



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



UFPE

**Mecanismo molecular da resistência de uma colônia de
Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) ao *Bacillus
sphaericus***

Mestranda: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

**Local de desenvolvimento: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- Fiocruz
Departamentos de Entomologia e Microbiologia**

**Recife
2005**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Mecanismo molecular da resistência de uma
colônia de *Culex quinquefasciatus* (Diptera:
Culicidae) ao *Bacillus sphaericus***

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em genética da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE para obtenção do grau de mestre em genética, área de concentração biologia molecular

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientadoras: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha e Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Tatiany Patrícia Romão Pompílio De Melo

RECIFE

2005

Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de
Mecanismo molecular da resistência de uma
colônia de *Culex quinquefasciatus* (Diptera :
Culicidae) ao *Bacillus sphaericus* / Tatiany Patrícia
Romão Pompílio de Melo. – Recife : O Autor, 2005
vii, 81 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Genética, 2004.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Genética – Biologia molecular. 2. *Culex quinquefasciatus* (Diptera Culicidae) – Controle biológico de vetores – Resistência à bactéria entomopatogênica *Bacillus sphaericus*. 3. Receptor da toxina binária do *Bacillus sphaericus* – Estrutura da sequência do gene. 4. Proteína Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1) – Expressão da proteína.
I. Título.

577.21
572.8633

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-377

**MECANISMO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE UMA COLÔNIA DE
CULEX QUINQUEFASCIATUS (DIPTERA: CULICIDAE) AO *BACILLUS*
*SPHAERICUS***

Tatiany Patrícia Romão Pompílio De Melo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em
Genética

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Banca examinadora:

Dr. André Freire Furtado **(Titular)**

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr **(Titular)**

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath **(Titular)**

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior **(Titular)**

UFPE – Departamento de Genética

Dra. Alzira de Almeida **(Suplente)**

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Laura Helena Vega Gonzales Gil **(Suplente)**

FIOCRUZ – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Data da defesa: 23 de março de 2005

**Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo**

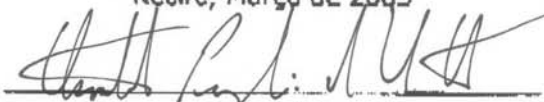
**"MECANISMO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE UMA COLÔNIA DE
CULEX QUINQUEFASCIATUS (DIPTERA: CULICIDAE) AO BACILLUS
SPHAERICUS"**

Área de Concentração: BIOLOGIA MOLECULAR

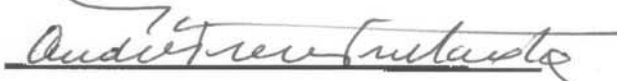
**A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a
presidência do primeiro, considera a candidata**

Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo como aprovada.

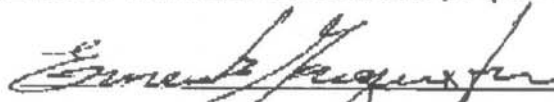
Recife, Março de 2005



Orientador. Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (CPqAM- FIOCRUZ)



Membro Externo: Dr. André Freire Furtado (CPqAM- FIOCRUZ)



Membro Externo: Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr (CPqAM- FIOCRUZ)



Membro Externo: Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (CPqAM- FIOCRUZ)



Membro Interno: Dr Marcos Antônio de Moraes Jr (UFPE)

Ao meu marido Osvaldo pelo incentivo, companheirismo, amizade e orientação recebidos a cada novo desafio e pelo grande amor e dedicação em todos os nossos momentos pessoais e profissionais. Aos meus filhos Caio e Lara pela carinhosa e alegre presença em minha vida.

Maravilhas nunca faltam ao mundo; o
que sempre falta é a capacidade de
sentí-las e admirá-las

Agradecimentos

Ao meu orientador pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Às minhas co-orientadoras Dra. Maria Helena N. L. Silva-Filha e Dra. Constância Ayres pela confiança, apoio e orientação a cada novo desafio.

A todos os meus amigos do Curso de Mestrado em Genética pela amizade e união.

A todos os meus amigos do Departamento de Entomologia e Departamento de Microbiologia, estagiários, funcionários e técnicos pela agradável companhia e cooperação nos momentos difíceis.

Às estudantes de iniciação científica Tamara De'carli e Danielle Moura pelo apoio, amizade e compreensão.

Ao meu amigo de mestrado Éden Ribeiro. Desejo-lhe sucesso em todos os momentos de sua vida.

Às instituições que deram infraestrutura e financiamento, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ, CAPES e CNPq.

Aos meus familiares pelo carinho e amizade.

Ao meu marido pelo amor e companheirismo indispensáveis.

A todas as forças da natureza que ajudaram na concretização deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
RESUMO	vii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	4
1.1. Taxonomia, distribuição geográfica e biologia	4
1.2. Relação com a transmissão da filariose e de arboviroses	6
2. Controle químico de vetores	8
3. Controle biológico	9
4. <i>Bacillus sphaericus</i>	11
4.1. Toxicidade e modo de ação	13
4.2. O receptor da toxina Bin do <i>B. sphaericus</i>	14
4.3. Utilização do <i>B. sphaericus</i> em campo	15
4.4. Desenvolvimento de resistência	16
III. OBJETIVOS	18
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
MANUSCRITO	29
Resumo	30
I. Introdução	31
II. Metodologia	34
1. Colônias de <i>Culex quinquefasciatus</i>	34
2. Detecção do receptor em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	34
2.1. Preparação de frações ricas em <i>microvilli</i> intestinal de larvas	34
2.2. Preparação da toxina ativa e imobilização em suporte sólido	35
2.3. Ensaios de afinidade para detecção do receptor	35
3. Clonagem e sequenciamento do gene do receptor	36
3.1. Extração de DNA total de larvas	36
3.2. Amplificação de fragmentos do gene do receptor por PCR	37

3.3. Digestão, purificação dos produtos de PCR e clonagem	38
3.4. Extração de RNA total de larvas, isolamento de RNA poli (A) ⁺ e RT-PCR	39
3.5. Amplificação de fragmentos do cDNA do receptor por RACE	40
3.6. Sequenciamento e montagem da sequência do gene do receptor	41
4. Produção da proteína recombinante do receptor	42
4.1. Transcrição e tradução <i>in vitro</i>	42
4.2. Expressão e purificação da proteína recombinante Rec-45 kDa	43
4.3. Obtenção de soro policlonal anti Rec-45 kDa	44
III. Resultados	45
1. Detecção do receptor em larvas da colônia CqSF e CqRL1/2362	45
1.1. Detecção do receptor por afinidade	45
2. Clonagem e sequenciamento do gene	45
2.1. Análise <i>in silico</i> de sequências	45
2.2. Amplificação do fragmento por PCR e clonagem	46
2.3. RT-PCR e detecção do mRNA do gene do receptor	47
2.4. Amplificação das extremidades 5' e 3' do cDNA do receptor por RACE e clonagem	48
2.5. Sequenciamento do gene do receptor e alinhamento múltiplo de sequências	49
3. Produção da proteína recombinante do receptor	51
3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante	51
3.2. Funcionalidade da proteína recombinante Rec-45 kDa	51
3.3. Funcionalidade dos anticorpos policlonais anti Rec-45 kDa	52
IV. Discussão	52
V. Conclusão	58
VI. Referências bibliográficas	59
FIGURAS	66
APÊNDICE	79
ABSTRACT	81

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Culex quinquefasciatus</i>	5
Figura 2. Oviposição de fêmea de <i>Culex</i>	6
Figura 3. Micrografia eletrônica do <i>Bacillus sphaericus</i> esporulando	12

Manuscrito

Figura 1. Ensaio de afinidade para detecção do receptor da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> (Bs)	66
Figura 2. Esquema do cDNA do receptor da toxina Bin em <i>Culex pipiens</i>	67
Figura 3. Análise dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico de larvas de <i>Culex pipiens</i> (A) e <i>Culex quinquefasciatus</i> (B) de uma colônia susceptível (S) e resistente (R)	68
Figura 4. Detecção do mRNA do receptor da toxina Bin em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> armazenadas a - 70°C	69
Figura 5. Detecção do mRNA do receptor da toxina Bin em larvas frescas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	70
Figura 6. Sequência de nucleotídeos do gene do receptor da toxina Bin em <i>Culex quinquefasciatus</i> e sequência de aminoácidos deduzida	71
Figura 7. Alinhamento múltiplo	74
Figura 8. Transcrição e tradução <i>in vitro</i> do fragmento 2-3 do gene do receptor da toxina Bin	75
Figura 9. Separação eletroforética da proteína recombinante de 45 kDa em SDS-PAGE após indução da expressão em larga escala	76

Figura 10. Ensaio de afinidade para testar a funcionalidade da 77
proteína recombinante de 45 kDa (Rec-45 kDa)

Figura 11. Ensaio de afinidade para avaliação da eficácia dos 78
anticorpos policlonais anti Rec-45 kDa

Apêndice

Figura 1. Representação do princípio dos ensaios de afinidade para 79
detecção específica do receptor

Figura 2. Representação esquemática da clonagem de fragmentos 80
do gene do receptor da toxina Bin de larvas de *Culex quinquefasciatus* em vetores específicos de clonagem e expressão

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Características de algumas cepas de <i>Bacillus sphaericus</i>	12
Tabela 2. Populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes ao <i>Bs</i>	17

Manuscrito

Tabela 1. Primers desenhados a partir do cDNA do receptor da toxina Bin em <i>Culex pipiens</i>	38
Tabela 2. Associações dos primers utilizados em cada reação de PCR	38
Tabela 3. Sequência dos primers inclusos no GeneRacer® Kit	41

LISTA DE ABREVIações

BBMF – Frações ricas em *microvilli* intestinal
BSA – Soro albumina bovina
CHAPS – 3- [(3 - colamidopropil) dimetilamônio] – 1 – propano – sulfonato
CIP – Fosfatase intestinal de bezerro
cDNA – DNA complementar
DEPC – Dietil pirocarbonato
DTT – Ditionitrito
EC – Código da enzima
ECL - Quimioluminescência
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EST – Marcador de sequências expressas
Extrato-CHAPS – Proteínas de *microvilli* intestinal de larvas solubilizadas por detergente CHAPS
GenBank – Banco de genes
GPI – Glicosil-fosfatidilinositol
IPTG – Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
LB – Meio Luria Bertani
NMD - Decaimento de mRNA mediado por mutações “nonsense”
mRNA – RNA mensageiro
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PM – Peso molecular
RACE – Rápida amplificação das porções finais do cDNA
RT-PCR – Transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
TAP – Pirofosfatase ácida de tabaco
TBS – Solução salina tamponada com Tris
TE – Tampão Tris-EDTA
TIGR – Instituto de pesquisas genômicas
UTR – Região não traduzível
VNO – Vírus do Oeste do Nilo

