baixos e a CL_{50} para o Bs 2362 atingiu valores similares ao observado para a parental S (Tabela 4). Como mencionado no item anterior, devido à composição heterogênea das progênies o valor da CL_{90} foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva de dose-mortalidade (Tabela 4). Na progênie F3 houve uma queda da CL_{90} e a RR foi estimada como sendo superior a 450 e, ao longo das demais gerações os valores se mantiveram elevados (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade do *Bacillus sphaericus* (Bs) cepa 2362 para larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e de suas progênes (F1-F9) resultante do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.

Geração	Nº de ensaios	Nº de larvas	CL ₅₀ ^a (IC 95%)	RR ^b CL ₅₀	CL ₉₀ ^a (IC 95%)	RR ^b CL ₉₀
S	3	1.140	0,032 (0,016 – 0,066)	1	0,136 (0,083 – 0,371)	1
R-IAB59	2	560	280,9 (85,1 – 585,6)	8.778	491,1 (315,8 – 2.020,8)	3.611
F1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F3	2	560	2,38 (0,97 – 11,3)	74,3	> 60,0 ^c	> 450,0
F5	3	640	1,15 (0,31- 22,9)	35,9	> 100,0 ^c	> 735,0
F7	2	600	0,086 (0,03 – 0,2)	2,68	49,7 (11,4 – 493)	365,0
F9	2	600	0,067 (0,03 – 0,1)	2,9	> 50,0 ^c	> 366,0

Nota: ^a Concentração letal (mg/L) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas tratadas após 48 h.

^b RR: Razão de resistência entre a CL para a colônia sob estudo e àquela para a colônia S.

^c O valor da LC₉₀ foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva dose-mortalidade.

ND: Não determinado.

8.3 Frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes

Os dados da frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes nas colônias parentais e progênes da colônia IAB59-Rev foram obtidos por bioensaios de dose diagnóstica, pela expressão do receptor Cqml e pela análise da frequência dos alelos *cqml* e *cqml_{REC}* e estão descritos nas seções a seguir.

8.3.1 Bioensaio dose diagnóstica

Os indivíduos que sobreviveram aos bioensaios dose diagnóstica foram considerados resistentes, pois a concentração letal (CL) utilizada foi cerca de 1.000 vezes maior do que a CL₉₀ para larvas da colônia susceptível. A colônia parental S foi avaliada e 100% dos indivíduos mostraram fenótipo susceptível (Figura 6, Tabela 5). A colônia parental R-IAB59 apresentou 96% de indivíduos que sobreviveram aos bioensaios, comprovando o fenótipo de resistência à toxina Bin que caracteriza esta colônia (Figura 6, Tabela 5). A análise das progênes da colônia IAB59-Rev mostrou frequências de indivíduos susceptíveis e resistentes que variaram de 45 a 55% em cerca de 600 L4 analisadas por geração (Figura 6, Tabela 5). Cada geração mostrou estar constituída por indivíduos susceptíveis e resistentes na proporção de 1:1 que, apesar de algumas variações, manteve-se estável até a F11 (Tabela 5). Não foi observado um aumento de indivíduos com fenótipo susceptível nestas progênes, mantida sob condições de laboratório, sem pressão de seleção ao biolarvicida.

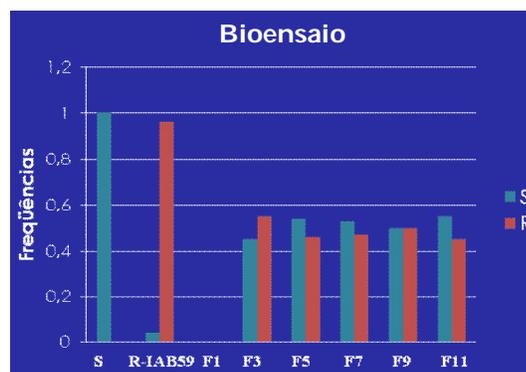


Figura 6. Frequência de larvas de *Culex quinquefasciatus* susceptível (S) e resistente (R) ao *Bacillus sphaericus* (Bs) em amostras das gerações parentais (S e R-IAB59) e progênes da colônia IAB59-Rev, submetidas ao bioensaio com uma dose letal do Bs.

8.3.2 Expressão do receptor α -glicosidase Cqm1 em larvas

Os ensaios da atividade da α -glicosidase *in gel* foram realizados para avaliar a expressão do receptor Cqm1 em amostras individuais de larvas das colônias parentais S e R-IAB59 e nas progênies (F1, F3, F5, F7, F9 e F11) da colônia IAB59-Rev. As larvas susceptíveis mostraram um perfil reprodutível de quatro bandas catalíticas, dentre elas a α -glicosidase Cqm1 que migra com peso aparente de 83 kDa, sob condições semi-desnaturantes (Figura 7, S). Larvas resistentes à toxina Bin, que portam o alelo *cqm1*_{REC} em homozigose, apresentaram um perfil similar ao de larvas sensíveis, exceto pela ausência da banda catalítica correspondente à α -glicosidase Cqm1 (Figura 7, R).

Na colônia S, a totalidade de indivíduos analisados apresentou a α -glicosidase Cqm1, ao contrário do observado para R-IAB59 cuja frequência do receptor foi de 0,03, pois apenas nove larvas dentre 287 analisadas apresentaram a expressão da α -glicosidase Cqm1 (Figura 8, Tabela 5). A frequência de larvas que expressaram a α -glicosidase Cqm1 nas gerações F1, F5, F7, F9 e F11 variou entre 0,42 e 0,58 nas amostras com cerca de 150 indivíduos (Figura 8, Tabela 5). Na F3, foi registrada a menor frequência do Cqm1 e os dados diferiram das demais gerações (Figura 8, Tabela 5). Os dados desta avaliação corroboram os dados da frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes ao Bs 2362, obtida pelos bioensaios de dose diagnóstica, com algumas variações e apenas na F3 esses dados são diferentes.

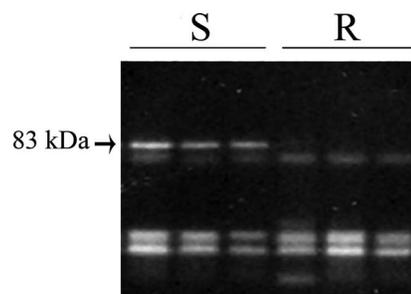


Figura 7. Detecção de α -glicosidases (EC 3.2.1.20) em extratos individuais de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Nota: As amostras foram submetidas à SDS-PAGE a 8% sob condições semidesnaturantes, os géis foram incubados com o substrato a 37 °C por 20 min e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. A banda catalítica correspondente à α -glicosidase Cqm1 de 83 kDa está presente em amostras de larvas susceptíveis (S) e ausente em larvas resistentes ao *Bacillus sphaericus* (R). Fonte: Modificada de Chalegre et al., 2009.

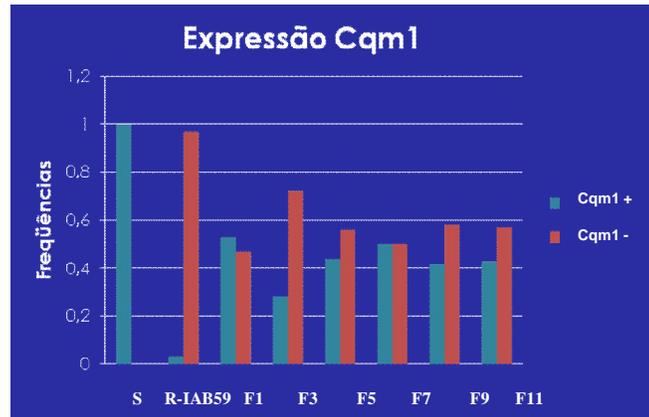


Figura 8. Frequência da expressão da α -glicosidase Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* em amostras das gerações parentais, susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao *Bacillus sphaericus*, e progênie da colônia IAB59-Rev, resultante do cruzamento das parentais.

8.3.3 Frequência dos alelos *cqml* e *cqml_{REC}*

A aplicação da PCR específica para os alelos *cqml* e *cqml_{REC}* mostrou que foram amplificados fragmentos de tamanhos diferentes a partir do DNA genômico de larvas sensíveis e resistentes. Em cada reação, as amostras controle confirmaram os resultados esperados: controle positivo, contendo DNA molde de larvas S para amplificação do fragmento de 208 pb (Figura 9, S); controle positivo, contendo DNA molde de larvas R para amplificação do fragmento de 189 pb (Figura 9, R); controle negativo contendo DNA do *A. aegypti* que não permite a amplificação (Figura 9, Ae) e controle negativo sem DNA molde (Figura 9, -). As larvas da colônia S apresentaram o alelo *cqml* em homozigose e o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 208 pb (Figura 9, a), enquanto que as larvas da colônia R apresentaram fragmentos de 189 pb amplificados a partir do alelo *cqml_{REC}* em homozigose (Figura 9, b). Os indivíduos heterozigotos foram caracterizados pela amplificação dos dois fragmentos a partir dos alelos *cqml* e *cqml_{REC}* (Figura 9, c).

Na análise da colônia S, seis larvas apresentaram o alelo *cqml* em heterozigose, dentre 486 indivíduos, demonstrando a baixa frequência do alelo *cqml_{REC}* (0,0061) (Figura 10, Tabela 5). Na colônia R-IAB59 foram avaliados 106 indivíduos, com 105 homozigotos para o alelo *cqml_{REC}* resultando em elevada frequência deste alelo (Figura 10, Tabela 5). A análise dos genótipos nas mesmas amostras de larvas das progênies avaliadas previamente pelo

ensaio de α -glicosidase mostrou uma correlação direta entre os dados destes ensaios (Tabela 5). Os indivíduos S, homozigotos para o alelo *cqm1* ou heterozigotos, expressaram a α -glicosidase Cqm1 e, os indivíduos R, homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}*, foram caracterizados pela ausência desta molécula.

Os genótipos nas progênes analisadas, representaram cerca de 42-58% dos indivíduos susceptíveis de cada geração, sendo composta por homozigotos e sobretudo por heterozigotos (Figura 10, Tabela 5). A F3 apresentou resultados em acordo com aqueles observados na expressão do receptor Cqm1, embora as frequências observadas nesta geração tenham sido diferentes das demais (Figura 10, Tabela 5). Os dados desta análise do genótipo para o locus do gene *cqm1* corroboram os dados dos bioensaios diagnósticos e a frequência da α -glicosidase Cqm1, e mostram que a frequência de larvas resistentes é mantida entre 42-58% nas progênes. A frequência do alelo *cqm1_{REC}* variou de 0,65 a 0,83 e manteve-se elevada até a F11, quando o valor foi de 0,74 (Figura 10, Tabela 5).

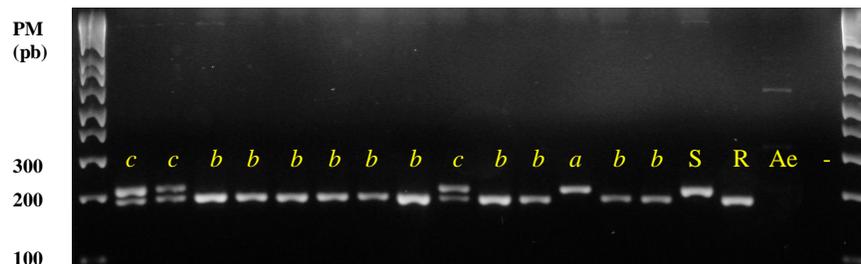


Figura 9. Separação eletroforética de fragmentos amplificados por PCR a partir dos alelos do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus*.

Nota: Indivíduos susceptíveis (S) homozigotos para o alelo *cqm1* (a), resistentes (R) homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}* (b) e heterozigotos (c) que apresentaram ambos os fragmentos de 208 e 189 pares de base (pb), respectivamente. Os controles positivos foram: DNA molde de larvas S para amplificação do fragmento de 208 pb (S) e DNA molde de larvas R para amplificação do fragmento de 189 pb (R). Os controles negativos foram: DNA do *Aedes aegypti* (Ae) e o outro sem DNA molde (-). Gel de agarose a 2,5% visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. **PM:** peso molecular em pb.

Nesta avaliação é importante ressaltar que, dentre as amostras analisadas nos ensaios de frequência da α -glicosidase Cqm1 e dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}*, cerca de 15% de indivíduos de cada geração, não apresentaram a correlação esperada (Tabela 6). Dentre estes, a maioria das inconsistências mostram indivíduos com o genótipo resistente, mas que apresentam a expressão do receptor Cqm1 (Tabela 6). E cerca de 30% dos casos foi representado por larvas heterozigotas, que não apresentaram a α -glicosidase Cqm1 (Tabela 6).

Em todas as progênies analisadas foram observadas inconsistências e que necessitam ser investigadas.

As colônias parentais S e R-IAB59 estão em equilíbrio para o gene *cqm1* (Tabela 7). A análise das frequências genótípicas observadas e esperadas dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* mostrou que a colônia IAB59-Rev em alguns momentos está em equilíbrio populacional para o gene *cqm1* nas progênies analisadas, e nas gerações F3, F5 e F7 o equilíbrio não foi alcançado, visto que o número de indivíduos homocigotos susceptíveis observado é maior do que o esperado e, o número de heterocigotos observado é bem menor do que o esperado (Tabela 7).

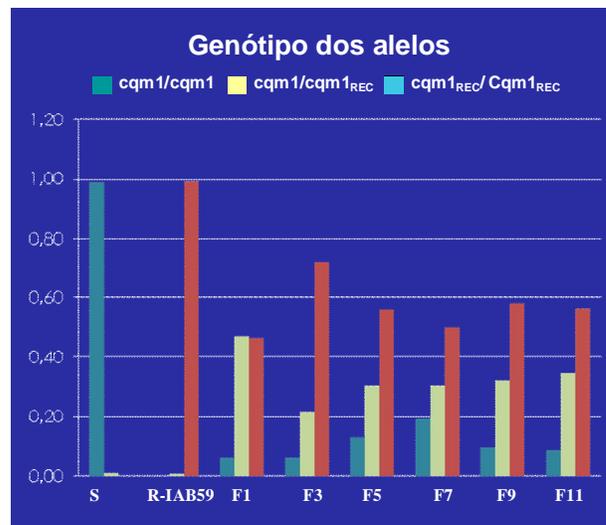


Figura 10. Frequência dos genótipos para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* em larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia parental susceptível (S) e resistente (R-IAB59) ao *Bacillus sphaericus* e da progênie da colônia IAB59-Rev.

Tabela 5 – Avaliação da frequência de larvas de *Culex quinquefasciatus* susceptíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus* (Bs) por ensaios de susceptibilidade *in vivo* ao Bs 2362, expressão da α -glicosidase Cqm1 e reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para detecção dos alelos *cqm1/cqm1_{REC}*. Foram analisadas as gerações parentais susceptível (S) e resistente ao Bs (R-IAB59), bem como as progênies (F1, F3, F5, F7, F9 e F11) resultantes do cruzamento de indivíduos destas colônias na proporção de 1:1.

Geração	Susceptibilidade ao Bs			Expressão Cqm1			Detecção dos alelos <i>cqm1/cqm1_{REC}</i>				
	Frequência			Frequência			Genótipo				
	N	S	R	N	S	R	N	<i>cqm1</i> <i>cqm1</i>	<i>cqm1</i> <i>cqm1_{REC}</i>	<i>cqm1_{REC}</i> <i>cqm1_{REC}</i>	Frequência <i>cqm1_{REC}</i>
S	720	1	0	374	1	0	492	486	6	0	0,0061
R-IAB59	576	0,04	0,96	287	0,03	0,97	106	0	1	105	0,99
F1	ND	ND	ND	159	0,53	0,47	159	10	75	74	0,70
F3	648	0,45	0,55	129	0,28	0,72	129	8	28	93	0,83
F5	617	0,54	0,46	144	0,44	0,56	144	19	44	81	0,73
F7	624	0,53	0,47	135	0,50	0,50	135	26	41	68	0,65
F9	657	0,50	0,50	115	0,42	0,58	115	11	37	67	0,74
F11	576	0,55	0,45	69	0,43	0,57	69	6	24	39	0,74

Nota: N = n° de larvas de 4º estágio.

Tabela 6 – Descrição de amostras de indivíduos que apresentaram inconsistência entre o genótipo para os alelos *cqm1/cqm1_{REC}* e o fenótipo relativo à expressão do receptor Cqm1 em larvas de *Culex quinquefasciatus* nas progênes F1, F3, F5, F7, F9 e F11 da colônia IAB59-Rev. O genótipo dos alelos do gene *cqm1* e a expressão do receptor Cqm1 foram determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica e ensaio de α -glicosidase em gel, respectivamente.

Geração	N	Inconsistências		<i>cqm1_{REC}/cqm1_{REC}, Cqm1 +</i>		<i>cqm1/cqm1_{REC}, Cqm1 -</i>	
		N ^a	%	N ^a	%	N ^a	%
F1	180	21	11,67	14	67	7	33
F3	149	20	13,42	11	55	9	45
F5	170	26	15,29	16	62	10	38
F7	168	33	19,64	25	76	8	24
F9	140	25	17,85	19	76	5	24
F11	84	15	17,44	10	67	5	33

Nota: ^a Número de indivíduos que apresentaram inconsistências entre o genótipo e o fenótipo e que foram excluídos do n amostral da Tabela 5.

Tabela 7 – Frequências genótípicas observadas (O) e esperadas (E) para os alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* em larvas de *Culex quinquefasciatus* de indivíduos susceptíveis (S) e resistentes ao *Bacillus sphaericus* (R-IAB59), e nas progênes F1, F3, F5, F7, F9 e F11 da colônia IAB59-Rev.

Geração	<i>cqm1/cqm1</i>		<i>cqm1/cqm1_{REC}</i>		<i>cqm1_{REC}/cqm1_{REC}</i>		Teste χ^2
	O	E	O	E	O	E	
S	486	486,1	6	5,86	0	0,02	0,00
R-IAB59	0	0	1	1,05	105	104,9	0,00
F1	10	15,95	82	71,00	74	79,00	4,24
F3	8	3,72	28	57,82	93	86,74	20,74
F5	19	10,50	44	56,80	81	76,70	10,00
F7	26	16,53	41	61,42	68	57,04	14,32
F9	11	7,77	37	44,25	67	62,97	2,78
F11	6	4,66	24	26,55	39	37,79	0,67

Nota: 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 genótípicas *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. Obs. Os dados são dos genótipos sem as inconsistências junto ao fenótipo (Tabela 4).

9 DISCUSSÃO

A resistência de insetos a inseticidas pode estar associada a um custo no desempenho biológico e, no presente estudo, este foi o primeiro aspecto avaliado em relação à colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus* (Bs) IAB59 (R-IAB59). Os resultados obtidos mostraram que não houve redução significativa do desempenho dos indivíduos da colônia R-IAB59, quando comparado com a colônia susceptível (CqSF), em relação aos parâmetros de fecundidade, fertilidade e estado nutricional das pupas. Oliveira e colaboradores (2003) também não observaram diferenças na fecundidade dos indivíduos da colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs cepa 2362. Porém, Rodcharoen e Mulla (1997) mostraram que houve uma diminuição do número médio de 146 ovos por jangada na colônia susceptível para 112 em uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs cepa 2362. Quanto à fertilidade, nosso estudo mostrou uma taxa de eclosão larval de aproximadamente 95% para ambas as colônias, em concordância com o estudo de Oliveira et al. (2003) cujas diferenças também não foram significativas. Os dados da redução da fecundidade obtidos por Rodcharoen e Mulla (1997) também foram discordantes do nosso, visto que a taxa de eclosão das larvas susceptíveis foi de 90,9%, e das resistentes a eclosão foi de apenas 47,9%.

O peso médio de pupas foi avaliado para inferir o estado nutricional do inseto, pois este parâmetro pode influenciar a duração do ciclo biológico. Neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as colônias CqSF e R-IAB59. Janmaat e Myers (2003) observaram uma diminuição de 20 e 50%, respectivamente, do peso médio de pupas e larvas de primeiro estágio de uma colônia do lepidóptero *Trichoplusia ni* resistente ao *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bourguet et al. (2004) avaliaram em populações de *C. pipiens* resistentes a inseticidas organofosforados os efeitos pleiotrópicos da resistência. As populações que apresentaram alelos de resistência (acetilcolinesterase, *ace-1*) mostraram um aumento do tempo de desenvolvimento das formas jovens e uma redução do tamanho das asas dos adultos. A resistência de algumas espécies, como de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), à toxina Cry1Ac do Bt, está associada a um elevado custo biológico impedindo, inclusive, a sua manutenção em laboratório sendo necessário, em alguns estudos, introduzir indivíduos susceptíveis na colônia para evitar a sua extinção (ANILKUMAR et al., 2008; ANILKUMAR; PUSZTAI-CAREY; MOAR, 2008). Os parâmetros utilizados no nosso estudo, apesar de importantes para avaliar o desempenho da colônia resistente, não foram

suficientes para afirmar a completa ausência de custo biológico associado à resistência, a avaliação de outros parâmetros como tempo geracional, duração do ciclo de desenvolvimento, quantidade de ciclos gonadotróficos, longevidade, entre outros, seriam necessários para descartar tal possibilidade. Oliveira et al. (2003) observaram que, apesar dos parâmetros de fecundidade e fertilidade da colônia resistente ao Bs cepa 2362 não terem sido afetados, o tempo de desenvolvimento dos indivíduos resistentes foi cerca de 4 dias maior do que a média (23,7 dias) observada para os susceptíveis. Embora o custo biológico da resistência de *Culex* à toxina Bin não tenha sido exaustivamente avaliado neste trabalho, o conjunto de dados obtidos apontam que, comparando com outros relatos, a colônia R-IAB59 não apresenta uma redução evidente do seu desempenho e, como consequência, tem sido mantida em laboratório há alguns anos (AMORIM et al., 2007).

O caráter recessivo da resistência das larvas de *C. quinquefasciatus* ao Bs pode favorecer o manejo da resistência e, neste contexto, a introdução de indivíduos susceptíveis na população resultaria na redução da frequência dos alelos de resistência. A susceptibilidade das gerações parentais e das progênies da colônia IAB59-Rev para o Bs (cepas IAB59 e 2362) foi avaliada a partir das concentrações letais para 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) determinadas por bioensaios. Os dados de susceptibilidade ao Bs IAB59 mostram que, após o cruzamento, a CL_{50} para as progênies diminuiu e mostrou uma redução do nível de resistência, que se manteve ao longo das gerações. A CL_{90} sofreu uma redução discreta em relação à colônia parental e a RR manteve-se elevada, indicando a presença de grande número de larvas resistentes, o que foi confirmado posteriormente pela análise da frequência de larvas resistentes, pelos três métodos utilizados. Os dados dos bioensaios da susceptibilidade à cepa 2362 apresentaram um comportamento semelhante, havendo uma redução importante da RR calculada a partir da CL_{50} que ficou próxima à CL para a colônia parental susceptível, e houve uma redução discreta das RR para a CL_{90} . A importante redução da CL_{50} ocorreu devido à presença de cerca de 45-55% de larvas susceptíveis nas progênies obtida após o cruzamento, graças à herança recessiva da resistência ao Bs IAB59 e 2362 (AMORIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). A CL_{90} foi um parâmetro que mostrou, com maior fidelidade, o fenótipo das progênies, revelando um grande contingente de larvas resistentes, ao contrário da CL_{50} que apresentou valores mais próximos à CL_{50} para a colônia parental S. Em alguns casos, os dados de CL_{90} foram obtidos a partir da observação direta da curva de dose-mortalidade devido à composição heterogênea de larvas nas amostras que apresentou uma distribuição dos percentuais de mortalidade (15 e 100%) em um amplo intervalo de concentrações.

O monitoramento da resistência pela comparação dos valores de CL_{50} e CL_{90} mostrou limitações e, por esta razão, foram realizados bioensaios diagnósticos para determinar a frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes na progênie da colônia IAB59-Rev. A análise a partir de uma concentração diagnóstica do Bs 2362 mostrou uma composição de 45-55% de indivíduos susceptíveis e resistentes em todas as gerações o que auxiliou a interpretação dos valores das CLs obtidas nos bioensaios de múltiplas concentrações. Os dados desta análise também confirmaram que os indivíduos heterozigotos são susceptíveis à toxina Bin e a resistência é recessiva, conforme demonstrado em estudos prévios (AMORIM et al. 2007). A utilização deste ensaio para determinar a frequência de indivíduos resistentes é de grande importância, pois este é o principal fator que determina a evolução da resistência numa população de insetos (GÉNISSEL et al., 2003; TABASHINIK et al., 2000; WENES et al., 2006).

No manejo da resistência de insetos às toxinas Cry das plantas transgênicas, por exemplo, o monitoramento da frequência de indivíduos resistentes ou de genes de resistência, é uma avaliação obrigatória em vários países que adotaram esta tecnologia (TABASHINIK et al., 2004, 2005, 2008; WENES et al., 2006). O monitoramento desta frequência é comumente realizado por bioensaios diagnósticos utilizando o método de “F2 screen” que consiste em coletar fêmeas de campo acasaladas, manter a progênie F1 e submeter os neonatos da geração F2 à avaliação da susceptibilidade e fazer inferências quanto à frequência do alelo de resistência a partir da análise estatística dos dados obtidos (ANDOW; ALSTAD, 1998). Entretanto, é importante salientar que nestes bioensaios é difícil estimar a frequência de alelos de resistência recessivos, pois a frequência de indivíduos resistentes é muito baixa e, em consequência, é necessário analisar uma grande amostra de indivíduos. Além disso, não é possível detectar heterozigotos para o alelo de resistência por este método, pois estes indivíduos não sobrevivem à concentração diagnóstica.

Outra ferramenta diagnóstica, o ensaio enzimático que detecta a expressão da α -glicosidase Cqm1, mostrou uma composição majoritária de indivíduos que expressaram o receptor Cqm1 na parental S, enquanto que na parental R-IAB59 predominaram indivíduos que não expressam esta molécula. A análise nas amostras das gerações da IAB59-Rev mostrou uma correlação direta com a frequência de indivíduos S e R obtidas nos ensaios *in vivo* de dose diagnóstica, com valores entre 42 e 58%. Os dados mostram que a avaliação da expressão do receptor Cqm1 pode ser utilizada para o diagnóstico de larvas que tenham como mecanismo a ausência do sítio-alvo da toxina Bin, associada a qualquer alelo de resistência. Semelhante ao bioensaio dose diagnóstica, este método não discrimina os indivíduos

heterozigotos na população. Neste contexto, a análise PCR alelo-específica foi extremamente útil, pois revelou o genótipo dos indivíduos analisados que não puderam ser determinados pelos métodos anteriores. A frequência do alelo *cqm1_{REC}*, nas colônias parentais S e R-IAB59 foi 0,006 e 0,995, respectivamente, refletindo os fenótipos resistente e susceptível destas colônias. O alelo *cqm1_{REC}* permaneceu com uma frequência elevada após 11 gerações, graças à presença de cerca de 50% de indivíduos homozigotos resistentes e 30% de heterozigotos. A grande vantagem deste método foi a capacidade de detectar diretamente a frequência do alelo resistente nas amostras. A resistência nesta colônia é herdada como um caráter recessivo (AMORIM et al., 2007) portanto, de difícil detecção, porém ao utilizar a técnica de PCR foi possível diagnosticar o alelo *cqm1_{REC}*, cuja presença não tinha sido diretamente evidenciada pelos demais ensaios.

As incoerências observadas em relação à correlação entre o genótipo para o gene *cqm1* e o fenótipo para expressão do receptor Cqm1 não parecem ser artefatos, visto que foram observados em todas as gerações analisadas. No caso mais frequente, de indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}* e que expressam o receptor, é possível sugerir que outros alelos poderiam codificar a α -glicosidase Cqm1. Uma análise de seqüência do gene *cqm1* de uma população de *C. quinquefasciatus* mostrou um terceiro alelo, diferente dos alelos *cqm1/cqm1_{REC}*, indicando que outros alelos poderiam estar envolvidos na expressão da α -glicosidase Cqm1 (CHALEGRE, 2008). No segundo caso, a hipótese para explicar os indivíduos heterozigotos que não expressam a α -glicosidase é que esta expressão poderia ocorrer abaixo do esperado. Entretanto, vale ressaltar que os demais heterozigotos analisados apresentaram uma banda de igual intensidade aos indivíduos susceptíveis com genótipo homozigoto. Avaliações mais detalhadas devem ser realizadas para a compreensão destes aspectos bem como para a produção de novos conhecimentos acerca do modelo estudado.

Os resultados deste trabalho mostram que foi possível avaliar o status de resistência de forma precisa através de bioensaios de dose diagnóstica, da avaliação do fenótipo para a α -glicosidase Cqm1 e da detecção direta do alelo de resistência. A associação das ferramentas moleculares aos bioensaios teve grande importância na caracterização da resistência, sobretudo a PCR que apresenta uma enorme vantagem por sua capacidade de detecção precoce dos indivíduos heterozigotos. Esta avaliação também demonstrou de forma clara que, mesmo após 11 gerações na ausência de pressão de seleção, a frequência do alelo *cqm1_{REC}* manteve-se estável, nas condições avaliadas, diferente de outros estudos em que os alelos de resistência têm sua frequência reduzida, pois são desfavorecidos nesta situação por estarem associados ao custo biológico (GASSMAN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009;

TABASHINIK et al., 1994; WILSON et al., 2007). O estudo da resistência da colônia de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) ao Bt, mostrou que o alelo de resistência estaria relacionado a um custo biológico, diminuindo a longevidade dos adultos resistentes (TABASHINIK et al., 1994). Como mencionado anteriormente, a evidente dificuldade observada na seleção de resistência de *Helicoverpa zea* ao Bt é frequentemente associada a elevado custo biológico observado nas colônias (ANILKUMAR; PUSZTAI-CAREY; MOAR, 2008). Em outros modelos, como na análise da reversão da resistência de populações de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) ao pyriproxyfen, análogo do hormônio juvenil, também foi observado um custo biológico associado à resistência com diminuição de 20% da taxa de sobrevivência das pupas, além do aumento de cerca de 3 dias do ciclo de desenvolvimento do inseto (WILSON et al., 2007). É importante ressaltar que, mesmo nestes casos em que reversão da resistência foi observada e houve uma redução da frequência de indivíduos resistentes devido ao custo biológico ou fluxo gênico, dados experimentais e modelos estatísticos apontam que um processo de re-seleção pode aumentar rapidamente a frequência deste alelo (TABASHINIK et al., 1994; WILSON et al., 2007).

No nosso estudo, a análise preliminar indica que o alelo de resistência *cqm1_{REC}* parece não estar associado ao custo biológico, que seria um fator crítico para provocar sua redução na ausência de pressão de seleção e, a ausência de custo biológico corrobora os dados que mostram a manutenção do alelo na progênie sob esta condição. Em um estudo anterior, a reversão da resistência de uma população de *C. quinquefasciatus* ao Bs 2362 foi observada, porém, sob condições distintas, pois a população analisada apresentava uma baixa razão de resistência ($RR \approx 10$) e estava submetida a fatores de dinâmica populacional e ambiental que certamente tiveram um papel fundamental neste processo (SILVA-FILHA; REGIS, 1997).

Os dados observados no nosso modelo poderiam ser analisados a luz de estudos recentes que demonstram que alguns alelos de resistência podem estar presentes em uma frequência detectável em populações que nunca tiveram contato com o agente de controle, contrariando a tese de que tais alelos são raros e de difícil detecção (CHALEGRE et al., 2009; BOURGUET et al., 2003; GÉNISSEL et al. 2003). Estes achados deram subsídio à hipótese de que alguns alelos de resistência podem ocorrer como polimorfismos balanceados na população, ou seja, a seleção contra e a favor do alelo seria igual e desta forma a mutação pode ser mantida na população. Por esta razão, estes genes não estariam associados a importantes efeitos negativos no desempenho biológico dos indivíduos, e podem estar presentes em frequências detectáveis na população, mesmo na ausência de pressão de seleção (FRENCH-CONSTANT, 2006). Os dados obtidos em nosso trabalho apresentam pontos em

comum com esta hipótese, pois, um estudo anterior mostrou que a atividade da α -glicosidase total de larvas resistentes e susceptíveis é igual, indicando que as larvas resistentes produzem outras α -glicosidases, além da *Cqm1* e que não haveria uma deficiência desta molécula (ROMÃO et al., 2006). Este dado pode explicar, parcialmente, a ausência de um custo biológico associado à resistência ao Bs e a estabilidade da frequência do respectivo alelo na ausência de pressão de seleção.

Os resultados obtidos neste estudo sobre a recuperação da susceptibilidade e a frequência dos genes que conferem esta resistência são importantes para definir estratégias de manejo da resistência, como a utilização de outro entomopatógeno para diminuir a frequência desses genes. O alelo *cqm1_{REC}* possivelmente não confere custo biológico nas populações resistentes e pode manter-se na população, caso não haja estratégias adequadas para a diminuição de sua frequência e/ou fatores populacionais e ambientais que favoreçam a sua redução, o que é, de certa forma, um aspecto desfavorável para recuperação da susceptibilidade pela simples interrupção do uso do patógeno em condições de campo.

10 CONCLUSÕES

- A resistência de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* (Bs) cepa IAB59 associada ao alelo *cqm1_{REC}* aparentemente não acarreta custo biológico, em relação à fecundidade, fertilidade e peso de pupas.
- A introdução de indivíduos susceptíveis na colônia resistente (IAB59-Rev) leva à diminuição das concentrações letais (CL) e a uma significativa queda do nível de resistência.
- A avaliação de CL₉₀ do Bs mostrou ser um parâmetro mais sensível do que a CL₅₀ para indicar a presença de indivíduos resistentes na população.
- Os dados de bioensaio diagnóstico, da expressão da α -glicosidase Cqm1 e da PCR-específica para o alelo *cqm1_{REC}* mostraram uma alta correlação e são ferramentas valiosas para a análise da resistência do *Culex* ao Bs.
- O alelo *cqm1_{REC}* se manteve estável na colônia na ausência de pressão de seleção e é possível que este alelo poderia ser um polimorfismo balanceado na população .
- O aumento da frequência do alelo *cqm1_{REC}* requer estratégias de manejo para a sua redução visto que este pode ser mantido na colônia, pois não parece estar associado a custo biológico, de acordo com os parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- ACTION NATURE. **Classe Hexapoda** – Insectes. 1 fotografia. Disponível em: <<http://sxm.fauna.free.fr/Bugs/i-Culex-quinquefasciatus.jpg>>. Acesso em: 12 dez. 2008.
- AGNEW, P. et al. Parasitism increases and decreases the cost of insecticide resistance in mosquitoes. **Evolution**, Colorado, v. 58, n. 3, p. 579-586, 2004.
- ALEXANDER, B.; PRIEST, F. G. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, p. 367-376, 1990.
- AMIN, A. M.; WHITE, G. B. Relative fitness of organophosphate-resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 74, p. 591-598, 1984.
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* IAB59 needs long term selection pressure. **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 155-160, 2007.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 91, p. 755-758, 1998.
- ANILKUMAR, K. J. et al. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 2, p. 462-469, Jan. 2008.
- ANILKUMAR, K. J.; PUSZTAI-CAREY, M. ; MOAR, W. J. Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Noctuidae) : a factor countering selection for resistance to Bt cotton? **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 101, n. 4, p. 1421-1431, Aug. 2008.
- AQUINO-DE-MURO, M.; MITCHELL, W. J.; PRIEST, F. G. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, p. 1159-1166, 1992.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

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

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

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

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

BECKER, N. et al. Role of larval cadavers in recycling processes of *Bacillus sphaericus*. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 11, n. 3, p. 329-334, 1995.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. New York: Klumer Academic/Plenum Publisher, 2003. cap. 11, p. 345-375.