RESUMO

A atividade larvicida do *Bacillus sphaericus* depende da ligação da toxina binária (Bin) com um receptor específico presente no epitélio intestinal de larvas de culicídeos. Este trabalho descreve a clonagem e sequenciamento do gene deste receptor em larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (CqSF) e de uma resistente (CqRL1/2362) ao *Bs*, para elucidar o mecanismo molecular da resistência. Ensaio de afinidade *in vitro* mostraram que uma proteína de 60 kDa é o receptor da toxina na colônia CqSF e nenhuma molécula funcional foi observada em preparações da colônia CqRL1/2362. O sequenciamento do gene obtido da colônia CqSF mostrou uma sequência de 1925 pb composta por regiões 5' e 3' não traduzidas, sequência codificadora e íntron. A respectiva sequência do gene para a colônia CqRL1/2362 mostrou uma deleção de 19 nucleotídeos, geradora de uma mudança na fase de leitura de 28 aminoácidos e de um códon de terminação da tradução prematuro. A presença deste códon prematuro pode desestabilizar o respectivo mRNA, e impedir sua tradução, bem como leva a síntese de uma proteína truncada sem a âncora GPI necessária a sua localização na membrana epitelial. Em ambos os casos a ausência do receptor no epitélio intestinal seria a causa da resistência. Neste trabalho foi produzida ainda uma proteína recombinante do receptor de 45 kDa que mostrou funcionalidade, demonstrando que o sítio de ligação está localizado na porção N-terminal da molécula. Anticorpos obtidos contra esta proteína recombinante demonstraram ser uma ótima ferramenta de detecção do receptor nativo.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; *Bacillus sphaericus*; Receptor; Resistência.

I. INTRODUÇÃO

Alguns mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são importantes vetores de patógenos humanos responsáveis por enfermidades de elevada incidência como malária, filariose, febre amarela, encefalite e dengue. Múltiplos fatores tornam difícil o controle das populações destes insetos tais como sua alta capacidade reprodutiva; seu curto ciclo biológico; sua alta capacidade de colonizar habitats temporários; ocorrência de acentuadas flutuações de densidade populacional e a capacidade de seleção de resistência aos inseticidas. A descoberta e utilização dos inseticidas químicos revolucionou a metodologia de controle de mosquitos vetores de doenças, possibilitando a sua maior padronização. Pela primeira vez na história da saúde pública foi possível, em muitas regiões, controlar eficazmente e até mesmo erradicar temporariamente algumas das doenças transmitidas por vetores. O uso dos inseticidas químicos em programas de combate e controle de vetores apresenta desvantagens como seleção de resistência em populações de insetos, o modo de ação não seletivo e acumulação na biosfera.

As constantes dificuldades enfrentadas no controle de mosquitos, baseado no uso de inseticidas químicos, incentivaram a procura de agentes de controle com atividade inseticida seletiva. Tem sido dada uma crescente importância aos agentes de controle biológico, principalmente à utilização de bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus*, altamente eficazes para o controle de culicídeos e simulídeos. O *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* são os mais estudados, estando disponíveis comercialmente e sendo utilizados em larga escala há cerca de duas décadas. O *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose linfática e de arboviroses, é a espécie mais susceptível ao *B. sphaericus*. Esta toxicidade é devida a um cristal protéico produzido durante a esporulação da bactéria que, quando ingerido pela larva, leva à formação da toxina binária (Bin)

responsável pelo efeito letal da bactéria. Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH alcalino intestinal e a protoxina disponível no lúmen é clivada proteoliticamente por proteases para atingir a forma de toxina ativa. Esta toxina interage com as regiões do ceco gástrico e do intestino posterior de larvas. Foram apresentadas evidências de que a toxina se liga à membrana apical do epitélio intestinal das larvas de *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi* e *An. gambiae* através de receptores. A susceptibilidade de algumas espécies à toxina Bin do *B. sphaericus* está diretamente correlacionada à presença de receptores específicos. Em *Aedes aegypti*, espécie naturalmente refratária, não ocorre interação da toxina Bin com receptores específicos. O receptor desta toxina presente no epitélio intestinal das larvas, tem sido alvo de estudos recentes voltados à compreensão dos mecanismos de desenvolvimento de resistência do inseto à toxina.

O problema focalizado neste trabalho foi o fenômeno da resistência de larvas de *C. quinquefasciatus* ao *B. sphaericus*. Apesar da sua grande eficácia como larvicida, foi observado que algumas populações, quando submetidas à forte pressão de seleção com o *B. sphaericus*, podem apresentar resistência a este agente. A resistência já foi detectada sob condições de laboratório e de campo. Os estudos sobre este fenômeno ainda são escassos mas a investigação de algumas populações mostrou que a resistência pode ser atribuída a uma falha na etapa de ligação da toxina Bin aos receptores. É necessária a produção de conhecimento e tecnologia para evitar o fenômeno da resistência que ameaça a sustentabilidade do uso de inseticidas microbianos em programas de controle de vetores. O principal objetivo deste trabalho foi elucidar o mecanismo molecular da resistência em uma colônia de *C. quinquefasciatus* altamente resistente ao *B. sphaericus* cepa 2362, através do estudo do gene do receptor da toxina binária. O gene foi amplificado a partir de uma colônia de *C. quinquefasciatus* susceptível e de uma colônia resistente, clonado e sequenciado, a fim de identificar as mutações responsáveis pela resistência.

A elucidação de aspectos essenciais do mecanismo de resistência produzirá conhecimento científico e ferramentas úteis necessárias para a utilização racional do *B. sphaericus* em programas de controle de vetores, interrompendo assim o ciclo de doenças que afetam a população, sem causar danos ao meio ambiente. A área metropolitana do Recife é endêmica para a filariose linfática e a transmissão da *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da doença, é um grave problema de saúde pública. O controle de vetores, previsto no plano de erradicação da filariose nesta cidade, é essencial para interromper o ciclo de transmissão da doença.

Os objetivos concretizados neste projeto representam um avanço no campo da biologia molecular aplicada à entomologia e ampliam os estudos pioneiros em controle biológico de culicídeos. A contribuição científica nesta área de conhecimento é fundamental visto que os estudos da natureza da resistência em *C. quinquefasciatus* ainda são escassos e há um grande potencial de utilização destes agentes e necessidade de produzir conhecimento/tecnologia no Brasil, que hoje apresenta uma clara deficiência neste setor.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Culex pipiens quinquefasciatus*

1.1. Taxonomia, distribuição geográfica e biologia

O *Culex pipiens quinquefasciatus* (*C. quinquefasciatus*) Say 1823 é uma subespécie pertencente ao complexo *Culex pipiens* (Vinogradova, 2000), onde encontramos outros membros como *Culex pipiens pipiens* (*C. pipiens*) Linnaeus 1758, *Culex pipiens pallens* Coquillett 1898 e *Culex pipiens australicus* Dobrotworsky e Drummond, 1953. Os mosquitos pertencentes ao complexo *Culex pipiens* (Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera e Família Culicidae) possuem características morfológicas conservadas mas ensaios de identificação baseados em microsátélites (Fonseca *et al.*, 1998; Keyghobadi *et al.*, 2004) e estudos da sequência do segundo íntron do gene da acetilcolinesterase – 2 (*ace* – 2) (Smith e Fonseca, 2004) permitiram identificar polimorfismos característicos de cada membro do complexo. Comparações de cinco características morfológicas, do perfil eletroforético de doze enzimas e da taxa de infecção por *Wolbachia pipientis* também foram utilizados para caracterizar os membros desse complexo na Califórnia e África do Sul (Cornel *et al.*, 2003).

O *C. quinquefasciatus* é um inseto cosmopolita (Cornel *et al.*, 2003) e sua abundância é fortemente influenciada pela presença do homem (Forattini *et al.*, 1993). Ocorre em todo Brasil sendo encontrado em maior quantidade nos aglomerados humanos, sempre próximo às habitações dentro das cidades e vilas rurais. Seus criadouros preferenciais são os depósitos artificiais, com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos. As águas estagnadas e poluídas no solo, como valas, fossas, ralos, poços e cisternas são muito procurados para postura e criação desse inseto (Consoli, 1994). Porém, também emprega os recipientes artificiais transitórios, gerados pelas alterações antrópicas do ambiente peridomiciliar, como vasilhames, latas, copos e bebedouros de animais.

Seu ciclo biológico compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvais L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (**Figura 1**). Cada postura do *C. quinquefasciatus* compreende cerca de 120 ovos. A oviposição é feita após o repasto sanguíneo, variando de duas a oito posturas por fêmea. Os ovos são depositados em grupo sobre a água, formando uma estrutura em forma de jangada (**Figura 2**). Após um período médio de dois dias, em temperatura média de 26°C, os ovos dão origem às larvas que se movimentam ativamente e se alimentam de matéria orgânica disponível na água. A respiração das larvas é realizada pelo espiráculo ou sifão respiratório situado no último segmento abdominal. O ciclo de desenvolvimento de larva até pupa tem um período variável de dez a vinte dias. Esta não se alimenta e permanece nesta fase por um período de um a três dias, até ocorrer emergência do adulto. O alado permanece em repouso sobre a exúvia por alguns minutos, suficientes para o enrijecimento da quitina e dos músculos, necessários para o vôo. Os adultos podem viver de um a dois meses no verão e até seis meses no inverno (em diapausa). Têm hábito noturno, são altamente antropofílicos e estenogâmicos (Consoli, 1994).