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

BERTICAT, C. et al. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens*. **Genetical Research**, London, v. 79, n. 1, p. 41-47, 2002.

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*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 7, p. 1225-1233, 2003.

BOURGUET, D. et al. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, Colorado, v. 58, n. 1, p. 128-135, 2004.

BRADLEY, D. J. The particular and general. Issues of specificity and verticality in the history of malaria control. **Parassitologia**, Roma, v. 40, p. 5-10, 1998.

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

BUZDIN, A. A. et al. Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemistry**, Moscou, v. 67, n. 5, p. 540-546, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (EUA). **Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control**. 3ª ed. Colorado, 2003. 80 p. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/publications.htm>>. Acesso: 12 mar. 2007.

CHALEGRE, K. D. M. **Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao biolarvicida *Bacillus sphaericus***. 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.

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

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

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

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

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994. 225 p.

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

- DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 981-990, 2001.
- DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.
- DARBOUX, I. et al. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-involved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007.
- DAVIDSON, E. W.; MYERS, P. Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 10, p. 261-265, 1981.
- DE BARJAC, H.; VÉRON, M.; COSMAO DUMANOIR, V. Caractérisation biochimique et sérologique des souches de *Bacillus sphaericus*, pathogènes ou non pour les moustiques. **Annales de l'Institut Pasteur - Microbiologie**, Paris, v. 13B, p. 191-201, 1980.
- DE BARJAC, H. et al. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity to larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 12, p. 85-90, 1985.
- DE BARJAC, H. et al. Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae: serotype H6. **Annales de l'Institut Pasteur - Microbiologie**, Paris, v. 139, p. 363-377, 1988.
- DE BARJAC, H. et al. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*, une nouvelle bactérie anaérobie pathogène des larves de moustiques et de simulies. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences**, Paris, série III, v. 310, p. 383-387, 1990.
- DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1342-1350, Dec. 2008.
- DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*, encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4230-4235, 1995.

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

FINNEY, D. J. **Probit analysis** – a statistical treatment of the sigmoid response curve. 3rd ed. Cambridge University Press, 1971. p. 50-80.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. Which came first: insecticide or resistance? **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 1-4, Nov. 2006.

FONTES, G. Filariídea: *Wuchereria bancrofti* – filariose linfática. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Médica**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 35, p. 269-277.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 398-411, 1993.

FOTOSEARCH. **Mosquito (Culex pipiens) pupae**. 1 fotografia. Disponível em: <<http://www.fotosearch.com/AGE020/x06-297093/>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

FRACHON, E. et al. Cellular fatty acid analysis as a potential tool for predicting mosquitocidal activity of *Bacillus sphaericus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 3394-3398, 1991.

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. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, n. 1, p. 187-194, 2007.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 54, p. 147-163, 2009.

GÉNISSEL, A. et al. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 270, p. 791-797, 2003.

GEORGHIOU, G. P. Resistance potencial to biopesticides and consideration of countermeasures. In: CASIDA, J. E. (Ed.). **Pesticides and alternatives**. Nova York: Elsevier Science Publisher, 1990. p. 409-420.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TAJEDA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1991. 318 p.

GEORGHIOU, G. P. et al. Characterization of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). In: COAST, J.; CHASE, L. (Ed). **University of California, Mosquito Control Research, Annual Report 1992**. Berkeley: University of California Press, 1992. p. 34-35.

GIRALDO-CALDERÓN, G. I. et al. Evaluation of the triflumuron and the mixture of *Bacillus thuringiensis* plus *Bacillus sphaericus* for control of the immature stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in catch basins. **Biomédica**, Bogotá, v. 28, n. 2, p. 224-233, 2008.

GINSBERG, H. S. Integrated pest management and allocation of control efforts for vector-borne diseases. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 26, n. 1, p. 32-38, Jun. 2001.

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

GOULD, F.; ANDERSON, A. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 Delta-endotoxin on growth, behaviour, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 20, p. 30-38, 1991.

GROETERS, F. R. et al. Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 86, p. 1035-1039, 1993.

GULF COAST MOSQUITO CONTROL. **Mosquitoes egg**. 1 fotografia. Mandeville, 2006. Disponível em: <<http://www.gulfcoastmosquito.com/images/image001.jpg>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

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

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 270, p. 2263-2270, Sep. 2003.

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

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

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

KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Insect Pathology**, New York, v. 5, p. 98-103, 1965.

KRYCH, V. K.; JOHSON, J.L.; YOUSTEN, A. A. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 30, p. 476-482, 1980.

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

LACEY, L. A.; SIELGEL, J. P. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. The Netherlands: Kluwer, 2000. cap. 4, p. 253-273.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.

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

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. An oviposition attractant pheromone in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 75, p. 283-290, 1985.

LIU, E. Y. et al. Development of *Bacillus sphaericus* C3-41 mosquito larvicidal formulation. **Chinese Journal of Epidemiology**, Pei-Ching, v. 10, p. 7-10, 1989.

LIU, H. Q. et al. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 3, p. 408-413, 2004.

LIU, J. W. et al. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-Kilodalton mosquitocidal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2174-2176, 1996.

LIU, Y. B. et al. Development time and resistance to Bt crops. **Nature**, London, v. 400, p. 519, 1999.

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

MERRITT, R. W. et al. Lack of effects of *Bacillus sphaericus* (VectoLex®) on nontarget organisms in a mosquito-control program in Southeastern Wisconsin a 3-year study. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 21, n. 2, p. 201-212, 2005.

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

MULLA, M. S. et al. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to non target organisms. **Mosquito News**, New York, v. 44, p. 336-342, 1984.

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

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. **Medical and Veterinary Entomology**, 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 Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 275-280, 1993.

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

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

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

NIELSEN-LEROUX, C. et al. 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**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5049-5054, 2001.

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

OLIVEIRA, C. M. F. de. **Condições ambientais e densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), em áreas urbanas do Recife e Olinda.** 1996. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

OLIVEIRA, C. M. F. de. et al. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 2, p. 125-129, Jun., 2003.

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

OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part B - Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2007.

ORDUZ, S. et al. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 59, p. 99-103, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide.** Geneva, 1985. p. 1-24 (Document TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3).

_____. **Lymphatic filariasis: the disease and its control.** Fifth Report of WHO Expert Committee on Filariasis. Geneva, 1992. 71p.

_____. Weekly epidemiological record. **Annual subscription**, Geneva, v. 83, n. 37/38, p. 333-348, Sept. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em: 12 dez. 2008.

ORLOVA, M. V. et al. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2723-2725, 1998.

OTTESEN, E. A. et al. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. 1-12, 2008.

PARK, H.-W.; BIDESHI, D. K.; FEDERICI, B. A. Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A, Cry11B, and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 2, p. 1331-1334, 2003.

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

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

PONCET, S. et al. Evaluation of synergistic interaction among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 66, p. 131-135, 1995.

PONCET, S. et al. Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination, of the Cry11A toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4413-4420, 1997.

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

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

RECIFE. PREFEITURA (2008). **PCR apresenta novas estratégias de controle da filariose.**

Disponível em:

<http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr_apresenta_novas_estrategias_de_controle_da_filariose_164478.php>. Acesso em: 27 dez. 2008.

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

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

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in the control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p. 488-492, 2000.

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

REY, L. *Wuchereria bancrofti* e filaríase linfática. _____. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 50, p. 627-638.

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

_____. Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 34, p. 5-10, 1997.

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

SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. J. Fitness costs and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of the diamondback moth *Plutella xylostella* L. **Ecological Entomology**, London, v. 26, p. 502-508, 2001.

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

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

SILVA-FILHA, M. H. et al. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 247, p. 754-761, 1997.

SILVA-FILHA, M. H.; REGIS, L. Reversal of low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from an urban area of Recife, Brazil. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, n. 2, p. 299-303, 1997.

SILVA-FILHA, M. H.; CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711 – 721, 1999.

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

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) larvae. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 185-191, 2004.

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

SINÈGRE, G. et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. In: EUR. MEER. SOCIETY OF VECTOR ECOLOGY, 8., 1994, Barcelona. **Abstracts...** Barcelona: 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.

_____. Entomogenous bacilli against mosquito larvae. **Development in Industrial Microbiology**, Washington, v. 15, p.187-194, 1974.

SINGH, G. J.; GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, n. 2, p. 237-247, 1988.

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

TABASHNIK, B. E. et al. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 4120-4124, 1994.

TABASHNIK, B. E. et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 12980-12984, 2000.

TABASHNIK, B. E. et al. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, p. 721-726, 2004.

TABASHNIK, B. E. et al. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 43, p. 15389-15393, 2005.

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

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

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

THANABALU, T.; HIDLEY, J.; BERRY, C. Proteolytic processing of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 5051-5056, 1992.

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

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

THIÉRY, I.; BACK, C.; SINÈGRE, G. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. **Annales de l'Institut Pasteur: Actualites**, Paris, v. 7, p. 247-260, 1996.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, Germany, v. 139, p. 57-60, 1984.

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

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

WILDLIFE TRUST. **Shift in feeding behavior of mosquitoes sheds light on West Nile Virus outbreak**. Nova York, 2006. Disponível em: <http://www.wildlifetrust.org/news/2006/images/culex_mosquitoes.jpg>. Acesso em: 12 dez. 2008.

WILSON, M. et al. Reversal of resistance to pyriproxyfen in the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, p. 761-768, 2007.

WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 4, p. 534-540, 2000.

WIRTH, M. C. et al. Mtx toxin synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 6066-6071, 2007.

WOODBURN, M. A.; YOUSTEN, A. A.; HILU, K. H. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1995.

YOUSTEN, A. A. et al. Comparison between bacteriophage typing and serotyping for the differentiation of *Bacillus sphaericus* strains. **Annales de l'Institut Pasteur - Microbiologie**, Paris, v. 131B, p. 297-308, 1980.

YUAN, Z. M. et al. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, p. 43-51, 2000.

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

ZAHIRI, N. S.; MULLA, M. S. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, n. 5, p. 672-677, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo publicado

Available online at www.sciencedirect.com

Biological Control 42 (2007) 155–160

**Biological
Control**

www.elsevier.com/locate/ybcon

Development of *Culex quinquefasciatus* resistance
to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure

Liliane Barbosa Amorim ^a, Cláudia Maria Fontes de Oliveira ^a, Eugênia Maria Rios ^b,
Lêda Regis ^a, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha ^{a,*}

^a Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo s/n Cidade Universitária 50670-420, Recife-PE, Brazil
^b BIOTICOM, 50670-901, Recife-PE, Brazil

Received 13 December 2006; accepted 4 April 2007
Available online 13 April 2007

Abstract

Culex quinquefasciatus may exhibit resistance to the biolarvicide *Bacillus sphaericus* (Bsp), when subjected to high selection pressure. The major insecticidal factor present in most Bsp products is the binary (Bin) toxin. The IAB59 strain, in particular, has attracted attention, since it shows another toxic factor, besides the Bin toxin, and this feature is likely to decrease the risk for selecting resistance. The aim of this study was to investigate whether it was possible to select a *Cx. quinquefasciatus* colony (CqRL2/IAB59) for high level resistance towards Bsp strain IAB59, under laboratory conditions. Selection performed by treating groups of about 15,000 third and fourth instar larvae from each generation with high concentrations of Bsp IAB59 yielded a 70% average pre-imaginal mortality. The CqRL2/IAB59 colony reached a high level of resistance ($\approx 40,000$ -fold), after 72 generations. This colony also displayed a high level of cross-resistance to strain 2362, close to 70,000-fold, while larvae remained susceptible to Bti. Cross-resistance to strain 2362 was observed before the colony had attained a high level of resistance to strain IAB59. Data from the reciprocal crosses, between individuals from the susceptible and the resistant colonies, showed that resistance is inherited as a recessive trait, since the LC₅₀ of Bsp IAB59 towards F1 larvae were similar to that of the susceptible parental colony. Data from this study showed that continuous selection pressure with Bsp IAB59 can select *Culex* resistant populations, although the evolution of resistance is much slower, than formerly observed for the commercial 2362 strain.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Vector control; Mosquito; Bin toxin; Cross-resistance; Inheritance; Resistance management

1. Introduction

Bacillus sphaericus (Bsp) is an aerobic bacterium which forms spores and crystals and many of its strains show high levels of selective action against the larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), a vector of Bancroftian filariasis and arboviruses. The fact that Bsp is harmless to non-target invertebrates and vertebrates is a characteristic that is important for its use in the control of insects (Mulla et al., 1984; Lacey and Siegel, 2000; Merritt et al., 2005). The main toxic factor in Bsp is the protein crystal

produced during the sporulation phase, which contains the binary protoxin (Bin) formed by the polypeptides BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa), which act in synergy (Nicolas et al., 1993). Some strains also produce, during the vegetative phase, toxins known as Mtx, however these are broken down by proteases and, for this reason, their contribution for the toxicity of final sporulated cultures is considered to be low (Charles et al., 1996). On the other hand, when the Mtx1 is produced and purified in *Escherichia coli*, it shows high toxicity for dipteran larvae (Partridge and Berry, 2002; Wei et al., 2006).

Once ingested by the larvae, the crystal dissolves in intestinal alkaline pH (≈ 10) and the polypeptides of 42- and 51-kDa are cleaved by serine-proteases into active fragments of 39- and 43-kDa, respectively (Baumann

* Corresponding author. Fax: +55 81 34532449.

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

et al., 1985; Broadwell and Baumann, 1987). In Bsp susceptible larvae, the Bin toxin binds to specific receptors in the intestinal epithelium of larvae by the sub-unit BinB, while the sub-unit BinA is responsible for the toxic effect on the cells (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). The Bin toxin receptor in *Cx. quinquefasciatus* larvae, known as Cqm1, is an α -glucosidase of 60-kDa attached to the intestinal epithelium by a GPI anchor (Silva-Filha et al., 1999; Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006). The genes of the Bin toxin of different strains are conserved and they are classified according to small variations in the sequences of amino acids as Bin1 (IAB59), Bin2 (2362, 1593, C3-41), Bin3 (2297) and Bin4 (LP-1G) (Priest et al., 1997; Humphreys and Berry, 1998).

The main strains of Bsp used in commercially available products for vector control are 2362 and 1593. It has been shown that continuous exposure to Bsp, both in the field and in the laboratory, may lead to selection for resistance (Rao et al., 1995; Silva-Filha et al., 1995; Yuan et al., 2000; Wirth et al., 2000; Pei et al., 2002). The principal insecticidal component of these strains is the Bin toxin, and for this reason a strong tendency towards cross-resistance to those is found in *Culex* colonies (Nielsen-LeRoux et al., 2001; Yuan et al., 2003; Silva-Filha et al., 2004). Studies have shown that the resistance mechanism in the majority of cases studied is related to the absence of the Cqm1 receptor in the intestinal epithelium of larvae, making it impossible for the Bin toxin to recognize and act on cells (Nielsen-LeRoux et al., 1995; Darboux et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Romão et al., 2006).

The IAB59 strain, isolated in Ghana (by de Barjac et al., 1988), has a distinctive characteristic since it is toxic for the larvae resistant to the 2362, 1593 and C3-41 strains. The absence of cross-resistance is likely to be related to the production of another toxic factor, besides the Bin toxin, and this suggests that the risk of selection for resistance to this strain is probably lower, compared to others strains (Pei et al., 2002; Yuan et al., 2003). Preliminary work on selection for resistance to Bsp IAB59 of a colony of *Cx. quinquefasciatus* (CqRL2/IAB59) in Brazil has shown that, after 12 generations, there was only a 4.1-fold alteration in susceptibility, while this colony showed strong cross-resistance to strains C3-41, 2362, 1593 and 2297 (Pei et al., 2002; Yuan et al., 2003). Subsequently, when the colony showed a 50-fold increase in the level of resistance in generation F25, the Cqm1 receptors were found to be absent in the epithelium of these larvae, this being associated with the high level of cross-resistance to the Bin toxin that was observed since generation F12 (Silva-Filha et al., 2004). Recently, the discovery of new toxins of strain IAB59 (G. Jones and C. Berry, personal communication) has proved that its toxic profile is more complex than that of the strains used commercially, thereby opening up new possibilities for further studies. The aim of this work was to investigate whether it was possible to select a *Cx. quin-*

quefasciatus colony for high level resistance towards Bsp strain IAB59.

2. Materials and methods

2.1. *Culex quinquefasciatus* colonies

Three colonies were used in this study: (1) CqSF, a susceptible colony, bred from egg rafts collected at mosquito breeding sites in Recife and maintained in the laboratory for more than 10 years; (2) a CqRL2/IAB59 colony, originated from the CqSF colony, selected using Bsp IAB59 in a previous study for 18 generations, showing a 4-fold reduction in susceptibility to Bsp IAB59 (Pei et al., 2002); and (3) a CqRL1/2362 colony highly resistant (>100,000-fold) to Bsp 2362, also derived from the CqSF colony and selected under laboratory conditions (Pei et al., 2002). Larvae from those colonies were reared on tap water and fed with cat chow (Whiskas®). The adults were fed with a 10% sucrose solution, and the females with blood from chickens. Larvae and adults were maintained in the insectarium of the Department of Entomology at the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) under the following conditions: 26 ± 1 °C, 70% humidity and a photoperiod of 12:12 h (light-dark).

2.2. Bacterial strains

Lyophilized powders of Bsp (strains IAB59 and 2362) and Bti (IPS-82) were used in the bioassays to evaluate the susceptibility of the colony during the selection process. The Bsp powders were provided by BIOTICOM (Recife, Brazil), while the Bti IPS-82 standard powder was provided by the Institut Pasteur (Paris, France). Batches of wet biomass recovered from Bsp IAB59 sporulated cultures were used in the selection procedure, while the lyophilized powder was used to evaluate the susceptibility of the colony under selection. The larvicidal activity of each Bsp IAB59 batch against the CqRL1/2362 larvae was tested, prior to use in the selection procedures, in order to ensure that all toxic compounds from this strain were present.

2.3. *In vivo* toxicity assays

Bioassays were performed to determine the susceptibility of the larvae to Bsp (strains IAB59 and 2362) and to Bti, according to the standard method recommended by the WHO (1985). The assays were carried out using groups of 20 early fourth instar larvae placed in 100 mL of distilled water in plastic cups treated with serial dilutions of the bacterial suspensions in water. The bioassay comprised six concentrations, which caused 10–98% mortality, and two or three replicates per concentration tested were used. Each bioassay was repeated two or three times. Mortality was recorded after 24 and 48 h, for Bti and Bsp, respectively. A control group tested with water only was run for each experiment. The lethal concentration for 50% of larvae

(LC_{50}) was determined by probit analysis (Finney, 1971) using the program SPSS 10.0 for Windows. The resistance ratio (RR) between the LC_{50} for the CqRL2/IAB59 selected colony and that for the CqSF susceptible colony, was established to evaluate the resistance.

2.4. Selection procedure

The CqRL2/IAB59 colony was reared generation after generation, using the individuals that survived exposure to treatments with Bsp IAB59. Between 5000 and 23,000 third and fourth instar larvae of each generation were treated with concentrations of Bsp IAB59, which accounted for more than 50% of cumulative pre-adult mortality. Pools of 800 larvae were treated in a recipient containing 2 L of de-chlorinated water and food was provided 24 h after treatment. The surviving larvae were retrieved 48 h after treatment, placed in non-treated recipients and reared to adulthood to make up the subsequent generation.

2.5. Inheritance of resistance

Crossing experiments were done between the CqRL2/IAB59 colony (R) and the respective susceptible counterpart from the CqSF colony (S), following Oliveira et al. (2004). For the reciprocal crosses, 200 virgin individuals were used to form 50 pairs of S (female) \times R (male) and 50 pairs of R (female) \times S (male). The offspring of the crosses, called F1a and F1b respectively, were assayed for susceptibility to Bsp IAB59, according to the procedures described in Section 2.3. A back-cross was carried out between 50 virgin individuals R (female) and 50 from F1a (male). The offspring of this back-cross (F2) were submitted to treatment with Bsp IAB59 and the surviving larvae from the assays were reared to adulthood to estimate the sex ratio.

3. Results

3.1. Resistance to *Bacillus sphaericus* IAB59 and cross-resistance

The selective resistance of the CqRL2/IAB59 colony to Bsp IAB59, presented in this study, is based on a previous selection process described by Pei et al. (2002). Selection pressure was maintained continuously, giving rise to an average final mortality rate between 60% and 95%, over a total of 72 generations. The selection process was successful and bioassays carried out to evaluate the susceptibility of the colony CqRL2/IAB59 showed the evolution of resistance ratio (RR), over the generations (data not shown). After 47 generations of selection, the colony reached a level of resistance around 19,000-fold compared to the susceptible CqSF colony and, the last evaluation of generation F72 revealed a RR of around 40,000-fold (Table 1). The evaluation of the susceptibility of the CqRL2/IAB59 colony in generation F33 showed that strong resistance to Bsp 2362

was established before the resistance to the IAB59 strain had attained a high level. In that generation, the level of cross-resistance of the CqRL2/IAB59 colony to the 2362 strain was around 9000-fold while the resistance level to the IAB59 strain was around 625-fold. This result shows that the larvae exposed to Bsp IAB59 are selected for resistance to the binary toxin more rapidly than for the totality of toxic factors present in this strain. Comparison of the resistance levels achieved by the CqRL2/IAB59 colony in relation to the two strains of Bsp, showed that the selection of resistance to the IAB59 strain occurred more slowly than in the case of the 2362 strain. In generation F47, the level of cross-resistance remained high, at around 69,000-fold (Table 1). On the other hand, the CqRL2/IAB59 colony showed no alteration in susceptibility to Bti, and the LC_{50} of this entomopathogen remained stable at around 0.01 mg/L, a figure similar to that found in the case of the CqSF colony, indicating total absence of cross-resistance (Table 1).

3.2. Inheritance of resistance

Individuals from the CqRL2/IAB59 colony that showed a high level of resistance (RR \approx 20,000) to Bsp IAB59 in generation F47 were used for the crosses to evaluate the manner of inheritance. The offspring F1a and F1b resulting from crossing the CqSF and CqRL2/IAB59 colonies were susceptible to Bsp IAB59 and the dose-mortality lines observed for both sets of progeny were relatively close to that of the parental colony CqSF (Fig. 1), demonstrating that resistance to Bsp IAB59 is a recessive inherited trait. The LC_{50} of progeny F1b was similar to that of colony CqSF, while that of F1a was slightly greater (Table 2). A total of 4217 fourth instar larvae from the progeny F2, resulting from the back-cross of individuals from F1 and the resistant parental colony CqRL2/IAB59, were treated with Bsp IAB59. The pre-imaginal mortality was around 75% and among 1073 individuals that reached adulthood, the sex ratio for surviving individuals was approximately 1:1, indicated that resistance is likely to be inherited as an autosomic trait (Table 3).

4. Discussion

This is the first report of a *Cx. quinquefasciatus* colony that attained a high level of resistance to Bsp strain IAB59, under laboratory conditions. Prior selection of the CqRL2/IAB59 colony for 12 generations showed a resistance ratio (RR) of only 4.1-fold. Another colony selected at the same time with this strain in China for 18 generations attained a moderate level of resistance of 46.3-fold (Pei et al., 2002). These data had suggested that other toxic factors produced by the strain, apart from the Bin toxin, may work against selection for resistance, however, the continuation of the selection process carried out during this study showed the resistance of the CqRL2/IAB59 to attain a level of 40,000-fold. The selection for

Table 1

Larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* (Bsp), strains IAB59 and 2362, and *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) against *Culex quinquefasciatus* larvae, from a susceptible colony (CqSF) and a Bsp IAB59-selected colony (CqRL2/IAB59), after 47, 65 and 72 generations

Colony	Bsp IAB59 ^a		Bsp 2362 ^a		Bti	
	LC ₅₀ (95% fiducial limits) ^b	RR ^c	LC ₅₀ (95% fiducial limits)	RR	LC ₅₀ (95% fiducial limits)	RR
CqSF	0.0003 (0.0002–0.0005)	—	0.003 (0.002–0.027)	—	0.010 (0.009–0.020)	—
CqRL2/IAB59 F47	5.7 (3.2–8.9)	19,000	208.9 (85.1–578.9)	—	0.008 (0.005–0.010)	≈1.0
CqRL2/IAB59 F65	6.4 (4.8–7.6)	21,000	—	—	—	—
CqRL2/IAB59 F72	11.9 (5.9–20.7)	40,000	—	—	—	—

^a One milligram of Bsp IAB59 and 2362 powders yielded around 34 and 11 µg of *in vitro* solubilized proteins, respectively.

^b LC₅₀: Lethal concentration (mg/L) for 50% of the individuals treated for 48 and 24 h with Bsp and Bti, respectively.

^c RR: Resistance ratio between the LC₅₀ of the colony CqRL2/IAB59, under selection, and that of the CqSF susceptible colony.

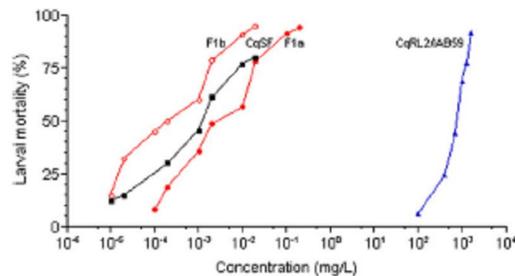


Fig. 1. Dose-mortality lines for *Bacillus sphaericus* strain IAB59 against *Culex quinquefasciatus* fourth instar larvae from a susceptible (CqSF) colony, a resistant (CqRL2/IAB59) colony and their offspring F1a (♀ S × ♂ R) and F1b (♀ R × ♂ S).

Table 2

Larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* (Bsp) strain IAB59 against *Culex quinquefasciatus* larvae from a susceptible colony (CqSF), a Bsp IAB59-selected colony (CqRL2/IAB59), and its respective offspring (F1)

Colony	LC ₅₀ ^a (95% fiducial limits)	RR ^b
CqSF	0.0003 (0.0002–0.0005)	—
CqRL2/IAB59	5.7 (3.2–8.9)	19,000
F1a ^c	0.002 (0.0017–0.005)	6.7
F1b ^c	0.0003 (0.0001–0.0005)	1.0

^a LC₅₀: Lethal concentration (mg/L) for 50% of the individuals treated for 48 h.

^b RR: Resistance ratio between the LC₅₀ of the CqRL2/IAB59 colony under selection, or its progeny (F1), and that of the CqSF susceptible parent colony.

^c F1: Offspring F1a (♀ S × ♂ R) and F1b (♀ R × ♂ S).

Table 3

Sex ratio among *Culex quinquefasciatus* individuals from a *Bacillus sphaericus* IAB59 resistant colony (CqRL2/IAB59) and from a F2 progeny that survived to a *B. sphaericus* IAB59 treatment

Colony	No. adults	No. ♀	No. ♂	Sex ratio ♀:♂
CqRL2/IAB59	662	333	329	1.01:1.00
F2	1073	567	506	1.12:1.00

F2 was obtained from the backcross between resistant females and males from the offspring F1a (♀ S × ♂ R).

resistance of colonies of the *Cx. pipiens* complex to Bsp strains 2362 and C3–41, in the laboratory, showed levels of resistance higher than 100,000-fold after periods varying

from 12 to 46 generations of continuous exposure (Wirth et al., 2000; Pei et al., 2002). The RR exhibited by the CqRL2/IAB59 colony to Bsp IAB59 was lower than the levels achieved by the colonies selected with the 2362 and C3–41 strains, which have only the Bin toxin, although the resistance detected in this study is considered to be high and could certainly compromise the impact of vector control measures under field conditions. Data showed that attention should also be given to the use of Bsp IAB59 based biolarvicides, in order to avoid the selection of resistant populations, even though this strain has a more complex toxic profile.

Studies of the pattern of cross-resistance among biolarvicides are essential if strains that may be used alternately to manage resistant populations are to be identified. There is a pattern of cross-resistance of larvae in the case of various commercially available strains of Bsp, as these have in common the Bin toxin as the main insecticide component (Wirth et al., 2000; Nielsen-LeRoux et al., 2001; Pei et al., 2002; Yuan et al., 2003). In spite of differences between the amino acid sequences of the Bin toxin, it has already been shown that, in the case of the toxins Bin1 (IAB59), Bin2 (2362, 1593, C3–41) and Bin3 (2297), these variations do not have an impact on their action either *in vivo* or *in vitro*, as they are similar (Humphreys and Berry, 1998; Silva-Filha et al., 2004). Consequently, the toxic action of the Bsp IAB59 on larvae resistant to the strains that produce Bin2 cannot be attributed to greater toxic activity of the Bin1, but to the production of other toxic factors by the strain IAB59. In the present study, it was observed that, when the CqRL2/IAB59 colony exhibited a moderate level of resistance to Bsp IAB59, the cross-resistance to strain 2362 was already extremely high. These data also indicate that the selection of resistance to the Bin toxin occurs more rapidly than that for the totality of toxic factors present in the IAB59 strain. How the new factors operate is still unknown, but currently available data is likely to indicate that there is no synergy between these and the Bin toxin, in view of the fact that the level of toxicity of the IAB59 strain for susceptible *Culex* larvae is similar to that observed for strains 2362 or 1593 (Charles et al., 1996). However, this issue needs to be addressed again, as the way the action of the Bin toxin is measured may not be appropriate for evaluating toxins with different characteristics.

Wei et al. (2006) have shown that the action of the Mtx1 toxin, produced by various toxic strains of Bsp, may cause higher cumulative pre-imaginal mortality of *Cx. quinquefasciatus* than the Bin toxin, after the initial 48-h period, which is the period of time analyzed using the standard bioassay protocol. In the present study, it was also seen that the mortality caused by the IAB59 strain extended beyond the standard evaluation period (C. Oliveira, personal communication).

The CqRL2/IAB59 colony did not show cross-resistance to Bti during the selection process, as observed in other studies of *Culex* colonies resistant to strains 2362, 1593 and C3-41, which have been shown to be susceptible to Bti (Nielsen-LeRoux et al., 1995; Silva-Filha et al., 1995; Pei et al., 2002; Wirth et al., 2000; Yuan et al., 2003). The toxins commonly present in the Bti crystal (Cry4A, Cry4B, Cry11A, Cyt1A) are different from the Bin toxin and belong to the Cry and Cyt family of toxins (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). The receptors of the Bti toxins are probably different from those of the Bin toxin, as for example the 65-kDa alkaline phosphatase recently identified as the Cry11A receptor in *Aedes aegypti* larvae (Fernandez et al., 2006). The greater number of toxins present in the Bti crystal and its action in synergy mediated by distinct receptors are factors that explain the absence of cross-resistance and make Bti an ideal candidate for use in managing resistance to Bsp (Crickmore et al., 1995; Poncet et al., 1995; Regis et al., 2001; Pérez et al., 2005). Zahiri and Mulla (2003) have shown the effectiveness of the use of biolarvicides based on a mixture of Bsp and Bti, in view of the fact that no resistance was observed after 36 generations of exposure of *Cx. quinquefasciatus*. Since Bti began to be used in the field, more than 20 years ago, there have been no reported cases of mosquito populations resistant to this entomopathogen (Becker et al., 2003).

The resistance of *Culex* larvae to strain IAB59 reported in this study is a recessive inherited trait, as previously shown in the study of the resistance of other populations to strains 2362 and C3-41 (Nielsen-LeRoux et al., 1995, 1997, 2002; Wirth et al., 2000; Oliveira et al., 2004). Preliminary data from evaluation of backcrosses carried out as part of this study suggest autosomic inheritance, as already observed in colonies GEO, RLCq1/C3-41 and CqRL1/2362 (Nielsen-LeRoux et al., 1995; Oliveira et al., 2004). In other *Culex* populations distinct genes linked to sex were observed and these too may determine resistance in the case of the SPHAE, Tunis and BP colonies (Nielsen-LeRoux et al., 1997, 2002). Despite the different genes that may be involved in resistance to Bsp, one common finding is the recessive character of the genetic trait, and this is a fact that facilitates its management considerably. In this context, the introduction of susceptible individuals into the population, by way of migration or non-treated refuges in the area, would result in a reduction in the frequency of genes for resistance. As mentioned above, the introduction, as a strategy for mosquito control using Bsp, of a

rotation system or mixture with another agent showing a different mode of action is essential if the selection of resistant genotypes is to be avoided. Features such as inherited resistance and the pattern of cross-resistance should therefore be investigated, as these are of great importance in establishing strategies for managing and preventing selection for resistance.

Acknowledgments

We thank Peter Ratcliffe for the critical review of the manuscript, Christina Nielsen-LeRoux and Jean-François Charles (Institut Pasteur) for kindly providing the Bti standard powder. This study was funded by FIOCRUZ-PAPES III Grant No. 0250250202, FACEPE Grant APQ 23-CBIO-03/2001-01/01-20, CNPq Grant No. 475647-2004-1.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocontrol.2007.04.007.

References

- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J., Bowdith, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163, 738–747.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Lane, J., Kaiser, A., 2003. Mosquitoes and their Control, First Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Broadwell, A.H., Baumann, P., 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1333–1337.
- Charles, J.-F., Nielsen-LeRoux, C., Delécluse, A., 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Ann. Rev. Entomol.* 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 Microbiol. Lett.* 156, 156–159.
- Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A., Ellar, D.J., 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 249–254.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.-F., Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 981–990.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5830–5835.
- de Barjac, H., Thiery, I., Cosmao-Dumanoir, V., Frachon, E., Laurent, P., Charles, J.F., Hamon, S., Ofori, J., 1988. Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae: serotype H6. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 139, 363–377.
- Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77–84.

- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Humphreys, M.J., Berry, C., 1998. Variants of the *Bacillus sphaericus* binary toxins: implications for differential toxicity strains. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 184–185.
- Lacey, L.A., Siegel, J.P., 2000. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: Charles, J.F., Delécluse, A., Nielsen-LeRoux, C. (Eds.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer, The Netherlands, pp. 253–273.
- 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. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 201–212.
- Mulla, M.S., Darwazeh, H.A., Davidson, E.W., Dulmage, H.T., Singer, S., 1984. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to non target organisms. *Mosq. News* 44, 336–342.
- 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 Microbiol. Lett.* 106, 275–280.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210, 585–590.
- 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. *Eur. J. Biochem.* 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. *J. Med. Entomol.* 34, 321–327.
- Nielsen-LeRoux, C., Rao, D.R., Murphy, J.R., Carron, A., Mani, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5049–5054.
- 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. *J. Med. Entomol.* 39, 729–735.
- 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. *J. Med. Entomol.* 41, 58–64.
- Partridge, M.R., Berry, C., 2002. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparius*. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 135–136.
- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3003–3009.
- Pérez, C., Fernández, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CytIIAa synergizes CryIIAa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18303–18308.
- Poncet, S., Delécluse, A., Klier, A., Rapoport, G., 1995. Evaluation of synergistic interaction among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 131–135.
- Priest, F.G., Ebdrup, L., Zahner, V., Carter, P.E., 1997. Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1195–1198.
- 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. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 1–5.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol.* 8, 377–380.
- Romão, T.P., de Melo Chalegrê, 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 J.* 273, 1556–1568.
- 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). *J. Econ. Entomol.* 88, 525–530.
- 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*. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.* 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 Microbiol. Lett.* 241, 185–191.
- Wei, S., Cai, Q., Yuan, Z., 2006. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43, 726–730.
- 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., 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. *J. Med. Entomol.* 37, 534–540.
- 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. Sci. Technol.* 10, 43–51.
- 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*. *Med. Vet. Entomol.* 17, 251–256.
- Zahiri, N.S., Mulla, M.S., 2003. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis*. *J. Med. Entomol.* 40, 672–677.