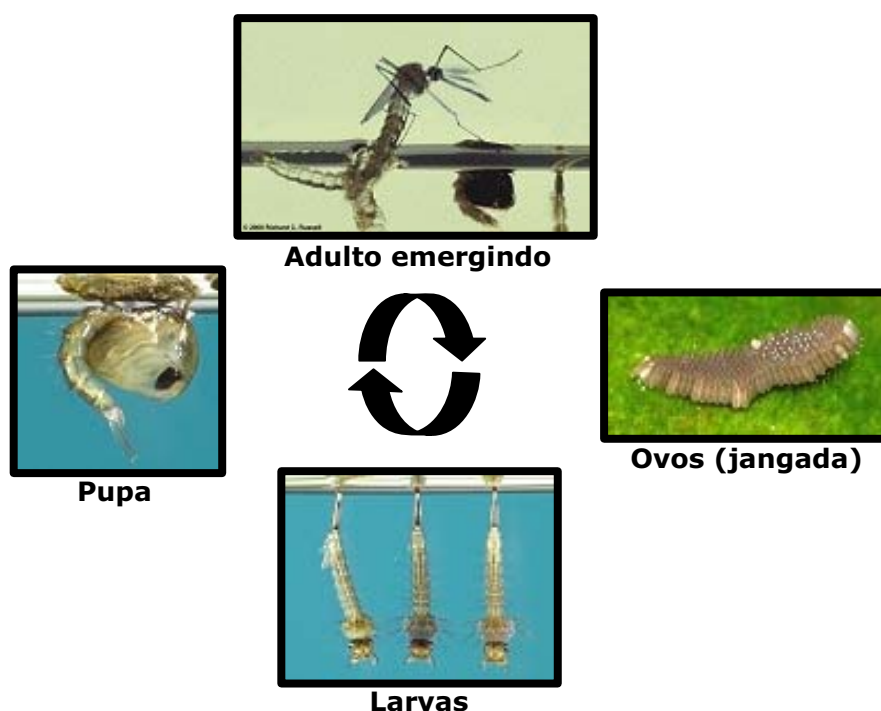


Figura 1. Ciclo biológico do *Culex quinquefasciatus*.



Figura 2. Oviposição de fêmea de *Culex*.

1.2. Relação com a transmissão da filariose e de arboviroses

Os mosquitos do complexo *Culex pipiens* são importantes vetores de doenças como a febre do Nilo Ocidental e a encefalite de St. Louis no leste dos EUA (Turell *et al.*, 2001; Kulasekera *et al.*, 2001), filariose linfática por *Wuchereria bancrofti* (Farid *et al.*, 2001), malária (Fonseca *et al.*, 1998) e outras arboviroses.

O *C. quinquefasciatus* é o principal transmissor da filariose bancroftiana no Brasil (Farid *et al.*, 2001). A filariose linfática causada pela *W. bancrofti* é considerada um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo. Estima-se que existam 1,2 bilhões de pessoas residentes em áreas endêmicas (Dean, 2000), o que equivale a 1/5 da população mundial. Dessas, cerca de 120 milhões já estão infectadas, outras 40 milhões estão seriamente incapacitadas e desfiguradas pela doença (www.who.int). Um terço da população infectada vive na Índia, um terço encontra-se na África e os demais estão distribuídos no Sul da Ásia, Pacífico e Américas (www.who.int). A filariose bancroftiana é endêmica no Brasil e a cidade do Recife apresenta uma alta taxa de prevalência de microfilaremia sendo considerada a maior área endêmica do país (Maciel *et al.*, 1996). Entre 1989 e 1991, foi realizado um

inquérito epidemiológico em várias áreas do Recife, tendo sido analisadas quinze mil pessoas e encontradas prevalências variando de 1,5 a 15%, com uma média de 6,5% (Maciel *et al.*, 1996). Naquele mesmo período, inquéritos epidemiológicos na cidade de Olinda, região metropolitana do Recife, revelaram índices microfilarêmicos maiores que os de Recife, com uma prevalência de 12,3% (Maciel *et al.*, 1994).

A filariose linfática humana, também conhecida como elefantíase na sua fase crônica, pode ser causada por helmintos das espécies *W. bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*. O ciclo tem início quando a fêmea do *C. quinquefasciatus* faz o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado e ingere larvas de *W. bancrofti* do 1º estágio (L1) que circulam no sangue periférico no período noturno. O hábito hematofágico noturno do vetor e sua predileção pelo sangue humano facilitam muito o contato das microfilárias com este mosquito, possibilitando a transmissão da doença. As microfilárias ingeridas, perdem sua bainha dentro do estômago do mosquito, migram para os músculos torácicos e posteriormente para as glândulas salivares onde atingem o 3º estágio que são as larvas infectantes (L3). Estas migram até a probóscida (aparelho picador), concentrando-se no lábio do mosquito. A transmissão da filariose se dá unicamente pela picada do vetor e deposição das larvas L3 na pele das pessoas, que estando úmida permite a progressão e penetração das larvas. O ciclo no hospedeiro intermediário é de aproximadamente vinte dias em temperaturas de 20 a 25°C mas, em temperaturas mais elevadas, pode ser mais curto. A parasitose se caracteriza por uma variedade de manifestações clínicas e o quadro clínico pode ser assintomático, agudo e crônico. Os indivíduos assintomáticos são aqueles com microfilárias no sangue e sem sintomatologia aparente. As manifestações agudas são linfangite, linfadenite associada com febre e mal-estar, funiculite e orquiepididimite. As manifestações crônicas são linfedema, hidrocele, quilúria e elefantíase, e aparecem em geral, alguns anos após o início dos ataques agudos.

O *C. quinquefasciatus* também tem sido incriminado como vetor de arboviroses. Foi encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalite, como dos tipos St. Louis, Oeste (nos EUA) e Venezuelana (Panamá) (Consoli, 1994). No Brasil, ele é responsável pela veiculação do vírus Oropouche pois é considerado o vetor secundário dessa arbovirose em áreas do Estado do Pará e Rondônia, onde a doença tem causado várias epidemias rurais (Consoli, 1994).

O vírus do Nilo Ocidental (VNO) está distribuído em 44 estados dos EUA. No Distrito de Columbia está presente desde 1999 e surtos foram desencadeados na cidade de Nova York (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2002). Muitas espécies de *Culex* foram identificadas como vetores primários do VNO em regiões endêmicas do velho mundo (Hayes, 1989) e nos Estados Unidos (Turell *et al.*, 2000). As espécies do complexo *Culex pipiens* são consideradas vetores primários do VNO na América do Norte pelos seguintes fatores: são os mosquitos mais comuns em áreas urbanas (Vinogradova, 2000); os surtos das doenças ocorrem durante seu período de maior abundância local (Spielman, 2001); apresentam competência vetorial sob condições de laboratório (Turell *et al.*, 2001); populações naturais foram encontradas infectadas com o vírus (Bernard *et al.*, 2001; Kulasekera *et al.*, 2001). Estudos de competência vetorial demonstraram que o *C. tarsalis*, *C. pipiens* e o *C. quinquefasciatus*, são altamente susceptíveis a infecção e podem ser eficientes vetores (Goddard *et al.*, 2002). Estas espécies também podem transmitir o vírus transovarianamente (Dohm *et al.*, 2002; Goddard, 2003).

2. Controle químico de vetores

A descoberta dos inseticidas químicos revolucionou a metodologia de controle de mosquitos vetores de doenças. Os primeiros compostos eram óleos minerais, produtos inorgânicos (mercuriais, arseniacais) e extrato de plantas (piretro, nicotina e rotenona) que foram amplamente utilizados até 1945, quando entraram em produção os primeiros inseticidas

organoclorados. O DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) foi sintetizado em 1874 e seu grande poder inseticida, sua estabilidade elevada e baixo custo fizeram com que, em pouco tempo, se tornasse o inseticida mais usado no mundo todo, tanto na agropecuária, como em saúde pública. Este inseticida clorado tem como características: alto poder letal sobre os insetos e efeito residual muito longo (três meses a 1 ano). O DDT não é biodegradável, acumula-se nos tecidos gordurosos de vários animais causando intoxicações crônicas, pode interferir no metabolismo do sódio e potássio e mostrou-se carcinogênico em camundongos (Mariconi, 1980). Os inseticidas fosforados foram sintetizados em 1945 e os carbamatos por volta de 1960. Os fosforados e carbamatos possuem como características: ação letal rápida sobre o inseto e um poder residual mais curto (cinco a 30 dias). São inibidores da colinesterase e causam intoxicações agudas. Entre 1972 e 1974 foram sintetizados os primeiros inseticidas sintéticos análogos aos produtos vegetais (piretróides). Os piretróides apresentam alto poder letal sobre os insetos, são inodoros e tem efeito residual moderado (30 a 90 dias). São hipersensibilizantes e irritantes das mucosas e causam intoxicações agudas.

A utilização indiscriminada dos inseticidas químicos para controle de vetores de doenças e sua acumulação na biosfera tornou-se um dos grandes problemas públicos em meados de 1960 (Mulla, 1994). A conscientização de que muitos inseticidas são altamente tóxicos para os mamíferos, além de proporcionarem riscos para a biota não alvo e desequilíbrio ambiental, foi desencadeada entre 1960 e 1970. Com o auge do movimento ambiental, os cientistas voltaram a sua atenção para o desenvolvimento de pesticidas bioracionais seletivos e de técnicas de manejo integrado (Mulla, 1994).

3. Controle biológico

O controle biológico baseia-se na utilização de predadores, parasitas, patógenos, competidores ou toxinas de microorganismos para

reduzir a população alvo (Woodring e Davidson, 1996). O controle biológico visa redução de uma população alvo para níveis aceitáveis, integrada com a conservação da biodiversidade e a proteção humana, evitando os efeitos indesejáveis aos organismos não alvo. Os principais organismos que têm sido estudados como agentes de controle biológico de mosquitos são: vírus, bactérias, protozoários, fungos, nematóides, invertebrados predadores e peixes.