Apêndice B – Artigo publicado

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, p. 1044-1049
 0099-2240/09/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.02032-08
 Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 75, No. 4

Detection of an Allele Conferring Resistance to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex quinquefasciatus* Populations by Molecular Screening[†]

Karlos Diogo de Melo Chalegre,¹ Tatiány Patrícia Romão,¹ Liliâne Barbosa Amorim,¹ Daniela Bandeira Anastácio,¹ Rosineide Arruda de Barros,¹ Cláudia Maria Fontes de Oliveira,¹ Lêda Regis,¹ Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto,² and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{1*}

Department of Entomology¹ and Department of Microbiology,² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil

Received 2 September 2008/Accepted 15 December 2008

The activity of the *Bacillus sphaericus* binary (Bin) toxin on *Culex quinquefasciatus* larvae depends on its specific binding to the Cqm1 receptor, a midgut membrane-bound α -glucosidase. A 19-nucleotide deletion in the *cqm1* gene (*cqm1*_{REC}) mediates high-level resistance to Bin toxin. Here, resistance in nontreated and *B. sphaericus*-treated field populations of *C. quinquefasciatus* was assessed through bioassays as well as a specific PCR assay designed to detect the *cqm1*_{REC} allele in individual larvae. Resistance ratios at 90% lethal concentration, gathered through bioassays, were close to 1 and indicate that the selected populations had similar levels of susceptibility to *B. sphaericus*, comparable to that of a laboratory colony. A diagnostic PCR assay detected the *cqm1*_{REC} allele in all populations investigated, and its frequency in two nontreated areas was 0.006 and 0.003, while the frequency in the *B. sphaericus*-treated population was significantly higher. Values of 0.053 and 0.055 were detected for two distinct sets of samples, and homozygote resistant larvae were found. Evaluation of Cqm1 expression in individual larvae through α -glucosidase assays corroborated the allelic frequency revealed by PCR. The data from this study indicate that the *cqm1*_{REC} allele was present at a detectable frequency in nontreated populations, while the higher frequency in samples from the treated area is, perhaps, correlated with the exposure to *B. sphaericus*. This is the first report of the molecular detection of a biolarvicide resistance allele in mosquito populations, and it confirms that the PCR-based approach is suitable to track such alleles in target populations.

Bacillus sphaericus Neide is considered the most successful microbial larvicide to date for the control of mosquito species from the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex (20). *B. sphaericus* biolarvicides commercially available are based on highly toxic strains characterized by their ability to express the binary (Bin) protoxin, a crystal protein produced in large amounts during sporulation (7). This heterodimer is formed by the BinA (42-kDa) and BinB (51-kDa) subunits that act in synergy to produce larvicidal activity upon *Culex* larvae (3, 23). The BinB subunit is responsible for the recognition and binding of the toxin to specific receptors on the midgut epithelium surface, while BinA is primarily responsible for the toxic effects, but first the crystal has to be ingested by the larvae and the protoxin must be processed into toxin by the midgut (7). The Bin toxin receptor in *C. pipiens* (Cpm1) and *Culex quinquefasciatus* (Cqm1) is a 60-kDa α -glucosidase attached to the epithelial cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (9, 30, 31). The action of the Bin toxin on *Culex* larvae relies on its specific binding to those membrane-bound receptors (24). Disruption of the interaction between the toxin and the midgut is the major mechanism underlying resistance, and it has already been reported from different laboratory- or field-selected colonies (25, 26, 27, 33). Unrelated mechanisms may

also be involved in resistance, but they have not been characterized so far (25, 27).

Molecular studies revealed that mutations in the genes *cpm1* and *cqm1*, which prevent the production of functional membrane-bound receptors, are the main reasons behind the lack of binding of the Bin toxin to the midgut epithelium. Four *cpm1/cqm1* resistance alleles were found in *Culex* populations of different origins. The *cpm1*_{GEO} allele, detected in a *C. pipiens* laboratory-selected colony (GEO) from California, contains a nonsense mutation leading to the synthesis of a truncated protein lacking the glycosylphosphatidylinositol anchor and is therefore not able to localize to the apical membrane of the midgut epithelium (11, 38). A 19-nucleotide deletion in the gene *cqm1*, here named *cqm1*_{REC}, was associated with the resistance of a *C. quinquefasciatus* laboratory colony (CqRL1/2362) originating from the city of Recife (Brazil), and this mutation prevents the expression of Cqm1 on the midgut brush border membranes (28, 29, 30). Two alleles were found in the *C. pipiens* BP population from France (8). The *cpm1*_{BP} allele had a single nucleotide mutation that prevented the expression of a membrane-bound protein, while the *cpm1*_{BP-del} allele involves transposon-mediated resistance and codes for a mutant membrane-bound protein that is unable to interact with the Bin toxin (10).

The elucidation of mutations conferring resistance to the Bin toxin is essential for the development of molecular tools to detect alleles containing such mutations in mosquito populations. The bioassay is the most widely used method to evaluate insect susceptibility; however, when resistance alleles are re-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil. Phone: 55-81-21012553. Fax: 55-81-21012516. E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br.

[†] Published ahead of print on 19 December 2008.

Vol. 75, 2009

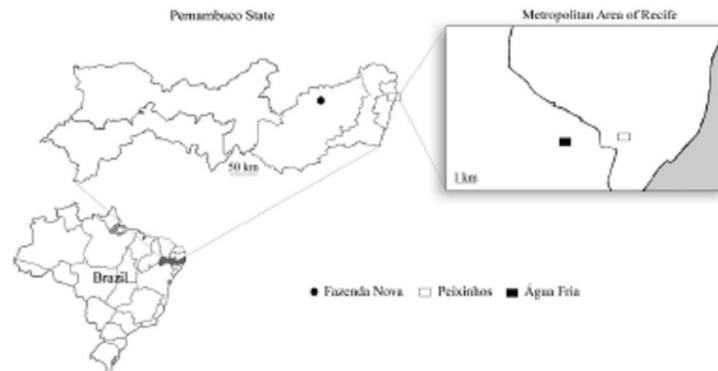
RESISTANCE TO *BACILLUS SPHAERICUS* BINARY TOXIN 1045

FIG. 1. *Culex quinquefasciatus* samples were collected in three areas of Pernambuco state, located in northeastern Brazil. Fazenda Nova is a nontreated rural district located 180 km from the RMA; both the nontreated area of Peixinhos and the *Bacillus sphaericus*-treated area of Água Fria are located in the RMA.

cessively inherited, heterozygote larvae cannot be identified and detection of resistant homozygotes is difficult. This is a critical issue since the evolution of resistance in populations subjected to selection pressure depends on the initial frequency of resistance alleles. The development of diagnostic PCR methods, or DNA-based kits, has opened new perspectives in the molecular monitoring of resistance (14, 18, 36).

The Recife Metropolitan Area (RMA), located in the state of Pernambuco in northeastern Brazil, has been subjected to a vector control program to reduce *C. quinquefasciatus* density in districts where filariasis is endemic (32). Among other control measures, *B. sphaericus*-based larvicides have been used, and one of the major concerns regarding their use as a microbial larvicide is monitoring the susceptibility of populations under selection. The *cqm1_{REC}* allele was identified in a *C. quinquefasciatus* colony derived from the RMA (30), and it is believed that this mutation may be present and subjected to *B. sphaericus* selection in field populations. Here we report the development of a diagnostic PCR approach based on the detection of *cqm1_{REC}* and its use to investigate the frequency of resistance in nontreated and treated *C. quinquefasciatus* populations.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito laboratory colonies. Three colonies were used in this study: CqSF is a *C. quinquefasciatus* colony susceptible to *B. sphaericus* which was established from egg rafts collected in districts located in the RMA; the CqRL1/2362 colony was derived from the CqSF colony by laboratory selection with *B. sphaericus* strain 2362 and displays a high level of resistance (>100,000-fold) to this entomopathogen (29); ReCL is an *Aedes aegypti* colony established from egg samples collected in the RMA. All colonies have been maintained in the insectarium of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Brazil, for more than 5 years. Larvae were reared in dechlorinated tap water and fed with cat biscuits. The adults were fed on 10% sucrose solution, and females were also fed with chicken blood. Insects were maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% humidity, and a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness.

Culex quinquefasciatus field populations. Three field populations from the state of Pernambuco (Brazil), two of them from a nontreated area and one from a *B. sphaericus*-treated area, were investigated (Fig. 1). The nontreated areas were Fazenda Nova, a rural district located 180 km from Recife, and Peixinhos, located in the RMA. The treated area of Água Fria is located in the RMA, 3 km away from Peixinhos, and has been subjected to the Filariasis Control Program, carried out by the municipality's Department of Health (32). The vector control subprogram includes the utilization, since 2003, of *B. sphaericus*-based larvicides in *Culex* breeding sites mapped in that area. Previous analysis of Água Fria larva susceptibility to *B. sphaericus* did not indicate the development of resistance (32) (Table 1). Samples in Peixinhos and Água Fria consisted of egg rafts collected using oviposition traps (4) randomly placed in households within the two neigh-

TABLE 1. Toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 2362 (standard powder SPH88) against *Culex quinquefasciatus* fourth-instar larvae from susceptible laboratory colony (CqSF), field populations of Fazenda Nova (FN) and Peixinhos (PX), and a *B. sphaericus*-treated population of Água Fria (AF)

Colony ^a	No. of treatments	No. of larvae	LC ₅₀ ^b		LC ₉₀ ^b	
			Mean (95% confidence interval)	RR ^c	Mean (95% confidence interval)	RR ^c
CqSF	0	2,580	0.003 (0.002–0.004)	1.0	0.038 (0.021–0.114)	1.0
FN	0	1,080	0.011 (0.005–0.028)	3.7	0.022 (0.015–0.072)	0.6
PX	0	1,020	0.012 (0.009–0.017)	4.0	0.025 (0.020–0.036)	0.6
AF	13 ^d	960	0.008 (0.004–0.013)	2.7	0.020 (0.015–0.036)	0.5
	24	1,140	0.026 (0.015–0.030)	8.6	0.044 (0.035–0.067)	1.2

^a Field sampling was performed in December 2007 (FN), May 2007 (PX), May 2005 (AF, 13 treatments), and April 2007 (AF, 24 treatments).

^b Lethal concentrations (mg/liter) for 50% (LC₅₀) or 90% (LC₉₀) of larvae treated after 48 h.

^c RR between the LC toward the field population studied and the LC toward the CqSF colony.

^d Data for sampling after 13 treatments were obtained from the work of Silva-Filha et al. (32).

borhoods. In Fazenda Nova, large samples of egg rafts and larvae were directly collected from breeding sites. Between 50 and 300 egg rafts per population were used to establish subcolonies that were maintained under laboratory conditions, as described above. Larvae from F1 or F2 progenies were evaluated through bioassays, and fourth-instar larva samples were stored at -70°C for diagnostic PCR and enzymatic analysis, as described in the following sections.

Bioassays. *C. quinquefasciatus* susceptibility to *B. sphaericus* was analyzed through bioassays using early fourth-instar larvae, according to standard procedures (41). Larvae were exposed to serial dilutions of spore crystal lyophilized standard powder from *B. sphaericus* 2362 (SPH88; Pasteur Institute, France), for 48 h. Cups held 20 larvae in 100 ml of bacterial suspensions in water, and three replicates were performed for the six concentrations tested per bioassay. A control group, tested on water only, was run in each experiment, and the bioassay was repeated at least three times. The mean lethal concentrations for 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) of exposed larvae during 48 h were estimated through probit analysis using the program SPSS 10.0 for Windows. Resistance ratios (RR) for each population analyzed were calculated by comparing their LC_{50} values to that of the susceptible CqSF colony, used as a reference.

Diagnostic PCR. For DNA isolation, individual fourth-instar larvae were homogenized in DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA), as recommended by the manufacturer, followed by precipitation with ethanol and resuspension in Tris-EDTA buffer. PCR was performed using specific primers flanking the 19-nucleotide deletion in the *cqm1_{REC}* allele (5' primer, Cpq2F, 5'-CGA GAA TTC ATG CAG GAC TTC AAA GAG-3'; 3' primer, Cpq1R, 5'-GCA CTG CAG GGA AGT GGT GGA AGG TAC-3'). The reactions were carried out with the Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) for 35 cycles with an annealing temperature of 55°C , using a Biometra thermocycler (Goettingen, Germany). Amplification products were separated in electrophoresis on 2.5% agarose gels. Each assay included no-DNA samples and *A. aegypti* DNA as negative controls. Selected PCR products were subjected to automatic sequencing to confirm the identity of the fragments. The statistical analysis to compare the proportions of *cqm1_{REC}* found in field populations was performed through the chi-square test with significance at 5%, using the program R-2.6.2 (www.r-project.org).

α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) assays. The α -glucosidase assay was performed essentially as described previously (30). Individual larvae were homogenized in phosphate-buffered saline buffer and solubilized in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide sample buffer, lacking 2-mercaptoethanol, followed by electrophoresis on 8% acrylamide gels. The gels were then incubated three times for 15 min in a 2.5% Triton X-100 aqueous solution, followed by incubation for 20 min at 37°C with a 100 mM sodium citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 2 mM 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside (Sigma, St. Louis, MO), under gentle agitation. Catalytic bands, including the Cqm1 α -glucosidase receptor, were visualized under UV light. Samples of 150 to 500 larvae from each population were analyzed.

RESULTS

Selected field populations of *C. quinquefasciatus* never exposed to *B. sphaericus*, or samples from a treated area, were first compared through bioassays to assess their susceptibilities to this bacterium. The LC_{50} s derived from the nontreated populations of Fazenda Nova and Peixinhos were similar, producing resistance ratios (RRs) for both populations, compared to that of the susceptible laboratory colony CqSF, of equal to or near 4. The RRs at LC_{90} for these populations were less than 1, indicating that natural variations in susceptibility can be found in field populations that have not been exposed to *B. sphaericus* (Table 1). An initial evaluation of the treated population of Água Fria, performed in a previous study, after 13 rounds of *B. sphaericus* treatment produced an RR value at LC_{50} of 2.7 (32). Here, the evaluation performed after 24 treatments indicated an RR at LC_{50} close to 9 (Table 1). Nevertheless, these larvae had RR values at LC_{90} comparable to those of the CqSF larvae at both times analyzed, indicating that there were no statistical differences in susceptibility between the two populations, according to this parameter.

The identification of the *cqm1_{REC}* variation provided the tools for the development of an approach to monitor the se-

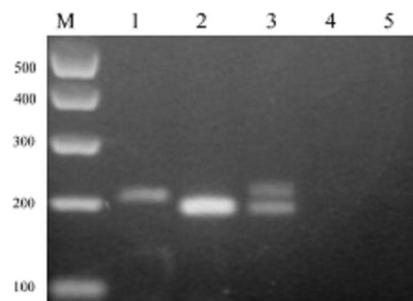


FIG. 2. DNA fragments amplified from the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles of susceptible and *Bacillus sphaericus*-resistant larvae, respectively. The diagnostic PCR produces distinct profiles for susceptible homozygote, resistant homozygote, and susceptible heterozygote larvae (lanes 1, 2, and 3, respectively). No fragments were amplified from the samples with *Aedes aegypti* DNA or without DNA (lanes 4 and 5, respectively). On the left, molecular size (M) markers are shown in base pairs.

lection of resistance associated with this allele. A diagnostic PCR procedure was devised which consisted of the amplification of a DNA fragment encompassing the deleted segment. This assay was first performed using larvae from the *B. sphaericus*-susceptible (CqSF) and -resistant (CqRL1/2362) colonies, consisting of individuals homozygous for the *cqm1* and *cqm1_{REC}* alleles, respectively, to evaluate its reliability. Using a single pair of primers, two distinct fragments, of 208 and 189 bp, were amplified from the susceptible and the resistant alleles of the *cqm1* gene, respectively (Fig. 2, lanes 1 and 2). Single fragments of the expected sizes were amplified from DNA samples from each reference colony, and sequencing of selected samples confirmed their identity as products of the *cqm1* gene. Amplification of both fragments was observed in heterozygote larvae, obtained from the cross between susceptible and resistant individuals from these colonies (Fig. 2, lane 3), and no fragments were amplified in samples with *A. aegypti* DNA or those without DNA, used as negative controls (Fig. 2, lanes 4 and 5).

A second approach to evaluate the susceptibility of individual *C. quinquefasciatus* larvae to *B. sphaericus* was performed using an in-gel α -glucosidase assay. Susceptible larvae from the CqSF colony showed a reproducible profile of four catalytic bands, and the Cqm1 α -glucosidase migrated with an apparent molecular mass of 83 kDa, under semidenaturing conditions (Fig. 3, S). Resistant larvae from the CqRL1/2362 colony, which are homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele, were characterized by the lack of the catalytic band corresponding to Cqm1 (Fig. 3, R). Analysis of individual larva samples, using different body parts for both PCR and α -glucosidase assays, confirmed the correlation between genotype and phenotype (data not shown).