As bactérias entomopatógenas são um dos agentes de controle mais utilizados em todo mundo. As duas espécies mais estudadas e utilizadas para o controle de dípteros, são o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (De Barjac, 1978) e o *B. sphaericus* (Kellen *et al.*, 1965) pois possuem atividade larvicida seletiva e ambas mostraram-se inócuas para um grande número de organismos vertebrados e invertebrados. A ação de suas toxinas é específica para um grupo limitado de organismos alvo e no mercado internacional existem diversas formulações comerciais. A eficácia das preparações bacterianas pode ser influenciada por vários fatores físico-químicos e bióticos como temperatura, pH da água, exposição a luz solar, taxa de sedimentação de esporos, poluição orgânica, estágio larval, densidade larval e taxa de ingestão (Mittal, 2003). Os estudos sobre as bactérias entomopatógenas tiveram início em meados de 1960 quando a primeira linhagem de *B. sphaericus* com atividade larvicida, não suficientemente tóxica para mérito comercial, foi descoberta (Kellen *et al.*, 1965). Um novo capítulo para o controle de culicídeos e simulídeos foi desencadeado com a descoberta do *B. thuringiensis* sorovariedade *israelensis* no deserto de Negev em Israel (Goldberg e Margalit, 1977) e de cepas do *B. sphaericus* com alta atividade larvicida (Singer, 1973; Weiser, 1984). As bactérias do gênero *Bacillus*, com ação seletiva sobre os dípteros, têm sido consideradas os agentes mais eficazes para o controle de culicídeos e simulídeos, pois possuem grande poder inseticida, além de apresentarem facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação.

4. *Bacillus sphaericus*

O *B. sphaericus* merece destaque como agente larvicida para espécies do complexo *Culex pipiens*, pois estas são mais susceptíveis a este agente. Descoberto por Neide em 1904, o *B. sphaericus* é uma bactéria Gram positiva aeróbica, amplamente distribuída no solo e em ambientes aquáticos. Tem capacidade de esporulação e apresenta esporos arredondados localizados na região terminal de um esporângio em forma de raquete (**Figura 3**).

A primeira cepa do *B. sphaericus* com atividade larvicida para mosquitos foi isolada por Kellen *et al.* (1965), a partir de larvas mortas de *Culex incidens*. A atividade larvicida deste isolado foi tão baixa que seu uso como controle de mosquitos foi desconsiderado. A identificação da linhagem SSII-1 na Índia (Singer, 1973) renovou a busca de novas linhagens ativas. O potencial do *B. sphaericus* como agente de controle biológico de mosquitos só foi evidenciada após o isolamento de cepas com alta atividade larvicida como a 1593 na Indonésia (Singer, 1974), 2297 no Sri-lanka (Wickrmesinghe e Mendes, 1980) e 2362 na Nigéria (Weiser, 1984) (**Tabela 1**).

Numerosos métodos tem sido utilizados para classificar esta espécie como estudos de homologia de DNA (Krych *et al.*, 1980), tipagem de bacteriófago (Yousten, 1984), ribotipagem (Aquino de Muro *et al.*, 1992), análise da composição de ácidos graxos celulares (Frachon *et al.*, 1991), análise de RAPD (Woodburn *et al.*, 1995), reação de aglutinação flagelar (De Barjac *et al.*, 1985) e classificação numérica baseada na taxonomia de fatores fenotípicos (Alexander e Priest, 1990). A classificação mais utilizada baseia-se na reação de aglutinação flagelar, que agrupa as cepas em diferentes sorotipos. Os sorotipos mais estudados e com maior poder larvicida são: H5a5b, no qual se agrupam as cepas 1593, 2362, 1691 e C3-41; o H25, onde se encontra a cepa 2297; e H6, que engloba a cepa IAB59 (Charles *et al.*, 1996). Entretanto, o grau de toxicidade de uma

linhagem é verificada através de ensaios de toxicidade contra a espécie alvo em comparação a uma cepa padrão, independentemente dos sistemas de classificação.

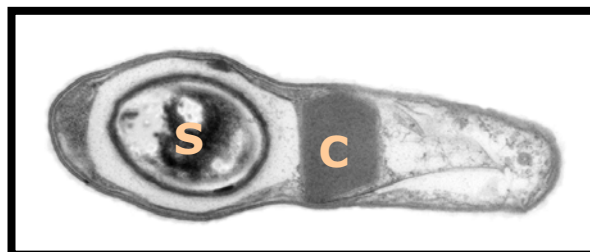


Figura 3. Micrografia eletrônica do *B. sphaericus* em fase de esporulação. (C), cristal que contém a toxina binária. (S), esporo.

Tabela 1. Características de algumas cepas de *Bacillus sphaericus* (extraído de Charles *et al.* 1996, com modificações).

Cepa	Origem	Toxicidade ^a	Genes ^b		
			Toxina Bin	Mtx	Mtx2
Kellen K	USA	B	-	+	NI
Kellen Q	USA	B	-	+	+
BS - 197	Índia	A	+	NI	NI
SSII - 1	Índia	M	-	+	+
IAB 881	Ghana	A	+	-	NI
LP1 - G	Singapura	M	+	-	NI
1593M	Indonésia	A	+	+	+
2362	Nigéria	A	+	+	+
2317 -3	Tailândia	A	+	+	+
1691	São Salvador	A	+	+	+
IAB 59	Ghana	A	+	+	+
31	Turquia	B	-	+	+
2314 - 2	Tailândia	B	-	NI	NI
2297 (MR4)	Siri Lanka	A	+	+	+
2173 (ISPC5)	Índia	M	-	-	-
IAB 872	Ghana	A	+	NI	NI
ATCC 14577	USA	-	-	NI	NI

^a Atividade larvicida para larvas de 4º estágio de *Culex pipiens*: A, alta; M, média; B, baixa.

^b Genes das toxinas presente (+), ausente (-), Indeterminado (NI).

4.1. Toxicidade e modo de ação

Existem dois tipos de toxinas com atividade larvícida presentes no *B. sphaericus* que são: a toxina do cristal (Bin) e as toxinas Mtx. A toxina do cristal protéico está presente em todas as cepas altamente ativas e é produzido na fase de esporulação. Já as toxinas Mtx parecem ser sintetizadas somente na fase vegetativa (Charles *et al.*, 1996). Os genes das toxinas Mtx e Mtx2, com massa molecular de 100 e 30.8 kDa, foram clonados de uma linhagem de média toxicidade SSII – 1 (Thanabalu *et al.*, 1991; Thanabalu e Porter, 1995). O papel da Mtx na toxicidade da bactéria ainda não foi esclarecido pois estas toxinas são secretadas no meio e sofrem degradação devido à ação de proteases. Entretanto, vários estudos indicam que a toxicidade das principais cepas do *B. sphaericus* é devido à toxina Bin, pois apenas cepas que possuem esta toxina apresentam alta atividade larvícida (**Tabela 1**). A protoxina presente no cristal é composta por duas proteínas sintetizadas de forma equimolar e de massa molecular de 42 e 51 kDa (Hindley e Berry, 1988; Berry *et al.*, 1989). Esta protoxina é um heterodímero formado por dois polipeptídeos denominados BinA e BinB respectivamente, que agem em sinergia, e por isto ela é considerada uma toxina binária (Bin) (Nicolas *et al.*, 1993). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino e a protoxina liberada no lúmen é clivada proteoliticamente por serina-proteases e atinge a forma de toxina ativa (Broadwell e Baumann, 1987). Após a clivagem por enzimas digestivas, os polipeptídeos de 42 e 51 kDa originam fragmentos menores de 39 e 43 kDa respectivamente (Baumann *et al.*, 1985). Esta toxina ativa interage com células do ceco gástrico e intestino posterior da larva (Davidson, 1988).

Ensaio de ligação *in vitro* entre a toxina radiomarcada e microvilosidades intestinais de larvas (BBMF) de *C. pipiens* (Nielsen-LeRoux e Charles, 1992), *An. stephensi* e *An. gambiae* (Silva-Filha *et al.*, 1997) demonstraram que a toxina liga-se a receptores específicos

presentes nestas preparações. Em larvas de *C. pipiens* também foi demonstrado que o componente BinB é o responsável pela ligação com os receptores de membrana, pois tem uma afinidade similar à toxina Bin (Charles *et al.*, 1997). Já o componente BinA é o responsável pela atividade tóxica do *B. sphaericus*, pois resultados obtidos previamente (Yuan *et al.*, 2001) indicaram que um simples aminoácido dessa proteína é essencial para a toxicidade larval.

Os efeitos citopatológicos observados nas larvas após ingestão do cristal podem ser observados após 30 minutos, e caracterizam-se por alterações no epitélio intestinal tais como presença de vacúolos citoplasmáticos, destruição das microvilosidades intestinais, intumescimento celular e alterações mitocondriais (Davidson, 1981; Charles, 1987; Singh e Gill, 1988).

4.2. O receptor da toxina Bin do *B. sphaericus*

A toxina binária (Bin) do *B. sphaericus* liga-se especificamente a uma classe de proteínas de membrana presentes na superfície das células intestinais de larvas de *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* (Oei *et al.*, 1992; Charles *et al.*, 1997). Silva-Filha *et al.* (1999) identificaram o receptor de toxina Bin em larvas de *C. pipiens* que é uma α -glicosidase de 60 kDa ligada à membrana celular por uma âncora do tipo glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). O alinhamento de sequências de aminoácidos desta proteína, obtidos após purificação parcial e microsequenciamento, mostraram uma alta similaridade com 3 potenciais maltases de mosquitos como *Aedes aegypti* e *An. gambiae* e similaridade com maltases de outros dípteros como *Drosophila melanogaster* e *D. virilis* (Silva-Filha *et al.*, 1999). Este receptor foi denominado de *cpm1* por Darboux *et al.* (2001). Após a clonagem do seu cDNA e expressão de proteínas heterólogas, observou-se que sua sequência de aminoácidos apresentou 39-43% de identidade com a família das maltases e que a proteína possui significativa atividade de α -glicosidase (EC 3.2.1.20). A sequência do gene do receptor

da toxina Bin em *C. pipiens* encontra-se disponível no "GenBank" (Darboux *et al.*, 2001). As α -glucosidases tem uma função importante na digestão de açúcares no intestino dos insetos (Terra e Ferreira, 1994).