Both the PCR and the α -glucosidase assays were then used to investigate individual larvae from the populations tested with the bioassays. Using PCR, the *cqm1_{REC}* resistance allele was detected in samples from all field populations analyzed. In Fazenda Nova, an area without a previous history of *B. sphaericus* utilization, three larvae out of 504 analyzed were het-

Vol. 75, 2009

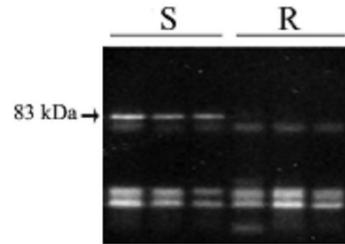
RESISTANCE TO *BACILLUS SPHAERICUS* BINARY TOXIN 1047

FIG. 3. Analysis of α -glucosidases from susceptible (S) and *Bacillus sphaericus*-resistant (R) *Culex quinquefasciatus* larvae. In-gel assays were performed using crude extracts from individual larvae. Samples were separated by 8% semidenaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and submitted to enzymatic detection. Catalytic bands were visualized under a UV transilluminator, and the arrow indicates the 83-kDa band corresponding to the Cqml α -glucosidase.

erozygotes for *cqm1_{REC}* and its frequency was 0.0029 (Table 2). The frequency in the nontreated population of Peixinhos was 0.0061 based on the detection of six heterozygote individuals among 492 larvae analyzed. This frequency, although not significantly different from that observed in the Fazenda Nova sample, showed a twofold increase (Table 2). All larvae tested from the two nontreated populations displayed expression of Cqml, as observed by the in-gel α -glucosidase assay, and this finding was in agreement with the PCR screening data with no homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele (Table 2).

Screening of the treated area from Água Fria revealed a different scenario, and the *cqm1_{REC}* frequency was significantly higher than those found in nontreated populations. In samples collected after 13 treatments with *B. sphaericus*, the frequency was 0.053, and within 499 larvae tested both heterozygote and homozygote larvae for *cqm1_{REC}* were found (Table 2). After 24 treatments, 16 heterozygotes and one homozygote larva for this allele were detected within 162 individuals and the frequency remained high (Table 2). Sequencing of selected fragments of both sizes confirmed their identity and assured us of the reliability of the PCR assay. With respect to the Cqml expression, larvae lacking expression of Cqml were detected in both evaluations performed and confirmed the presence of resistant larvae in that population, as indicated by the allelic frequency (Table 2).

DISCUSSION

The detection of the *cqm1_{REC}* allele within *C. quinquefasciatus* populations from the state of Pernambuco, Brazil, constitutes the first report of an allele conferring resistance to biolarvicides in mosquito field populations, assessed through a DNA screening procedure. This assay showed that the same resistance-inducing allele is present in populations without a previous history of *B. sphaericus* exposure, Fazenda Nova and Peixinhos, although at this stage it is possible that the slightly higher *cqm1_{REC}* frequency detected in Peixinhos could result from indirect exposure to *B. sphaericus*, favored by the proximity with the treated area of Água Fria. The PCR-based approach also demonstrated that the frequency of the *cqm1_{REC}* allele in the treated area of Água Fria was higher than that in the nontreated populations. This was further corroborated by the presence in Água Fria of individual resistant larvae, homozygotes for the *cqm1_{REC}* allele and not expressing the Cqml α -glucosidase.

Resistance genes of lepidopteran and coleopteran populations exposed to *Bacillus thuringiensis* spraying or to Bt-transgenic crops have been investigated, and the frequency ranges from 10^{-5} to 10^{-1} (1, 2, 5, 6, 14, 16, 19, 35, 36). Global monitoring data on resistance have shown that the frequency of resistance alleles has not increased in pest insects from Bt crop areas, and it is likely that the high-dose refuge strategy has contributed to delaying resistance (21, 34). Most studies used the F2 screen to estimate the frequency of resistance alleles, which is a method based on the bioassay of F2 neonates obtained from isofemale lineages. Recently the first DNA screening for mutants of the cadherin gene associated with Bt cotton resistance of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) was performed, but those alleles were not present in a sample of 5,571 insects from Arizona (36). A similar screening of a retrotransposon insertion in the cadherin gene (*HevCaLP*) associated with *B. thuringiensis* resistance of the lepidopteran *Heliothis virescens* did not detect this insertion among 7,000 individuals, and its frequency was estimated to be 7×10^{-5} (13, 14). The *cqm1_{REC}* allele analyzed in this study was successfully detected through PCR screening in a *C. quinquefasciatus* population without a record of *B. sphaericus* exposure and geographically isolated from those populations that have been exposed, with a frequency of 3×10^{-5} . This finding is in agreement with the previous evidence that genes for resistance to bacterial toxins can be present at detectable frequencies in nontreated populations (12). For instance, the

TABLE 2. Frequencies of *cqm1/cqm1_{REC}* alleles and expression of the Cqml receptor in *Culex quinquefasciatus* larvae from nontreated populations of Fazenda Nova (FN) and Peixinhos (PX) and the *Bacillus sphaericus*-treated population of Água Fria (AF)^a

Colony	No. of treatments	No. of larvae with <i>cqm1</i> genotype				<i>cqm1_{REC}</i> frequency	No. of larvae and Cqml expression status		
		Total	<i>cqm1/cqm1</i>	<i>cqm1/cqm1_{REC}</i>	<i>cqm1_{REC}/cqm1_{REC}</i>		Total	Positive	Negative
FN	0	504	501	3	0	0.0029	507	507	0
PX	0	492	486	6	0	0.0061	374	374	0
AF	13	499	452	41	6	0.053	325	323	2
	24	162	145	16	1	0.055	162	161	1

^a Genotypes for the *cqm1* gene and the Cqml expression profile were determined by diagnostic PCR and in-gel α -glucosidase assays, respectively.

1048 CHALEGRE ET AL.

APPL. ENVIRON. MICROBIOL.

frequency of an allele conferring resistance to Bt poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations that have been not exposed to widespread use of *B. thuringiensis* ranged from 0.011 to 0.0037 (15, 37). A recent work also detected mutations associated with malathion resistance in specimens of the fly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), collected between 1930 and 1949, before the introduction of this insecticide in 1950 (17). The *cqml_{REC}* frequencies in Água Fria samples collected after 13 and 24 treatments were similar, despite additional treatments performed on the second sample and the fact that the bioassay data showed that the RR values at LC₅₀ shifted from 2.7 to 8.4 between the two samples. In this particular case, the RR values do not seem to ensure the increase of selection pressure or indicate resistance, since a previous study of Água Fria has shown similar variations in this parameter (2.7, 7.3, and 4.7), despite the progressively higher numbers of treatments performed (32). It is then possible that the selection pressure has not actually increased during the interval between the collection of the 13- and 24-treatment samples, perhaps due to other factors which can also influence the efficiency of this process, such as the coverage of treatment cycles, updating of new breeding sites, mosquito density, and climatic and other environmental factors. Nevertheless, our approach was not designed to directly evaluate the effect of *B. sphaericus* treatment upon the frequency of the *cqml_{REC}* allele, since samples of the Água Fria population before and after treatment were not available. At this stage it is not possible to infer if the higher frequency observed for the *cqml_{REC}* allele in the treated population is a response to treatment or a reflection of natural variations between different mosquito populations.

Novel approaches are needed to provide information for the management of resistance to bacterial toxins. The knowledge of the initial frequency of resistance alleles in field populations, particularly for those that are inherited recessively, is essential to establish strategies to delay resistance (14, 36, 37). In such cases, heterozygous individuals that emerge gradually in the population under selection cannot be identified by bioassays and resistance allele frequency can increase without being detected. Bioassays are further limited in that they demand large sample size and maintenance of F1 or F2 progenies in the laboratory and assays should be performed under specific conditions to provide reliable data. In the context of *Culex* resistance to *B. sphaericus*, the improvement in DNA screening is needed to track other resistance alleles already described (10, 11), since the PCR used in the study is specific for the *cqml_{REC}* allele. The α -glucosidase in-gel assay can also be useful to detect individuals not expressing *Cqml* whose resistance can be associated with alleles other than *cqml_{REC}*, although this assay is able to detect only homozygous resistant larvae. Both methodologies, despite some limitations, proved to be suitable to screen for *B. sphaericus* resistance, and its association with diagnostic bioassays can increase the ability to detect the frequency of resistant individuals.

Bin toxin constitutes an important resource from the arsenal of environmentally safe insecticidal molecules available. Selection of resistance can be largely minimized through the coordinated use of Bin toxin with other insecticidal proteins, in mixtures or in rotation, in the scope of integrated control programs (22, 39, 40). Monitoring of population susceptibility,

particularly focusing on the frequency of resistance alleles, is essential, and this study demonstrates the effectiveness of molecular tools to determine such frequency in *Culex* natural populations.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, 471911/2006-2) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, APQ 0060-2.02/07).

We thank field teams from FUNASA and CVA (Recife's Department of Health), Frederico Abath (in memoriam), and Eduardo Henrique Rodrigues for advice on diagnostic PCR; Vladimir Silveira Filho for map drawings; and George Diniz for statistical analysis.

REFERENCES

1. Andow, D. A., D. H. Olson, R. L. Hellmich, D. N. Alstad, and W. D. Hutchison. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAb in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93:26–30.
2. Andreadis, S. S., F. Alvarez-Alfageme, I. Sánchez-Ramos, T. J. Stodola, D. A. Andow, P. G. Milonas, M. Savopoulou-Soulanti, and P. Castániera. 2007. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAb in Greek and Spanish population of *Sesamia novagrigiolis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 100:195–201.
3. Arapinis, C., F. de la Torre, and J. Szulmajster. 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Bacillus sphaericus* 1593M gene encoding a 51.4 kD polypeptide which acts synergistically with the 42 kD protein for expression of the larvicidal toxin. *Nucleic Acids Res.* 16:7731.
4. Barbosa, R. M., A. Souto, A. E. Eiras, and L. Regis. 2007. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:523–529.
5. Bentur, J. S., D. A. Andow, M. B. Cohen, A. M. Romera, and F. Gould. 2000. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga inaequalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 93:1515–1521.
6. Bourguet, D., J. Chauflam, M. Séguin, C. Buisson, J. L. Hinton, T. J. Stodola, P. Porter, G. Cronholm, L. L. Buschman, and D. A. Andow. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* 106:1225–1233.
7. Charles, J. F., C. Nielsen-LeRoux, and A. Delécluse. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* 41:451–472.
8. Chevillon, C., C. Bernard, M. Marquine, and N. Pasteur. 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in Southern France. *J. Med. Entomol.* 38:657–664.
9. Darboux, L., C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and D. Pauron. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:981–990.
10. Darboux, L., J.-F. Charles, Y. Pauchet, S. Warot, and D. Pauron. 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9:2022–2029.
11. Darboux, L., Y. Pauchet, C. Castella, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and D. Pauron. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5830–5835.
12. French-Constant, R. H. 2007. Which came first: insecticides or resistance? *Trends Genet.* 23:1–4.
13. Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857–860.
14. Gahan, L. J., F. Gould, J. D. López, S. Micinski, and D. G. Heckel. 2007. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* 100:187–194.
15. Génissel, A., S. Augustin, C. Courria, G. Pilate, P. Lorme, and D. Bourguet. 2003. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. Biol. Sci.* 270:791–797.
16. Gould, F., A. Anderson, A. Jones, D. Smerford, D. G. Heckel, J. D. Lopez, S. Micinski, S. R. Leonard, and M. Laster. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3519–3523.
17. Hartley, C. J., R. D. Newcomb, R. J. Russell, C. G. Young, J. R. Stevens, D. K. Yeates, J. La Salle, and J. G. Oakeshott. 2005. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8757–8762.

18. Hemingway, J., B. J. Beaty, M. Rowland, T. W. Scott, and B. L. Sharp. 2006. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends Parasitol.* 22:308-312.
19. Huang, F., B. R. Leonard, S. H. Moore, D. R. Cook, J. Baldwin, K. V. Tindall, and D. R. Lee. 2008. Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 101:492-498.
20. Lacey, L. A. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *isoleucis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:133-163.
21. Moar, W., R. Roush, A. Shelton, J. Ferré, S. MacIntosh, B. R. Leonard, and C. Abel. 2008. Field-evolved resistance to Bt-toxins. *Nat. Biotechnol.* 16: 1072-1074.
22. Mulla, M. S., U. Thavara, A. Tawatsin, J. Chomposri, and T. Su. 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19:39-46.
23. Nicolas, L., C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles, and A. Delécluse. 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:275-280.
24. Nielsen-LeRoux, C., and J.-F. Charles. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to specific receptor on brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 210:585-590.
25. Nielsen-LeRoux, C., F. Pasquier, J.-F. Charles, G. Sinègre, B. Gaven, and N. Pasteur. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* larvae. *J. Med. Entomol.* 34:321-327.
26. Nielsen-LeRoux, C., J.-F. Charles, I. Thiery, and G. P. Georghion. 1995. Resistance in the laboratory population of *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 228:206-210.
27. Nielsen-LeRoux, C., N. Pasteur, J. Prêtre, J.-F. Charles, H. B. Sheikh, and C. Chevillon. 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West-Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39:729-735.
28. Oliveira, C. M., M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, G. Pei, Z. Yuan, and L. Regis. 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 41:58-64.
29. Pei, G., C. M. Oliveira, Z. Yuan, C. Nielsen-LeRoux, M. H. Silva-Filha, J. Yan, and L. Regis. 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3003-3009.
30. Romão, T. P., K. D. de Melo Chalegre, S. Key, C. F. Ayres, C. M. Fontes de Oliveira, O. P. de-Melo-Neto, and M. H. Silva-Filha. 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273:1556-1568.
31. Silva-Filha, M. H., J.-F. Charles, and C. Nielsen-LeRoux. 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:711-721.
32. Silva-Filha, M. H., K. D. M. Chalegre, D. B. Anastácio, C. M. F. Oliveira, S. B. Silva, R. V. Acioli, S. Bibi, D. C. Oliveira, E. S. M. Parodi, C. A. M. M. Filho, A. F. Furtado, and L. Regis. 2008. *Culex quinquefasciatus* populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol. Control* 44:227-234.
33. Silva-Filha, M. H., N. L., C. M. F. Oliveira, L. Regis, Z. Yuan, C. M. Rico, and C. Nielsen-LeRoux. 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* 241:185-191.
34. Tabashnik, B. E., A. J. Gassmann, D. W. Crowder, and Y. Carrière. 2008. Insect resistance to Bt-crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* 26: 199-202.
35. Tabashnik, B. E., A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y. B. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims, and L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12980-12984.
36. Tabashnik, B. E., J. A. Fabrick, S. Henderson, R. W. Biggs, C. M. Yafuso, M. E. Nyboer, N. M. Manhardt, L. A. Coughlin, J. Sollome, Y. Carrière, T. J. Dennehy, and S. Morin. 2006. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. *J. Econ. Entomol.* 99:1525-1530.
37. Wenes, A. L., D. Bourguet, D. A. Andow, C. Courtin, G. Carre, P. Lorme, L. Sanchez, and S. Augustin. 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* 97:127-134.
38. Wirth, M. C., G. P. Georghion, J. I. Malik, and G. H. Ahra. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 37:524-540.
39. Wirth, M. C., J. A. Jannino, B. A. Federici, and W. E. Walton. 2004. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *J. Med. Entomol.* 41:935-941.
40. Wirth, M. C., Y. Yang, W. E. Walton, B. A. Federici, and C. Berry. 2007. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6066-6071.
41. World Health Organization. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/853.1-24. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Apêndice C – Manuscrito para publicação

Para: Biological Control

Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus*

LILIANE BARBOSA AMORIM^a, CLÁUDIA MARIA FONTES DE OLIVEIRA^a, LÊDA NARCISA REGIS^a, MARIA HELENA NEVES LOBO SILVA-FILHA^a

^aDepartamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

* Autor para correspondência:

Maria Helena N. L. Silva-Filha, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo s/n Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil 50670-420

Telefone: +55-81-21012553

Fax: +55-81-34532449

E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

O principal fator inseticida do *Bacillus sphaericus* (Bs) é a toxina Bin, que reconhece e liga-se especificamente aos receptores Cqm1 presentes no epitélio das larvas. A resistência de *Culex quinquefasciatus* a toxina Bin é devido à ausência do receptor Cqm1, conferida pelo alelo de resistência *cqm1_{REC}* em homozigose, sendo este caráter herdado de forma recessiva, o que favorece o seu manejo. O objetivo do estudo foi analisar a recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) a partir da introdução de indivíduos susceptíveis na proporção de 1:1, e da manutenção da progênie sem pressão de seleção em laboratório. O desempenho da colônia R-IAB59 em relação à fecundidade, fertilidade e peso de pupas foi similar a parental susceptível (S) sugerindo que a resistência parece não acarretar um custo biológico. Amostras de larvas das colônias parentais e das progênies (F1, F3, F5, F7, F9 e F11) foram avaliadas pela susceptibilidade *in vivo*, frequência de expressão do receptor Cqm1 e do alelo *cqm1_{REC}*. Os bioensaios de múltiplas concentrações mostram que houve uma redução significativa da razão de resistência na geração F1, quando comparada com a colônia R-IAB59, em termos de CL₅₀, enquanto que os valores da CL₉₀ mostraram uma queda mais discreta. A frequência de indivíduos S e R, avaliada pelo bioensaio de dose diagnóstica e expressão da α -glicosidase Cqm1, para larvas individuais, variou entre 45 e 55% nas progênies. A frequência do alelo *cqm1_{REC}* nas colônias parentais S e R foi 0,006 e 0,995, respectivamente e manteve-se elevada, entre 0,64 e 0,80, nas progênies, indicando que, apesar da queda do nível de resistência, esta frequência ainda permaneceu elevada, mesmo com ausência de pressão de seleção durante onze gerações. Os dados também apontam que o alelo *cqm1_{REC}* não estaria associado a um importante custo biológico.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*, *Bacillus sphaericus*, resistência, manejo de resistência.