4.3. Utilização do *Bacillus sphaericus* em campo

A diminuição da densidade populacional de vetores é reconhecida como uma ferramenta efetiva para o controle de algumas doenças. Devido à alta atividade do *B. sphaericus* contra larvas de *C. quinquefasciatus* e sua boa persistência em águas poluídas, esta bactéria tem sido considerada um ótimo agente de controle de mosquitos em áreas urbanas (Hougard *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1996; Barbazan *et al.*, 1997; Yadav *et al.*, 1997; Regis *et al.*, 2000; Silva-Filha *et al.*, 2001). Produtos comerciais à base de *B. sphaericus* estão atualmente disponíveis (Thiéry e Hamon, 1998). A eficácia destas preparações bacterianas podem ser influenciadas por vários fatores físico-químicos e fatores bióticos como temperatura, pH da água, exposição a radiação solar, taxa de sedimentação de esporos, poluição orgânica, estágio larval, densidade e hidrodinâmica do criadouro (Mittal, 2003). A reciclagem bacteriana, ou seja, multiplicação vegetativa e esporulação da bactéria em cadáveres de larvas, explica a persistência dessa bactéria em certos tipos de criadouros (Skovmand e Bauduin, 1997). Programas de controle de vetores realizados no Brasil, em zonas endêmicas para filariose bancroftiana na região metropolitana do Recife comprovaram a eficácia do *B. sphaericus* cepa 2362 para o controle populacional de larvas de *C. quinquefasciatus*. Houve uma redução na densidade populacional do vetor bem como na taxa de microfilaremia local (Regis *et al.*, 1995; Regis *et al.*, 2000; Silva-Filha *et al.*, 2001).

4.4. Desenvolvimento de resistência

Apesar da excelente atividade do *B. sphaericus* como larvicida, foi observado que larvas de *Culex*, submetidas a forte pressão de seleção, apresentaram resistência a este agente. A literatura registra alguns casos de resistência observados, sob condições de campo ou de laboratório. Casos de resistência em campo foram detectados na França (Sinègre *et al.*, 1994), na Índia (Rao *et al.*, 1995), no Brasil (Silva-filha *et al.*, 1995) e na China (Yuan *et al.*, 2000). O nível mais alto de resistência em populações naturais foi detectado na China (22.000 vezes), possivelmente devido a forte pressão de seleção exercida por mais de sete anos de uso do biolarvicida.

Georghiou *et al.* (1992) obtiveram a primeira colônia (GEO) de *C. quinquefasciatus* resistente ao *B. sphaericus* sob condições de laboratório. Esta colônia se apresentou 100.000 vezes mais resistente à cepa 2362 em relação à colônia susceptível (Wirth *et al.*, 2000). Uma colônia de *C. quinquefasciatus*, originada de ovos coletados no Coque, localidade do Recife, submetidas a uma contínua pressão de seleção com o *B. sphaericus* cepa 2362 durante 46 gerações apresentou um nível de resistência de cerca de 163.000, em relação à colônia susceptível (Pei *et al.*, 2002).

Investigações preliminares em algumas colônias de *Culex* resistentes demonstraram a existência de diferentes mecanismos de resistência ao *B. sphaericus*. O alto nível de resistência (>100.000 vezes) na colônia de laboratório (GEO) desenvolvida por Georghiou *et al.* (1992) foi causada pela falha na ligação da toxina Bin com o receptor (Nielsen-LeRoux *et al.*, 1995). Este mesmo mecanismo foi observado em colônias de campo resistentes (BP) do sudeste da França (Chevillon *et al.*, 2001; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2002). Já nas colônias de campo SPHAE da França (Sinègre *et al.*, 1994) e TUNIS da Tunísia, o mecanismo de resistência não está correlacionado com a falha na ligação entre a toxina e receptor.

Diante destas investigações ficou claro que diferentes genes estão envolvidos nos mecanismos de resistência selecionados em populações de *Culex* de laboratório e de campo.

Darboux *et al.* (2002) estudaram a base molecular da resistência à toxina Bin do *B. sphaericus* cepa 2362 na colônia GEO (Wirth *et al.*, 2000). Foi demonstrado que uma mutação pontual na sequência do gene do receptor, geradora de um códon de terminação da tradução prematuro, resultou na produção de uma forma da molécula que é secretada devido à perda da âncora GPI. A toxina Bin não atua nas células intestinais das larvas pois não há interação com a membrana celular.

Estudos sobre a base genética da resistência em várias populações de campo ou de laboratório mostraram que a herança é recessiva (**Tabela 2**). Estes resultados indicam que há pelo menos três mecanismos distintos envolvidos no fenômeno de resistência: I – falha na ligação da toxina com o receptor, com herança autossômica recessiva; II - falha na ligação da toxina com o receptor, com herança ligada ao sexo recessiva; III – não ocorre falha na ligação da toxina com o receptor, com herança ligada ao sexo recessiva.

Tabela 2. Populações de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao Bs.

Colônia	País	Tipo Seleção	Razão de resistência	Ligação toxina-receptor	Forma de herança	Referência
GEO	EUA	LAB	>100.000	Não	Recessiva; autossômica	Nielsen-LeRoux <i>et al.</i> , 1995
SPHAE	França	Campo	>10.000	Sim	Recessiva; ligada ao sexo	Nielsen-LeRoux <i>et al.</i> , 1997
Coque	Brasil	Campo	10	Sim	ND	Silva-Filha <i>et al.</i> , 1995
Kochi	Índia	Campo	150	ND*	ND	Rao <i>et al.</i> , 1995
TUNIS	Tunísia	Campo	>10.000	Sim	Recessiva; ligada ao sexo	Nielsen-LeRoux <i>et al.</i> , 2002
BP	França	Campo	>5.000	Não	Recessiva; ligada ao sexo	Nielsen-LeRoux <i>et al.</i> , 2002
RLCq1/C3-41	China	LAB	>144.000	Não	Recessiva; autossômica	Oliveira <i>et al.</i> , 2004
CqRL1/2362	Brasil	LAB	>163.000	Não	Recessiva; autossômica	Oliveira <i>et al.</i> , 2004

*ND: não determinado

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Elucidar o mecanismo molecular da resistência de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* altamente resistente ao *Bacillus sphaericus* cepa 2362.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar o receptor da toxina Bin em larvas de uma colônia sensível (CqSF) e resistente (CqRL1/2362) ao *B. sphaericus* cepa 2362;
- 2- Identificar a presença de mutações implicadas com a resistência;
- 3- Produzir uma proteína recombinante do receptor em *Escherichia coli*;
- 4- Obter anticorpos policlonais anti-proteína recombinante para detecção do receptor nativo em preparações de larvas.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander B and Priest FG (1990) Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. J Gen Microbiol 136: 367-376.

Aquino de Muro M, Mitchell WJ and Priest FG (1992) Differentiation of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. J Gen Microbiol 138: 1159-1166.

Barbazan P, Baldet T, Darriet F, Escaffre H, Djoda DH, Hougard JM (1997) Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. J Am Mosq Control Assoc 13: 263-269.

Baumann P, Unterman BM, Baumann L, Broadwell AH, Abbene SJ, Bowditch RD (1985) Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. J Bacteriol 163: 738-747.

Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis AP, Ngo KA, Nicholas DC, Young DM, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson M, White DJ, Stone WB, Kramer LD (2001) West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. Emerg Infect Dis 7: 679-685.

Berry C, Jackson-Yap J, Oei C and Hindley J (1989) Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. Nucleic Acids Res 17: 7516.

Broadwell AH and 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.

Centers for Disease Control and Prevention (2002) Provisional surveillance summary of the West Nile virus epidemic in the United States. MMWR - Morb Mort Wkly Rep 50: 1129 - 1133.

Charles JF (1987) Ultrastructural midgut events in culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. Ann Inst Pasteur Microbiol 138: 471-484.

Charles JF, Nielsen-Leroux C and Delécluse A (1996) *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. Ann Rev Entomol 41: 451-472.

Charles JF, Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C, Humphreys MJ, Berry C (1997) Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). FEMS Microbiol Lett 156: 153-159.

Chevillon C, Bernard C, Marquine M, Pasteur N (2001) Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. J Med Entomol 38: 657-664.

Consoli RAGB (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 20ª edição. Editora FIOCRUZ, RJ, 228 pp.

Cornel AJ, Mcabee RD, Rasgon J, Stanich MA, Scott TW, Coetzee M (2003) Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. J Med Entomol 40: 36-51.

Darboux I, Nielsen-Leroux C, Charles JF, Pauron D (2001) The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochem Mol Biol 31: 981-990.

Darboux I, Pauchet Y, Castella C, Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C, Charles JF, Pauron D (2002) Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 5830-5835.

Davidson EW (1981) A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultrastructural study of larvae fed *Bacillus sphaericus* 1593 spores. *Dev Ind Microbiol* 22: 69-81.

Davidson EW (1988) Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. *J Med Entomol* 25: 151-157.

De Barjac H (1978) A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 286: 797-800.

De Barjac H, Larget-Thiéry I, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H (1985) Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity in mosquito larvae. *Appl Microbiol Biotechnol* 21: 85-90.

Dean M (2000) Port Vila launching a lymphatic filariasis campaign in the Pacific Islands. *Lancet* 356: 143.

Dohm DJ, Sardelis MR and Turell MJ (2002) Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39: 640-644.

Farid HA, Hammad RE, Hassan MM, Morsy ZS, Kamal IH, Weil GJ, Ramzy RMR (2001) Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 95: 29-32.

Fonseca DM, Lapointe DA, Fleischer RC (2000) Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol Ecol* 9: 1803-1814.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Gomes AD (1993) Studies on mosquitos (Diptera: Culicidae) and anthropic environment .1. Parity of blood seeking *Anopheles* (Kerteszia) in South Eastern Brazil. *R Saúde Pública* 27: 1-8.

Frachon E, Hamon S, Nicolas L, De Barjac H (1991) Cellular fatty acid analysis as a potential tool for predicting mosquitocidal activity of *Bacillus sphaericus* strains. *Appl Environ Microbiol* 57: 3394-3398.

Georghiou GP, Malik JI, Wirth M, Sainato K (1992) Characterization of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). *Mosq Control Res Annual Report* 1992: 34-35.

Goddard LB (2003) Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 9: 406.

Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW (2002) Vector competence of California mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis* 8: 1385-1391.

Goldberg LH and Margalit J (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq News* 37: 355-358.

Hayes CG (1989) West Nilo fever. In: *Arboviruses: epidemiology and ecology*. 5: 59-88

Hindley J and Berry C (1988) *Bacillus sphaericus* strain 2297: nucleotide sequence of 41.9 kDa toxin gene. *Nucleic Acids Res* 16: 4168.

Hougard JM, Mbentengam R, Lochouarn L, Escaffre H, Darriet F, Barbazan, P, Quillevere D (1993) Campaign against *Culex quinquefasciatus* using

Bacillus sphaericus: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. Bull World Health Organ 71: 367-375.