1. Introdução

Bacillus sphaericus (Bs) é um importante entomopatógeno de espécies do complexo *Culex* e é utilizado em programas de controle de vetores em diversos países, inclusive no Brasil. O principal fator tóxico do Bs é o cristal protéico produzido durante a fase de esporulação que contém uma protoxina formada por dois polipeptídeos de 42- (BinA) e 51- (BinB) kDa, que agem em sinergia e, por esta razão, a protoxina é denominada binária (Bin) (Nicolas et al., 1993). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino (≈ 10) e os polipeptídios BinA e BinB são clivados por serina-proteases para atingir a forma de fragmentos ativos de 43- e 39- kDa, respectivamente (Baumann et al., 1985; Broadwell & Baumann, 1987). Em larvas de *C. quinquefasciatus* a toxina Bin liga-se a um receptor específico, denominado “Cqm1”, que é uma α -glicosidase de 60 kDa ligada à membrana celular do epitélio intestinal das larvas por uma âncora do tipo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Nielsen-LeRoux & Charles, 1992; Silva-Filha et al., 1997; Romão et al., 2006).

Apesar da eficácia e do modo seletivo de ação do Bs, foi demonstrado que populações de *Culex* podem desenvolver resistência a este agente, quando submetidas à pressão de seleção (Rao et al., 1995; Silva-Filha et al., 1995; Yuan et al., 2000; Wirth et al., 2000; Pei et al., 2002). Recentemente foi selecionada em nosso laboratório uma colônia de *C. quinquefasciatus* (R-IAB59) com uma razão de resistência da ordem de ≈ 40.000 vezes ao Bs cepa IAB59 (Amorim et al., 2007). Nesta colônia, a resistência à toxina Bin é devido à ausência da α -glicosidase Cqm1, e este mecanismo é causado por uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* (alelo *cqm1_{REC}*) que impede a expressão do receptor Cqm1 na superfície do epitélio, quando presente em homozigose (Chalegre et al., 2009).

Um dos aspectos mais importantes no estudo da resistência é a avaliação de fatores que podem ter um papel na reversão da resistência. Um destes fatores é a introdução de indivíduos susceptíveis (S) na população resistente, visto que a herança da resistência ao Bs é herdada como um caráter recessivo. Neste trabalho, a proposta é analisar o processo de recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *C. quinquefasciatus*, resistente ao Bs IAB59 propiciado pela introdução de indivíduos susceptíveis na colônia que foi mantida sob condições de laboratório sem pressão de seleção. A susceptibilidade foi avaliada através de diferentes métodos para o monitoramento. O primeiro método foram os bioensaios de susceptibilidade *in vivo* das larvas ao Bs para estabelecer as doses letais para 50 (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas. Como a resistência da colônia R-IAB59 à toxina Bin é conferida pelo alelo *cqm1_{REC}*, será possível avaliar a resistência através de ferramentas moleculares que foram

desenvolvidas recentemente por nossa equipe (Chalegre et al., 2009). Uma delas é o ensaio bioquímico que permite avaliar se os indivíduos analisados expressam a α -glicosidase Cqm1, que é o receptor da toxina Bin e, a segunda é um método de PCR-específico para determinar a frequência do alelo *cqm1_{REC}* e o genótipo dos indivíduos (Chalegre et al., 2009; Romão et al., 2006).

Alguns trabalhos mostraram que a evolução da resistência dos insetos aos inseticidas pode ser influenciada pelo custo biológico, o qual está frequentemente associado aos genes de resistência na ausência da pressão de seleção (Roush & Plapp, 1982; Rodcharoen & Mulla, 1997; Berticat et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Agnew et al., 2004; Bourguet et al., 2004). Por isso, a primeira etapa do trabalho foi avaliar se a resistência da colônia R-IAB59 estaria associada a um custo biológico. Para tal, parâmetros como fecundidade, fertilidade e estado nutricional das pupas foram avaliados entre as colônias susceptível (S) e R-IAB59, a fim de avaliar se a presença dos genes de resistência na colônia acarreta ou não na diminuição do desempenho biológico. Após o cruzamento de larvas resistentes e suscetíveis ao Bs na proporção de 1:1, a suscetibilidade da progênie será mantida na ausência de pressão de seleção avaliada ao longo de onze gerações e o seu perfil de susceptibilidade ao Bs será avaliada através de bioensaios *in vivo* e ferramentas moleculares.

2. Material e métodos

2.1 Colônias de insetos

Neste estudo foram utilizadas três colônias de *Culex quinquefasciatus* e uma de *Aedes aegypti*. As colônias de *C. quinquefasciatus* são a susceptível ao Bs (S), a resistente ao Bs IAB59 selecionada em laboratório com razão de resistência de ≈ 40.000 vezes (Amorim et al., 2007). A colônia IAB59-Rev, que foi formada a partir do cruzamento de 1.260 indivíduos das parentais S e R-IAB59. A colônia foi mantida sob condições de laboratório durante onze gerações para a avaliação. Uma colônia de *A. aegypti* (RecL), foi usada para obter amostras de DNA utilizadas como controle negativo na reação de PCR usada para detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}* descrita no item 2.5.

Todas as colônias foram mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). As formas pré-imaginais, larvas e pupas, foram mantidas em recipientes com água de clorada e alimentadas com ração para gatos. Os adultos foram alimentados com uma

solução de sacarose a 10% e as fêmeas fizeram o repasto sanguíneo em galinhas (*Gallus gallus*).

2.2 Avaliação de parâmetros biológicos

Os parâmetros analisados foram: fecundidade a partir do número médio de ovos por jangada e, a fertilidade pelo número médio de larvas de 1º estágio que eclodiram das jangadas, além do estado nutricional das pupas. Apenas as gerações parentais foram analisadas em relação a estes parâmetros. As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste T com $P= 0,05$, usando o software M. S. Excel.

2.3 Larvicidas à base do Bs

Para avaliação da susceptibilidade *in vivo* das larvas feita neste trabalho, foram utilizados larvicidas a base do Bs cepas IAB59 e 2362, produzidos e gentilmente cedidos pelo Bioticom/Nectar-UFPE (Recife, Brasil). Antes do seu uso, cada lote fornecido foi testado para avaliar sua atividade tóxica para a colônia susceptível de referência (S), segundo o protocolo estabelecido pela WHO (1985).

2.4 Bioensaios de múltiplas concentrações (BMC)

Os BMC foram realizados segundo o protocolo estabelecido pela WHO/Institut Pasteur (1985). Grupos de 20 larvas do 4º estágio foram expostos, em recipientes plásticos com 100 ml de água destilada, sendo testadas 2 replicatas de seis diferentes concentrações que provocaram mortalidade entre 20 e 100%, além do grupo controle não tratado. O registro da mortalidade obtida nos testes foi feito após 48 horas de exposição das larvas. Cada bioensaio foi repetido 2 ou 3 vezes e, a CL_{50} e CL_{90} , após 48 horas, foram determinadas pela análise de próbites (Finney, 1971) usando o programa SPSS 8.0 para Windows. A razão de resistência (RR) foi obtida a partir razão entre a CL da colônia investigada e a CL da colônia susceptível de referência. A susceptibilidade das larvas das colônias parentais (S e R-IAB59) e das progênes (F1- F3- F5- F7 e F9) ao Bs cepa IAB59 e 2362 foi avaliada por este ensaio.

2.5 Bioensaio de dose diagnóstica (BDD)

Os BDD foram realizados utilizando placas com 24 orifícios, cada um contendo uma larva de 4º estágio do *C. quinquefasciatus* em 2 mL de água tratada com uma concentração diagnóstica (125 mg/L) do Bs cepa 2362. Esta concentração é cerca de 1.000 vezes superior a CL_{90} desta biomassa para larvas da colônia S. A leitura da mortalidade foi analisada após 48 h, sendo estabelecida a frequência de larvas sobreviventes. No ensaio, o grupo tratado foi constituído de 200 larvas individuais além do grupo controle com 24 larvas não tratadas e, o ensaio foi repetido três vezes para cada colônia analisada.

2.6 Expressão do receptor α -glicosidase *Cqm1* em larvas

A avaliação da expressão da α -glicosidase *Cqm1*, receptor da toxina Bin codificado pelo gene *cqm1*, foi realizada através de ensaios enzimáticos *in gel*, como descrito previamente (Romão et al., 2006), utilizando amostras dos mesmos indivíduos analisados pela PCR específica. Neste ensaio a amostra de cada larva foi constituída do tórax e abdômen.

2.7 PCR alelo específica

O DNA genômico de larvas do 4º estágio foi extraído individualmente da cabeça de larvas utilizando o reagente DNazol® (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, seguido pela precipitação com etanol e recuperação em recuperado em 50 μ l TE® (Invitrogen). As reações de PCR, foram realizadas segundo Chalegre et al. (2009). Nos ensaios, o controle positivo foram reações feitas com amostras de DNA molde de larvas susceptíveis e resistentes a partir das quais foram amplificados fragmentos de 208 e 189 pares base, respectivamente. Os controles negativos foram uma amostra com o DNA molde do *A. aegypti*, a partir do qual não é possível a amplificação deste fragmento gênico, e uma amostra sem conter DNA molde.

3. Resultados

3.1 Desempenho biológico

Os resultados obtidos mostram quanto à fecundidade, foi observada uma redução discreta na colônia resistente, com número médio de ovos por jangada de 166,5 para colônia R-IAB59 comparada com 170,8 para a colônia S, a partir da avaliação de uma amostra de 44 jangadas obtidas de cada colônia analisada, sem diferença estatística (teste T, $P = 0,49$) (Tabela 1). O parâmetro de fertilidade, representado pelo número médio de larvas de 1º

estádio que eclodiram a partir das jangadas analisadas, foi semelhante nas colônias S e R-IAB59 (teste T, $P = 0,79$). Entre as colônias, foi registrada uma média de cerca de 160 larvas do 1º estágio obtida por jangada (Tabela 1). O peso médio das pupas foi similar entre as colônias S e R-IAB59, sendo detectada uma média de 0,044 g para *pools* de 25 pupas machos (teste T, $P = 0,16$) e 0,07 g para *pools* de 25 pupas fêmeas (teste T, $P = 0,3$), que são morfológicamente maiores do que os machos (Tabela 1). Devido à ausência de diferenças de desempenho entre as colônias parentais, as progênies da colônia IAB59-Rev não foram analisadas em relação a este parâmetro. Esta avaliação mostra que, em relação aos parâmetros analisados, os indivíduos da colônia R-IAB59 possuem um desempenho similar aos indivíduos susceptíveis.

3.2 Susceptibilidade ao *Bs* cepa IAB59

A avaliação foi feita para determinar a susceptibilidade das colônias à cepa IAB59. A colônia parental susceptível (S) apresentou uma concentração letal para 50% das larvas (CL_{50}) de 0,0018 mg/L (Tabela 2). A avaliação da colônia parental resistente (R-IAB59) mostrou um elevado nível de resistência com $CL_{50} = 27,6$ mg/L e razão de resistência (RR) foi 15.372 (Tabela 2). A CL_{50} inicialmente observada na geração F1 (0,372 mg/L) mostrou uma grande redução e o valor de RR foi 206,7, cerca de 70 vezes inferior à RR da colônia parental resistente (Tabela 2). A colônia foi mantida até a geração F11 e, as análises feitas nas progênies F3, F5, F7 e F9 mostraram valores variáveis de CL_{50} que se mantiveram em um patamar baixo (Tabela 2). A análise da CL_{90} mostrou uma diferença de comportamento em relação à CL_{50} , pois a redução em relação à CL_{90} da parental resistente foi discreta e um elevado nível de RR foi mantido em todas as gerações (Tabela 2). Em alguns casos a curva de dose-mortalidade obtida não foi adequada para a determinação da CL_{90} pelo programa SPSS 8.0 e, o valor foi indicado a partir da observação direta dos dados da curva. Isto ocorreu devido à composição heterogênea de indivíduos susceptíveis e resistentes nas progênies, como será demonstrado na análise realizada no item 8.3.

3.3 Susceptibilidade ao *Bs* cepa 2362

As colônias S e R-IAB59 foram avaliadas em relação a sua susceptibilidade ao *Bs* 2362, que apresenta apenas a toxina Bin como fator tóxico e, portanto um elevado nível de resistência cruzada com a cepa IAB59. A colônia parental S apresentou uma CL_{50} de 0,032 mg/L (Tabela 3), enquanto que a colônia R-IAB59 apresenta um alto nível de resistência à toxina Bin com uma CL_{50} de 280,9 mg/L e RR de 8.778 (Tabela 3). Na primeira progênie

analisada, a F3, houve uma queda da CL_{50} e a RR foi de 74,3. Nas gerações subsequentes (F5, F7 e F9) a RR mostrou uma redução progressiva (Tabela 3). A análise mostrou diminuição da CL_{90} , entretanto os valores elevados de RR ainda foram mantido ao longo das gerações (Tabela 3).

3.4 *Frequência de indivíduos resistentes através bioensaio de dose diagnóstica*

A colônia parental S foi avaliada e, na amostra de 1.824 larvas, 99,7% dos indivíduos analisados mostram fenótipo susceptível e apenas um indivíduo sobrevivente foi detectado (Tabela 4). A colônia parental R-IAB59 apresentou 96% indivíduos resistentes em uma amostra de 576 larvas (Tabela 4). Diferentemente das colônias parentais, a análise das progênes da colônia IAB59-Rev mostrou valores variáveis entre 45-55% de indivíduos susceptíveis e resistentes em amostras de cerca de 600 larvas de cada progênie analisada (Tabela 4). Cada geração mostrou estar constituída de indivíduos susceptíveis e resistentes aproximadamente, na razão de 1:1, e esta composição, apesar de algumas variações observadas, manteve-se estável até a F11 (Tabela 4).

3.5 *Frequência expressão da α -glicosidase Cqm1*

As larvas susceptíveis mostraram um perfil reprodutível de quatro bandas catalíticas, dentre elas a α -glicosidase Cqm1 que migra com peso aparente de 83 kDa, sob condições semi-desnaturantes (Romão *et al.*, 2006). Larvas resistentes à toxina Bin, que portam o alelo *cqm1_{REC}* em homozigose apresentaram um perfil similar ao de larvas sensíveis, exceto pela ausência da banda catalítica correspondente à α -glicosidase Cqm1. A análise da colônia S mostrou que a totalidade de uma amostra de 374 indivíduos apresentou a α -glicosidase Cqm1, contra a maioria de larvas com perfil resistente, na colônia R-IAB59. Nesta foram avaliados 287 indivíduos e a frequência do receptor foi de 0,03, pois apenas nove larvas apresentaram a expressão da α -glicosidase Cqm1 sendo as demais caracterizadas pela ausência da α -glicosidase Cqm1 (Tabela 4). A frequência de larvas que expressam a α -glicosidase Cqm1 nas progênes analisadas nas gerações F1, F5, F7, F9 e F11 variou entre 0,42 e 0,58 nas amostras de cerca de 150 indivíduos analisados por geração (Tabela 4). Na progênie F3, a frequência foi diferente das demais análises, sendo a frequência do Cqm1 mais baixa, cerca de 0,3 (Tabela 4).

3.4.3 Frequência dos alelos *cqml* e *cqml_{REC}*

Na colônia S, seis larvas apresentam o alelo *cqml* em heterozigose, dentre 486 indivíduos, demonstrando a baixa frequência do alelo *cqml_{REC}* (0,0061) (Tabela 4). Na colônia R-IAB59 foram avaliados 106 indivíduos, com 105 homozigotos para o alelo *cqml_{REC}* e apenas um heterozigoto, sendo a frequência do alelo *cqml_{REC}* de 0,995 (Tabela 4). Os genótipos nas progênies analisadas, representara cerca de 42-58% dos indivíduos susceptíveis de cada geração, sendo composta por homozigotos e a maior parte de heterozigotos (Tabela 4). A progênie F3 apresentou resultados em acordo com aqueles observados na expressão do receptor Cqm1, embora as frequências observadas nesta geração tenham sido diferentes das demais (Tabela 4). Os dados desta análise do genótipo para o locus do gene *cqml* corroboram os dados dos bioensaios diagnósticos e a frequência da α -glicosidase Cqm1, e mostram que a frequência de larvas resistentes é mantida entre 45-55% nas progênies. A frequência do alelo *cqml_{REC}*, que variou entre 0,65 e 0,83 e manteve-se elevada até a progênie F11 (Tabela 4).

4. Discussão

A resistência a inseticidas pode estar associada a um custo no desempenho biológico, porém, no presente estudo, a colônia R-IAB59 não mostrou redução significativa comparada à colônia susceptível (S), em relação aos parâmetros de fecundidade, fertilidade e estado nutricional das pupas. Oliveira et al. (2003) também não observaram diferenças na fecundidade e fertilidade dos indivíduos da colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs cepa 2362, em relação à colônia S. Porém, Rodcharoen & Mulla (1997) mostraram que houve uma redução significativa do número médio ovos por jangada e da taxa de eclosão de larvas em uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente ao Bs cepa 2362. O peso médio de pupas foi avaliado para inferir o estado nutricional do inseto e, neste estudo mais uma vez não foram encontradas diferenças significativas entre as colônias S e R-IAB59. Por outro lado, este parâmetro pode ser bastante afetado como no caso de uma colônia do lepidóptero *Trichoplusia ni* resistente ao *B. thuringiensis* (Bt) que apresentou uma diminuição de 20 e 50%, respectivamente, do peso médio de pupas e larvas de primeiro estágio (Janmaat & Myers, 2003). Embora o custo biológico da resistência de *Culex* à toxina Bin não tenha sido exaustivamente avaliado neste trabalho, o conjunto de dados obtidos apontam que, comparando com outros relatos, a colônia resistente sob estudo não apresenta uma redução evidente do seu desempenho e, como conseqüência, tem sido mantida sob em laboratório há diversos anos (Amorim et al., 2007).

Na segunda etapa deste estudo a avaliação recuperação da susceptibilidade da colônia R-IAB59 mostrou que, após a introdução de indivíduos susceptíveis, a CL_{50} da cepa IAB59 para a progênie diminuiu e houve uma redução do nível de resistência, que se manteve ao longo das gerações. A CL_{90} sofreu uma redução discreta em relação à colônia parental e a RR manteve-se elevada, indicando a presença de grande número de larvas resistentes, confirmada posteriormente pelos outros métodos. A susceptibilidade à cepa 2362 apresentou um comportamento semelhante, havendo uma redução importante da CL_{50} , porém discreta da CL_{90} . A CL_{90} foi um parâmetro que mostrou com maior fidelidade o fenótipo das progênies, visto que o seu valor elevado apontou que havia um grande contingente de larvas resistentes nas progênies. A importante redução da CL_{50} é devido à presença de cerca de 45-55% de larvas susceptíveis nas progênie, graças à herança recessiva da resistência ao Bs IAB59 e 2362 (Amorim et al., 2007; Oliveira et al., 2004).

A avaliação da resistência através dos valores de CL_{50} e CL_{90} mostrou limitações e, por esta razão, foram realizados bioensaios diagnósticos. Estes determinaram que a frequência de indivíduos susceptíveis e resistentes na progênie da colônia IAB59-Rev mostrou valores variáveis entre 45-55% em todas as gerações e auxiliou a interpretação dos valores das CLs. Os dados desta análise também confirmaram que os indivíduos heterozigotos são susceptíveis à toxina Bin e a resistência é recessiva, conforme demonstrado em estudos prévios (Amorim et al., 2007). A utilização deste ensaio para determinar a frequência de indivíduos resistentes é de grande importância, pois este é o principal fator que determina a evolução da resistência numa população de insetos (Génissel et al., 2003; Tabashnik et al., 2000; Wenes et al., 2006). Entretanto, é importante salientar que nos bioensaios de dose diagnóstica é difícil estimar a frequência de alelos de resistência recessivos, pois esta é muito baixa e, além disso, não é possível detectar heterozigotos para o alelo de resistência por este método.

Outra ferramenta diagnóstica, o ensaio enzimático que detecta a expressão da α -glicosidase Cqm1, mostrou uma correlação direta com a frequência de indivíduos S e R obtidas nos ensaios *in vivo* de dose diagnóstica, com valores entre 45 e 55%. Os dados mostram que a expressão do receptor Cqm1 pode ser utilizada para o diagnóstico de larvas que tenham como mecanismo a ausência do sítio-alvo da toxina Bin, associada a qualquer alelo de resistência. Semelhante ao bioensaio de dose diagnóstica, este método não detecta os indivíduos heterozigotos na população. Neste contexto, a análise PCR-específica foi extremamente útil, pois revelou o genótipo dos indivíduos analisados que não puderam ser determinados pelos métodos anteriores. A frequência do alelo $cqm1_{REC}$, nas colônias parentais S e R-IAB59 foi 0,006 e 0,995, respectivamente, refletindo os fenótipos resistente e

susceptível destas colônias. O alelo *cqmI_{REC}* permaneceu com uma frequência elevada após 11 gerações, graças à presença de cerca de 50% de indivíduos homozigotos resistentes e 30% de heterozigotos. A grande vantagem deste método é a detecção direta do alelo *cqmI_{REC}*, cuja presença não tinha sido evidenciada pelos outros ensaios.

Os resultados deste trabalho mostram que a associação das ferramentas moleculares aos bioensaios teve grande importância na caracterização da resistência, sobretudo a PCR que tem uma enorme vantagem por sua capacidade de detecção precoce dos indivíduos heterozigotos. Esta avaliação também demonstrou de forma clara que, mesmo após 11 gerações na ausência de pressão de seleção, a frequência do alelo *cqmI_{REC}* manteve-se estável, diferente de outros estudos em que os alelos de resistência têm sua frequência reduzida, pois são desfavorecidos nesta situação por estarem associados ao custo biológico (Tabashnik et al., 1994; Wilson et al., 2007; Anilkumar; Pusztai-Carey & Moar, 2008; Gassman; Carrière & Tabashnik, 2009). No nosso estudo, a análise preliminar indica que o alelo de resistência *cqmI_{REC}* parece não estar associado ao custo biológico, que seria um fator crítico para provocar sua redução na ausência de pressão de seleção e, a ausência de custo biológico corrobora os dados que mostram a manutenção do alelo na progênie sob esta condição. Estudos recentes demonstram que alguns alelos de resistência podem estar presentes em uma frequência detectável em populações que nunca tiveram contato com o agente de controle, contrariando a tese de que tais alelos são raros e de difícil detecção sem pressão de seleção (Bourguet et al., 2003; Génissel et al. 2003; Chalegre et al., 2009;). Estes achados deram subsídio à hipótese de que alguns alelos de resistência podem ocorrer como polimorfismos balanceados na população, ou seja, a seleção contra e a favor do alelo seria igual e desta forma a mutação pode ser mantida na população. Por esta razão, estes genes não estariam associados a importantes efeitos negativos no desempenho biológico dos indivíduos, sendo mantidos na população (French-Constant, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo sobre a reversão da resistência e a frequência dos genes que conferem esta resistência são importantes para definir estratégias de manejo. O alelo *cqmI_{REC}* possivelmente não confere custo biológico nas populações resistentes e pode manter-se na população, caso não haja estratégias adequadas para a diminuição de sua frequência e/ou fatores populacionais e ambientais que favoreçam a sua redução.

Agradecimentos

Pelo apoio do projeto CNPq 471911/2006-2, a CAPES por ter concedido a bolsa de estudo e CPqAM-Fiocruz onde foi desenvolvido o trabalho.

Referências

- Agnew, P., Berticat, C., Bedhomme, S., Sidobre, C. & Michalakis, Y. (2004) Parasitism increases and decreases the cost of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution*, **58**, 579-586.
- Amorim, L.B., de Oliveira, C.M.F., Rios, E.M., Regis, L. & Silva-Filha, M.H.N.L. (2007) Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* IAB59 needs long term selection pressure. *Biol. Control*, **42**, 155-160.
- Anilkumar, K.J. ; Pustzai-Carey, M. & Moar, W.J. (2008) Fitness costs associated with Cry1Ac-resistant *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Noctuidae) : a factor countering selection for resistance to Bt cotton ? *J. Econ. Entomol.*, **101**, 1421-1431.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J. & Bowdith, R. D. (1985) Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.*, **163**, 738-747. 1985.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. & Chevillon, C. (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens*. *Genetical Research*, **79**, 41-47.
- Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C. & Raymond, M. (2004) Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, **58**, 128-135.
- Broadwell, A.H. & Baumann, P. (1987) Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1333-1337.
- Chalegre, K.D.M., Romão, T.P., Amorim, L.B., Anastacio, D.B., de Barros, R.A., de Oliveira, C.M.F., Regis, L., de-Melo-Neto, O.P. & Silva-Filha, M.H.N.L. (2009) Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1044-1049.
- Finney, D.J. (1971) *Probit analysis*. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- French-Constant, R.H. (2006) Which came first: insecticide or resistance? *Trends in Genetics*, **23**, 1-4.
- Génissel, A., Augustin, S., Courtin, C., Pilate, G., Lorme, P. & Bourguet, D. (2003) Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. Roy. Soc. London*, **270**, 791-797.
- Janmaat, A.F. & Myers, J. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. Lond.*, **270**, 2263-2270.

- Nicolas, L., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F. & Delecluse, A. (1993) Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **106**, 275-280.
- Nielsen-LeRoux, C. & Charles, J.F. (1992) Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brushborder membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 585-590.
- Oliveira, C.M.F.de, Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Pei, G., Yuan, Z. & Regis, L. (2003) Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **19**, 125-129.
- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **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. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **11**, 1-5.
- Rodcharoen, J. & Mulla, M.S. (1997) Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. *J. Med. Entomol.*, **34**, 5-10.
- 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.
- Roush, R. T. & Plapp-Jr, F. W. (1982) The effects of insecticide resistance on the biotic potential of house flies. *J. Econ. Entomol.*, **75**, 708-713.
- 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). *J. Econ. Entomol.*, **88**, 525-530.
- 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. larvae. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 754-761.
- Silva-Filha, M.H. & Regis, L. (1997) Reversal of low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of the southern house mosquito (Diptera:Culicidae) from an urban area of Recife, Brazil. *J Econ Entomol.*, **90**, 299-303.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Groeters, F.R., Moar, W.J., Johnson, M.W., Luo, K. & Adang, M.J. (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4120-4124.
- Tabashnik, B.E., Pati, A.L., Dennehy, T.J., Liu, Y.-B., Carrière, Y., Sims, M.A. & Antilla, L. (2000) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 12980-12984.

- Wenes, A.-L., Bourguet, D., Andow, D.A., Courtin, C., Carré, G, Lorme, P., Sanchez, L. & Augustin, S. (2006). Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity*, **97**, 127-134.
- 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.
- Wilson, M., Moshitzky, P., Laor E., Ghanim, M., Horowitz, A.R. & Morin, S. (2007) Reversal of resistance to pyriproxyfen in the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, **63**, 761-768.
- 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. *J. Med. Entomol.*, **37**, 534-540.
- 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 Sci. Technol.*, **10**, 43-51.

Tabela 1. Desempenho biológico de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (S) e uma resistente ao *Bacillus sphaericus* IAB59 (R-IAB59), avaliado por parâmetros como fecundidade, fertilidade e peso médio de pupas.

Colônia	Fecundidade		Fertilidade		Peso de pupas (g) ^b			
	Nº de ovos / jangada		Nº L1 ^a / jangada		♂		♀	
	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP
S	7.514	170,8 ± 27,4	7.103	161,4 ± 30,2	500	0,044 ± 0,003	250	0,07 ± 0,007
R-IAB59	7.328	166,5 ± 29,6	7.026	159,7 ± 30,3	500	0,043 ± 0,003	250	0,07 ± 0,005
Valor de P^c		0,49		0,79		0,16		0,30

^aLarva de 1º estágio

^bO peso foi avaliado em 20 *pools* de 25 pupas machos e em 10 *pools* de 25 pupas fêmeas.

^cValores de P ≥ 0,05: não há diferença entre as médias, para o teste T de *student*.

Tabela 2. Atividade do *Bacillus sphaericus* (Bs) cepa IAB59 para larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e das progênies (F1-F9) resultantes do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.

Geração	Nº de ensaios	Nº de larvas	CL ₅₀ (95% IC) ^a	RR CL ₅₀ ^b	CL ₉₀ (95% IC) ^a	RR CL ₉₀ ^b
S	3	1.140	0,0018 (0,0013 – 0,0034)	1	0,014 (0,0061 – 0,31)	1
R-IAB59	3	640	27,6 (22,5 – 34,7)	15.372	98,7 (69,6 – 164,3)	7.050
F1	3	1.120	0,372 (0,18 – 0,78)	206,7	17,5 (14,9 – 93)	1.250
F3	3	1.080	0,063 (0,061 – 0,78)	35,0	~ 36,0 ^c	2.571
F5	3	840	0,041 (0,008- 0,4)	22,8	~ 12,0 ^c	857,1
F7	3	1.000	0,07 (0,034 – 0,17)	38,9	18,4 (5,1 – 368,6)	1.314
F9	2	600	0,12 (0,06 – 0,23)	66,7	52,6 (11,3 – 582,9)	3.057

^a Concentração letal (mg/L) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas tratadas após 48 h e, intervalo de confiança (IC) de 95%.

^b RR: Razão de resistência entre a CL para a colônia sob estudo e a respectiva CL para a colônia S.

^c O valor da LC₉₀ foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva de dose-mortalidade.

Tabela 3. Atividade do *Bacillus sphaericus* (Bs) cepa 2362 para larvas de *Culex quinquefasciatus* das colônias parentais susceptível (S) e resistente ao Bs IAB59 (R-IAB59) e de suas progênes resultante do cruzamento entre indivíduos destas colônias, na proporção de 1:1.

Geração	Nº de ensaios	Nº de larvas	CL ₅₀ ^a (95% IC)	RR ^b CL ₅₀	CL ₉₀ ^a (95% IC)	RR ^b CL ₉₀
S	3	1.140	0,032 (0,016 – 0,066)	1	0,136 (0,083 – 0,371)	1
R-IAB59	2	560	280,9 (85,1 – 585,6)	8.778	491,1 (315,8 – 2.020,8)	3.611
F1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F3	2	560	2,38 (0,97 – 11,3)	74,3	> 60,0 ^c	> 450,0 ^c
F5	3	640	1,15 (0,31- 22,9)	35,9	> 100,0 ^c	> 735,0 ^c
F7	2	600	0,086 (0,03 – 0,2)	2,68	49,7 (11,4 – 493)	365,0
F9	2	600	0,067 (0,03 – 0,1)	2,9	> 50,0 ^c	> 366,0 ^c

^a Concentração letal (mg/L) para 50% (CL₅₀) ou 90% (CL₉₀) das larvas tratadas após 48 h.

^b RR: Razão de resistência entre a CL para a colônia sob estudo e àquela para a colônia S.

^c O valor da LC₉₀ foi estimado a partir da observação direta dos dados da curva dose-mortalidade.

ND: Não determinado.

Tabela 4 – Avaliação da frequência de larvas de *Culex quinquefasciatus* susceptíveis (S) e resistentes (R) ao *Bacillus sphaericus* (Bs) por ensaios de susceptibilidade *in vivo* ao Bs 2362, expressão da α -glicosidase Cqm1 e reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para detecção dos alelos *cqm1/cqm1_{REC}*. Foram analisadas as gerações parentais susceptível (S) e resistente ao Bs (R-IAB59), bem como as progênes (F1, F3, F5, F7, F9 e F11) resultantes do cruzamento de indivíduos destas colônias na proporção de 1:1.

Geração	Susceptibilidade ao Bs			Expressão Cqm1			Detecção dos alelos <i>cqm1/cqm1_{REC}</i>				
	Frequência			Frequência			Genótipo				
	N	S	R	N	S	R	N	<i>cqm1</i> <i>cqm1</i>	<i>cqm1</i> <i>cqm1_{REC}</i>	<i>cqm1_{REC}</i> <i>cqm1_{REC}</i>	Frequência <i>cqm1_{REC}</i>
S	1.824	0,997	0,003	374	1	0	492	486	6	0	0,0061
R-IAB59	576	0,04	0,96	287	0,03	0,97	106	0	1	105	0,99
F1	ND	ND	ND	159	0,53	0,47	159	10	75	74	0,70
F3	648	0,45	0,55	129	0,28	0,72	129	8	28	93	0,83
F5	617	0,54	0,46	144	0,44	0,56	144	19	44	81	0,73
F7	624	0,53	0,47	135	0,50	0,50	135	26	41	68	0,65
F9	657	0,50	0,50	115	0,42	0,58	115	11	37	67	0,74
F11	576	0,55	0,45	69	0,43	0,57	69	6	24	39	0,74

N = nº de larvas de 4º estágio.

Apêndice D – Participação em cursos, congressos e resumos publicados

I Workshop Interno dos Serviços de Referência do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, no dia 06 de maio de 2008.

III Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais, realizado de 02 a 05 de Setembro de 2008, em Recife, Pernambuco.

II Curso de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais, realizado em Recife-PE, no período de 25 de agosto a 02 de setembro de 2008, com carga horária de **45 horas**.

Monitor da Tenda da Ciência da Fiocruz Pernambuco (IAM/Fiocruz) como parte da Caravana da Ciência, no dia 22 de outubro de 2008, durante a V Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.

Monitor da Tenda da Ciência do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ como parte da Caravana da Ciência, nos dias 30 de setembro, 03 e 07 de outubro de 2007, durante a IV Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.

Resumos publicados

1. CHALEGRE, K. D. M., ROMÃO, T. P., AMORIM, L. B., OLIVEIRA, C. M. F. de, MELO NETO, O. P. de, SILVA FILHA, M. H. N. L. Detecção molecular de alelo resistência ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* em populações do vetor *Culex quinquefasciatus*. In: XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2008, Uberlândia. **Resumos do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2008.

2. AMORIM, L. B.; OLIVEIRA, C. M. F.; SILVA FILHA, M. H. N. L. Desempenho biológico e análise molecular de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus* IAB59. In: X Simpósio de Controle Biológico, 2007, Brasília. **Resumos do X Simpósio de Controle Biológico**, 2007.

3. CHALEGRE, K. D. M., AMORIM, L. B., OLIVEIRA, C. M. F. de, ROMÃO, T. P., MELO NETO, O. P. de, 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**, 2007.

ANEXOS**Anexo A – Parecer do CEP/CPqAM**

Título do Projeto: Reversão da Resistência de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* cepa IAB59: Análise biológica e molecular de um modelo.

Pesquisador responsável: Liliane Barbosa Amorim.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 19/08/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 91/08

Registro no CAAE: 0090.0.095.000-08

PARECER Nº 066/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 04 de setembro de 2008.


Dr. Luiza Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