Kellen WR, Clark TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S (1965) *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. J Invertebr Pathol 7: 442-448.

Keyghobadi N, Matrone MA, Ebel GD, Kramer LD, Fonseca DM (2004) Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. Mol Ecol Notes 4: 20-22.

Krych VK, Johnson JL and Yousten AA (1980) Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. Int J Syst Bacteriol 30: 476-82.

Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, Glaser C, Miller JR (2001) West Nile Virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. Emerg Infect Dis 7: 722-725.

Kumar PA, Sharma RP and Malik VS (1996) The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Adv Appl Microbiol 42: 1-43.

Maciel A, Rocha A, Marzochi KB, Medeiros Z, Carvalho AB, Regis L, Souza W, Lapa T, Furtado A (1996) Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 91: 449-455.

Maciel MA, Marzochi KB, Silva EC, Rocha A, Furtado AF (1994) Comparative studies on endemic areas of bancroftian filariasis in Greater Recife, Brazil. Cad Saúde Pública 2: 301-309.

Mariconi FAM (1980) Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 4ª edição. Editora Nobel, SP, 305 pp.

Mittal PK (2003) Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. J Vector Borne Dis 40: 20-32.

Mulla MS (1994) Mosquito control then, now, and in the future. J Am Mosq Control Assoc 10: 574-584.

Neide E (1904) Botanische Beschreibung einiger sporebildenden bacterien. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 12: 1-11.

Nicolas L, Nielsen-Leroux C, Charles JF, 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 and Charles JF (1992) Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. Eur J Biochem 210: 585-590.

Nielsen-Leroux C, Charles JF, Thiery I, Georgiou GP (1995) Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. Eur J Biochem 228: 206-210.

Nielsen-Leroux C, Pasteur N, Pretre J, Charles JF, Sheikh HB, Chevillon C (2002) High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. J Med Entomol 39: 729-735.

Oei C, Hindley J and Berry C (1992) Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut elucidation of functional binding domains. J Gen Microbiol 138: 1515-1526.

Oliveira CMF, Silva-Filha MHNL, Nielsen-Leroux C, Pei G, Yuan Z, Regis LN (2004) Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in

Culex quinquefasciatus from China and Brazil (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 41: 58-64.

Pei G, Oliveira CMF, Yuan Z, Nielsen-Leroux C, Silva-Filha MH, Yan J, Regis L (2002) A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. Appl Environ Microbiol 68: 3003-3009.

Rao DR, Mani TR, Rajendran R, Joseph ASJ, Gajanana A (1995) Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J Am Mosq Control Assoc 11: 1-5.

Regis L, Da Silva SB and Melo-Santos MA (2000) The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 207-210.

Regis L, Silva-Filha MH, Oliveira CM, Rios EM, Silva SB, Furtado AF (1995) Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Mem Inst Oswaldo Cruz 90: 115-119.

Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C and Charles JF (1997) Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. Eur J Biochem 247: 754-761.

Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C, Charles JF (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). Insect Biochem Molec Biol 29: 711-721.

Silva-Filha MH, Regis L, Oliveira CMF, Furtado AF (2001) Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. J Am Mosq Control Assoc 17: 45-50.

Silva-Filha MH, Regis L, Nielsen-Leroux C, Charles JF (1995) Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Econ Entomol 88: 525-30.

Sinègre G, Babinot M, Quermel JM, Gavon B (1994) First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France. Abstr VIIIth Eur Meet Society of Vector Ecology 5-8: 17.

Singer S (1973) Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. Nature 244: 110-111.

Singer S (1974) Entomogenous bacilli against mosquito larvae. Dev Ind Microbiol 15: 187-94.

Singh GJPC and Gill SS (1988) An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. J Invertebr Pathol 52: 237-47.

Skovmand O and Bauduin S (1997) Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African countries. J Vector Ecol 22: 43-51.

Smith JL and Fonseca DM (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg 70: 339-345.

Spielman A (2001). Structure and seasonality of nearctic *Culex pipiens* populations. Ann N Y Acad Sci 951: 220-234.

Terra WR and Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Biochem Physiol 109B: 1-62.

Thanabalu T, Hindley J, Jackson J, Berry C (1991) Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J Bact 173: 2776-2785.

Thanabalu T and Porter AG (1995) Efficient expression of a 100-Kilodalton mosquitocidal toxin in protease deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. App Environ Microbiol 61: 4031-4036.

Thiéry I and Hamon S (1998) Bacterial control of mosquito larvae: investigation of stability of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* standard powders. J Am Mosq Control Assoc 14: 472-476.

Turell MJ, O'guinn M and Oliver J (2000) Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile Virus. Am J Trop Med Hyg 62: 413-414.

Turell MJ, O'guinn ML, Dohm DJ, Jones JW (2001) Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. J Med Entomol 38: 130-134.

Vinogradova EB (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Moscow Russia: Pensoft.

Weiser J (1984) A mosquito virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralbl Mikrobiol 139: 57-60.

Wickrmesinghe RSB and Mendes CL (1980) *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. Mosq News 40: 387-389.

Wirth MC, Georghiou GP, Malik JI, Abro GH (2000) Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. J Med Entomol 37: 534-540.

World Health Organization (2000) Eliminate filariasis: attack poverty. Proceedings of the first meeting of the global alliance to eliminate lymphatic filariasis. Geneva: WHO.

Woodburn MA, Yousten AA and Hilu KH (1995) Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. Int J System Bact 45: 212-217.

Woodring J and Davidson EW (1996) Biological control of mosquitoes. In: The biology of disease vectors. B. J. Beaty and W. C. Marquardt eds., USA, pp 530-548.

Yadav RS, Sharma VP and Upadhyay AK (1997) Field trial of *Bacillus sphaericus* strain B-101 (serotype H5a, 5b) against filariasis and Japanese encephalitis vectors in India. J Am Mosq Control Assoc 13: 158-163.

Yousten AA (1984) *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. Adv. Biotechnol. Processes 3: 315-343.

Yuan ZM, Rang C, Maroun RC, Juarez-Perez V, Frutos R, Pasteur N, Vendrely C, Charles JF, Nielsen-Leroux C (2001) Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. Eur J Biochem 268: 2751-2760.

Yuan ZM, Zhang YM and Liu EY (2000) High level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. Biocontrol Sci Technol 10: 43-51.

Zahiri NS and Mulla MS (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.

Manuscrito a ser submetido à revista:
Insect Biochemistry and Molecular Biology
ISSN 0965-1748

Mecanismo molecular da resistência de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) ao *Bacillus sphaericus*

Romão, T.P.A.¹, Chalegre, K.D.M.¹, Key, S.G.¹, Ayres, C.F.J.¹, Oliveira, C.M.F.¹, Melo-Neto, O.P.², Silva-Filha, M.H.N.L.^{1*}

¹Departamento de Entomologia e ²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, PE, Brasil, Caixa Postal 7472, CEP 50670-420

*Autor correspondente: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha. *e-mail*: mhneves@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

A atividade larvicida do *Bacillus sphaericus* (Bs) depende da ligação da toxina binária (Bin) com um receptor específico presente no epitélio intestinal de larvas de culicídeos. Este trabalho descreve a clonagem e sequenciamento do gene deste receptor em larvas de *Culex quinquefasciatus* de uma colônia susceptível (CqSF) e de uma resistente (CqRL1/2362) ao Bs, para elucidar o mecanismo molecular da resistência. Ensaio de afinidade *in vitro* mostraram que uma proteína de 60 kDa é o receptor da toxina na colônia CqSF e nenhuma molécula funcional foi observada em preparações da colônia CqRL1/2362. O sequenciamento do gene obtido da colônia CqSF mostrou uma sequência de 1925 pb composta por regiões 5' e 3' não traduzidas, sequência codificadora e íntron. A respectiva sequência do gene para a colônia CqRL1/2362 mostrou uma deleção de 19 nucleotídeos, geradora de uma mudança na fase de leitura de 28 aminoácidos e de um códon de terminação da tradução prematuro. A presença deste códon prematuro pode desestabilizar o respectivo mRNA, e impedir sua tradução, bem como leva a síntese de uma proteína truncada sem a âncora GPI necessária a sua localização na membrana epitelial. Em ambos os casos a ausência do receptor no epitélio intestinal seria a causa da resistência. Neste trabalho foi produzida ainda uma proteína recombinante do receptor de 45 kDa que mostrou funcionalidade, demonstrando que o sítio de ligação está localizado na porção N-terminal da molécula. Anticorpos obtidos contra esta proteína recombinante demonstraram ser uma ótima ferramenta de detecção do receptor nativo.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; *Bacillus sphaericus*; Receptor; Resistência.

I. Introdução

Algumas bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus* que apresentam ação larvicida para os dípteros, são consideradas agentes eficazes para o controle de culicídeos e simulídeos, pois produzem toxinas com grande poder inseticida, além de apresentarem facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação. O *Bacillus sphaericus* merece destaque como agente larvicida para o *Culex pipiens quinquefasciatus* (*C. quinquefasciatus*), vetor da filariose linfática, pois esta é uma espécie altamente susceptível a este agente, e tem sido utilizada com sucesso em programas de controle de vetores (Hougard *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1996; Barbazan *et al.*, 1997; Yadav *et al.*, 1997; Regis *et al.*, 2000).

O principal fator tóxico do *B. sphaericus* é uma protoxina presente no cristal de natureza protéica formado durante o processo de esporulação (Broadwell e Baumann., 1987). Após a ingestão pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino e a protoxina liberada no lúmen é clivada proteoliticamente por serina-proteases atingindo a forma de toxina ativa (Broadwell e Baumann, 1987). A protoxina é um heterodímero formado por dois polipeptídeos, de 42 e 51 kDa, denominados BinA e BinB respectivamente (Davidson *et al.*, 1990). Estes polipeptídeos agem em sinergia e por esta razão a toxina é considerada binária (Bin) (Nicolas *et al.*, 1993). Após a clivagem por enzimas digestivas, os polipeptídeos de 42 e 51 kDa originam fragmentos de 39 e 43 kDa respectivamente (Baumann *et al.*, 1985). Ensaio de ligação *in vitro* entre a toxina Bin radiomarcada e preparações contendo microvilosidades intestinais de larvas (BBMF) de *Culex pipiens* (Nielsen-LeRoux e Charles, 1992), *Anopheles stephensi* e *An. gambiae* (Silva-Filha *et al.*, 1997) demonstraram que a toxina Bin liga-se a uma única classe de receptores específicos presentes na BBMF. A presença de receptores é determinante para a ação da toxina Bin visto que em preparações de BBMF de larvas de *Aedes aegypti*, uma espécie

naturalmente refratária, não foi detectada ligação específica da toxina (Nielsen-LeRoux & Charles, 1992).

Silva-Filha *et al.* (1999) identificaram o receptor de toxina Bin em larvas de *C. pipiens* que é uma α -glicosidase de 60 kDa ligada à membrana celular por uma âncora do tipo glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Este receptor foi posteriormente clonado e denominado *cpm1* (*Culex pipiens* maltase 1) por Darboux *et al.* (2001). Após expressão da proteína heteróloga Cpm 1 a partir de seu cDNA clonado, observou-se que sua sequência de aminoácidos apresentou entre 39 e 43% de identidade com a família das maltases e que esta proteína exibiu significativa atividade de α -glicosidase (EC 3.2.1.20).

Apesar do modo de ação altamente específico e seletivo do *B. sphaericus*, foi observado que populações de *Culex*, submetidas a uma forte pressão de seleção, podem apresentar resistência a este agente. Casos de resistência em campo após tratamento intensivo de populações naturais foram registrados na Índia (Rao *et al.*, 1995), no Brasil (Silva-Filha *et al.*, 1995) e na China (Yuan *et al.*, 2000). A resistência também foi obtida sob condições de laboratório (Rodcharoen e Mulla, 1994; Wirth *et al.*, 2000). Em outro estudo, sob condições de laboratório, uma colônia de *C. quinquefasciatus* (CqRL1/2362) foi submetida a uma pressão de seleção durante 46 gerações com o *B. sphaericus* cepa 2362 e atingiu um alto nível de resistência (>163.000), em relação à colônia susceptível (Pei *et al.*, 2002).

O problema focalizado neste trabalho é o fenômeno da resistência de larvas de *Culex* ao *B. sphaericus*. O aparecimento dos primeiros casos de resistência apontou a necessidade de se aprofundar os estudos sobre o mecanismo molecular deste fenômeno, a fim de racionalizar o uso do *B. sphaericus*. A investigação de algumas populações resistentes mostrou que o principal mecanismo de resistência é a falha na etapa de ligação da toxina Bin ao seu receptor, embora haja relatos de colônias cujo mecanismo de resistência é distinto e ainda não foi elucidado (Nielsen-LeRoux *et al.*, 1995, 1997, 2002; Oliveira *et al.*, 2004). O único relato da

literatura a cerca da base molecular da resistência à toxina Bin foi realizada por Darboux *et al.* (2002) que estudaram a colônia GEO de *C. pipiens*, selecionada sob condições de laboratório e altamente resistente ao *B. sphaericus* cepa 2362 (Wirth *et al.*, 2000). Na análise comparativa da sequência do gene Cpm 1 obtido da colônia GEO e de uma colônia susceptível foram detectadas sete mutações, seis das quais não repercutem sobre o sítio de ligação da toxina ou sobre a atividade da α -glicosidase. Neste trabalho foi demonstrado que apenas uma mutação pontual geradora de um códon de terminação da tradução prematuro na sequência, resultou na produção de uma proteína secretada devido à perda da âncora GPI. A toxina Bin não causa os efeitos citopatológicos nas células intestinais do mosquito pois não há interação com a membrana celular, através dos receptores de membrana.

No presente trabalho foi realizado um estudo da base molecular da resistência ao *B. sphaericus* cepa 2362 em uma colônia de *C. quinquefasciatus* altamente resistente (CqRL1/2362), obtida anteriormente, sob condições de laboratório (Pei *et al.*, 2002). Ensaio de ligação *in vitro*, entre a toxina Bin radiomarcada e BBMF de larvas desta colônia, mostraram que a resistência é causada pela falha na etapa de ligação da toxina Bin ao seu receptor (Oliveira *et al.*, 2004). Estudos sobre a base genética da resistência na colônia estudada mostraram que a herança é autossômica recessiva (Oliveira *et al.*, 2004). Nosso objetivo foi identificar o receptor da toxina Bin do *B. sphaericus* em *C. quinquefasciatus* e elucidar a base molecular da resistência exibida pela colônia CqRL1/2362 a fim de contribuir para o conhecimento do modo de ação e para o uso adequado do larvicida *B. sphaericus*.

II. Metodologia

1. Colônias de *Culex quinquefasciatus*

Neste trabalho foram utilizadas duas colônias de *C. quinquefasciatus*, estabelecidas previamente a partir de ovos coletados em diversos criadouros no bairro do Coque, Recife-PE. As colônias foram mantidas no insetário do departamento de Entomologia do CPqAM sob as seguintes condições: temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa 65-85 % e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). Os adultos foram alimentados em solução de sucrose a 10 % e o repasto sanguíneo das fêmeas foi feito em *Gallus* sp. As larvas foram alimentadas com ração para gatos, autoclavada. Larvas de 4º estágio das seguintes colônias foram utilizadas:

- a) **CqSF**: colônia de referência susceptível ao *Bacillus sphaericus* cepa 2362 (*Bs* 2362).
- b) **CqRL1/2362**: colônia selecionada previamente em laboratório (Pei et al., 2002) e que apresenta um alto nível de resistência (>160.000) ao *Bs* 2362.

2. Detecção do receptor em larvas de *Culex quinquefasciatus*

2.1. Preparação de frações ricas em *microvilli* intestinal de larvas

As preparações ricas em *microvilli* do epitélio intestinal (BBMF) foram obtidas a partir de larvas inteiras de *C. quinquefasciatus*, através do método de centrifugação diferencial e precipitação com íons de magnésio, segundo Silva-Filha et al. (1997). Em seguida, as preparações de BBMF foram solubilizadas com o detergente CHAPS (Extrato-CHAPS) segundo Silva-Filha et al. (1999), para seu emprego nos ensaios de afinidade *in vitro* para detecção do receptor. A qualidade das preparações de BBMF e dos extratos-CHAPS foi avaliada a partir do enriquecimento das atividades da leucina-aminopeptidase/LAP (EC 3.4.11.1) e da α -

glicosidase/GLI (EC 3.2.1.20), enzimas marcadoras de *microvilli* intestinal, segundo Silva-Filha *et al.* (1999). As dosagens de proteínas foram feitas segundo Bradford (1976), utilizando uma curva padrão de albumina do soro bovino.

2.2. Preparação da toxina ativa e imobilização em suporte sólido

A toxina utilizada nos experimentos foi purificada a partir do recombinante *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* cepa 4Q2-81, que contém os genes da toxina binária do *B. sphaericus* (Bourgouin *et al.*, 1990). Após a obtenção da cultura esporulada, os cristais foram purificados e processados *in vitro* até a forma de toxina ativa, segundo Nielsen-LeRoux e Charles (1992). Os lotes de toxina ativa foram imobilizados por ligação covalente sobre microesferas de "Sephacrose[®]", segundo as recomendações do fabricante (código 17-0430-01, Amersham Biosciences[®]). A toxina imobilizada sobre este suporte sólido (esferas-Bin) foi empregada nos testes de afinidade.

2.3. Ensaios de afinidade para detecção do receptor

Os ensaios foram conduzidos a partir da incubação entre as esferas-Bin (30 µl) e o extrato-CHAPS de larvas das colônias CqSF e CqRL1/2362 (30 µg de proteína), ou a proteína recombinante do receptor (Rec-45 kDa) (vide item 4). A incubação foi feita em um volume total de 100 µl em tampão PBS (NaH₂PO₄ 2,1 mM/Na₂HPO₄ 14 mM/NaCl 150 mM), pH 7.4, à temperatura ambiente, durante toda a noite. Após a incubação, as esferas-Bin foram separadas do sobrenadante por centrifugação (10.000 g, 15 min, 4°C), lavadas com PBS/Azida 0,02%, submetidas à separação eletroforética (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de PVDF ("polyvinylidene fluoride"). A membrana foi submetida a um "Western-blot" utilizando anticorpos primários anti proteínas de BBMF ou anticorpos anti Rec-45 kDa obtidos neste trabalho (vide itens 4.2 e 4.3). Neste

procedimento de imunodeteção, a membrana foi bloqueada em tampão TBS-T (Tris 20 mM pH 7.6/ NaCl 500 mM/Tween 20 a 0.05%) contendo leite desnatado a 5% por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada por mais uma hora com o 1º anticorpo em tampão TBS-T em uma diluição de 1:200. Posteriormente, a membrana foi incubada com o 2º anticorpo (anti IgG de coelho conjugado com peroxidase) em tampão TBS-T em uma diluição de 1:15.000 e submetida à detecção através do sistema ECL (Amersham Biosciences). Entre cada incubação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-T. O papel dos anticorpos foi evidenciar se alguma das proteínas do extrato-CHAPS ou a proteína recombinante (Rec-45 kDa) empregados na incubação ligava-se especificamente à toxina imobilizada sobre as microesferas. A especificidade da ligação de uma proteína às esferas-Bin, foi determinada a partir de uma incubação idêntica à precedente, na presença de um excesso de toxina livre (30-60 µg de proteína) que agiu como um competidor em relação à toxina imobilizada (**Figura 1 do apêndice**).

3. Clonagem e sequenciamento do gene do receptor

3.1. Extração de DNA total de larvas

Larvas do 4º estágio das colônias CqSF e CqRL1/2362 foram maceradas em 400 µl de tampão de lise (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 2 mM pH 8,0), 7 µl de solução de proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl de SDS a 10%. O macerado foi incubado a 65°C durante a noite. Após a adição de 420 µl de NaCl 5 M à suspensão, a mistura foi homogeneizada por 1 min, seguida de centrifugação a 10.000 g por 20 min. O DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de igual volume de isopropanol, incubado a -20°C por 1 hora e centrifugado a 10.000 g por 20 min. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em 300 µl de tampão TE (Tris-EDTA, 10:1 mM) estéril, segundo Ayres *et al.* (2002). O material obtido foi purificado com

fenolclorofórmio e utilizado nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

3.2. Amplificação de fragmentos do gene do receptor por PCR

Foram desenhados 8 primers específicos (**Tabela 1**) à partir de trechos conservados na sequência do cDNA do receptor da toxina Bin em *C. pipiens* descrita por Darboux *et al.* (2002) e disponível no "GenBank" (AF222024), para serem utilizados na amplificação de fragmentos do gene do receptor da toxina Bin a partir de DNA genômico de larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias CqRL1/2362 e CqSF. Os primers 5'-3' foram desenhados com um sítio de restrição inicial para a enzima *Pst* 1 (CTGCAG) e os primers 3'-5' foram desenhados com sítio de restrição inicial para a enzima *Hind* III (AAGCTT). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada primer (**Tabelas 1 e 2**), 2,5 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 1,4 µM de MgCl₂ e 100 ng do DNA molde. Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 50 seg, 55°C por 50 seg e 72°C por 120 seg, e uma etapa final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TBE 0,05X, corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 1. Primers desenhados a partir do cDNA do receptor da toxina Bin em *Culex pipiens* e respectiva posição na sequência.

Primer	Sequência	Posição
1	5'-GCA CTGCAG ATGCGACCGCTGGGAGCTTTG-3'	1-22
2	5'-CGA CTGCAG CAGCACGCGACGTTCTACCAG-3'	94-114
3	5'-GAA AAGCTT CAGCTGGAAGTTGAACGGCAT-3'	940-960
4	5'-AAC AAGCTT ACGAAATCTCCCAGGTCCACG-3'	1524-1544
5	5'-GAC AAGCTT GTAATTTATGACTACACGAAG-3'	1734-1754
6	5'-CGCCAGGGAGCTCACATGCCGTT-3'	925-947
7	5'-AAC AAGCTT GAAATCTCCCAGGTCCACGGT-3'	1522-1542
8	5'-CAC AAGCTT CTCTCAGCACAAACCGAATC-3'	1645-1663

*Letras em negrito indicam sítios de restrição na sequência dos primers para *Pst* I (CTGCAG) e *Hind* III (AAGCTT)

Tabela 2. Associações dos primers utilizados em cada reação em cadeia da polimerase e tamanho em pares de bases (pb) dos fragmentos esperados excluindo o 1º íntron.

Associações	Tamanho (pb)
1-3	≈960
2-3	≈867
2-4	≈1451
2-5	≈1661
2-7	≈1449
2-8	≈1570
6-4	≈620
6-5	≈830
6-7	≈618
6-8	≈739

3.3. Digestão, purificação dos produtos de PCR e clonagem do gene em vetores específicos

Os fragmentos amplificados foram submetidos à extração com fenolclorofórmio, clorofórmio hidratado seguido de precipitação com NaCl 0,3 M e 2,5 volumes de etanol, centrifugação e ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM / EDTA 1 mM). Após a extração os fragmentos foram

digeridos com as enzimas de restrição *Pst* I / *Hind* III por 4 horas a 37°C e passaram por inativação por 15 min a 65°C para gerar extremidades adesivas facilitando a clonagem. Os vetores plasmidiais de expressão e de clonagem utilizados, também foram submetidos à digestão com as enzimas citadas. Todos os fragmentos digeridos foram purificados com o Kit Qiaex II gel extraction® (Qiagen), e as combinações vetor plasmidial/fragmento de PCR foram tratados com T4 DNA ligase® (Biolabs) à 400 U/μl. Os fragmentos de ≈960 e 1449 pb gerados pelas associações de primers 1-3 e 2-7 (**Tabela 2**), foram selecionados para clonagem no plasmídeo pGEM3Zf⁺ (Promega – vetor de clonagem). Já o fragmento de ≈867 pb do gene do receptor em *C. quinquefasciatus* gerado pela associação de primers 2-3 (**Tabela 2**) foi selecionado para clonagem usando o plasmídeo pRSETc (Invitrogen – vetor de expressão). A **Figura 2** (apêndice) resume os procedimentos de clonagem. Após a etapa de ligação, os DNAs plasmidiais foram empregados na transformação de bactérias competentes (*Escherichia coli* DH5α). Foram realizadas Mini e Maxi preparações de DNA plasmidial, estas foram purificadas, quantificadas e encaminhadas ao sequenciamento para a obtenção da sequência completa do gene do receptor.

3.4. Extração de RNA total de larvas, isolamento de RNA poli (A)⁺ e RT-PCR

O RNA total de conjuntos de 40 larvas do 4º estágio das colônias CqSF e CqRL1/2362 foi extraído com uma solução de trizol e clorofórmio hidratado com água DEPC, seguido de precipitação com isopropanol, lavagem com etanol a 70%, centrifugação e ressuspensão com H₂O DEPC. O RNA Poli (A)⁺ foi isolado das extrações de RNA total utilizando-se o Oligotex mRNA Purification Kit® (Qiagen). As amostras de RNA foram quantificadas através de espectrofotometria (λ = 260 nm) e análise em gel de agarose 1% em comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). A reação de transcrição reversa (RT-PCR)

foi realizada a 37°C por 1 hora com $\cong 50 \mu\text{g}$ de RNA total ou $\cong 250 \text{ ng}$ de mRNA, 7,5 U de transcriptase reversa AMV® (Gibco BRL), tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8.3 / 9mM MgCl_2 / 50 mM NaCl / 1mM de DTT e 2 μM de primer 4. A enzima transcriptase reversa foi inativada a 55°C por 10 min. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μl , contendo: 0,2 mM de cada dNTP, 1,6 μM da associação de primers 6-7 (**Tabela 2**), 2,5 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), tampão com 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 1,4 μM de MgCl_2 e 5 μl do cDNA. Cada amostra foi amplificada sob as mesmas condições descritas no item 3.2.

3.5. Amplificação de fragmentos do cDNA do receptor por RACE

A técnica de RACE (Rápida amplificação das porções finais do cDNA) foi realizada de acordo com o protocolo do GeneRacer® Kit (Invitrogen). Primeiramente, cerca de 250 ng de mRNA foram submetidos às seguintes reações: desfosforilação com 10 U de fosfatase intestinal de bezerro (CIP); remoção da estrutura 5' cap através de uma pirofosfatase ácida de tabaco (TAP); ligação do GeneRacer® RNA oligo (5'-CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA-3') ao mRNA sem a estrutura 5' CAP através da adição de 5 U de T4 RNA ligase na reação. A reação de transcrição reversa foi realizada a 50°C por 1 hora com $\cong 250 \text{ ng}$ de mRNA processado, 200 U de transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen), tampão com 50 mM de Tris-HCl pH 8.3 / 75 mM de KCl / 3 mM MgCl_2 , 0,5 mM de cada dNTP e 50 μM de primer GeneRacer® oligo dT (5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)_{18/24}-3'). A enzima transcriptase reversa foi inativada a 70° C por 15 min. Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 μM do GeneRacer® 5' primer / 0,8 μM do primer 7 ou 0,8 μM do primer 2 / 0,6 μM do GeneRacer® 3' primer (**Tabela 1 e 3**), 2,5 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), 2,5 μl de tampão 10X, 1,4 μM de MgCl_2 e 1 μl do cDNA respectivo. As amplificações foram

realizadas sob as mesmas condições descritas no item 3.2. Os produtos de PCR da reação acima foram submetidos a uma segunda amplificação com um novo conjunto de primers adaptadores GeneRacer® 5' Nested primer/primer 3 ou GeneRacer® 3' Nested primer/primer 6 respectivamente (**Tabela 1 e 3**), sob as mesmas condições anteriormente citadas. Os novos produtos de PCR foram purificados com Kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit® (Qiagen), clonados em TOPO® vetor através do TOPO TA cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) e sequenciados.

Tabela 3. Sequências dos primers utilizados no GeneRacer® Kit.

Primer	Sequência
GeneRacer® 5' Primer	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'
GeneRacer® 5' Nested Primer	5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'
GeneRacer® 3' Primer	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
GeneRacer® 3' Nested Primer	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

3.6. Sequenciamento e montagem da sequência do gene do receptor

Cada amostra plasmidial foi purificada com Qiagen Plasmid Max Kit® (Qiagen). Para sua quantificação, alíquotas de DNA plasmidial linearizado foram comparadas em gel de agarose 1% com quantidades definidas de marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen). Para cada reação de sequenciamento cerca de 1 µg de plasmídio e 2 µl de primer a 5 µM foi enviado para o Centro de Estudos do Genoma Humano – USP/Setor de Sequenciamento de DNA. Os eletroferogramas das reações de sequenciamento foram analisados através do programa BioEdit. Os alinhamentos das sequências e montagem da sequência final foi realizado através do programa MegaAlign. O alinhamento múltiplo de proteínas ortólogas de vários insetos foi realizado através do programa BioEdit, usando a ferramenta de alinhamento Clustal W.

4. Produção da proteína recombinante do receptor

4.1. Transcrição e tradução *in vitro*

A construção plasmidial pRSETc/Frag. 2-3 foi linearizada com a enzima de restrição *Hind* III a 37° C e submetida à extração com fenolclorofórmio, clorofórmio hidratado seguido de precipitação com NaCl 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100%, centrifugação e ressuspensão em tampão TE. Aproximadamente 3 µg de DNA plasmidial linearizado foi transcrito *in vitro* com 5 µl do tampão de transcrição (Tris-HCl 100 mM / MgCl₂ 150 mM), 2 µl de T7 RNA polimerase 5 U/µl (Amersham Biosciences), 0,5 µl de cada rNTP (UTP, ATP, GTP e CTP) a 100 mM, 0,5 µl de DTT 1 M, 1,5 µl do inibidor de RNase e H₂O em um volume final de 50 µl. A reação foi incubada a 37° C por 1 hora. Após esse tempo foi adicionado 0,5 µl de T7 RNA polimerase na reação e incubada a 37° C por 30 minutos. Ao término da incubação adicionou-se ao sistema 50 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) para cessar a reação. Do volume final da reação de transcrição (100 µl), foi analisado 1 µl dos transcritos em gel de agarose a 1%. Os RNAs sintéticos obtidos foram extraídos em fenolclorofórmio nas mesmas condições citadas anteriormente e ressuspensos em 30 µl de tampão TE. Uma alíquota de 1 µl de RNA purificado ($\cong$ 1 µg/µl) foi traduzido em 3,3 µl de lisado de reticulócito de coelho (sistema de tradução – Promega) suplementado com 0,2 µl de metionina marcada com ³⁵S (2,5 µCi/reação). A reação foi submetida a uma temperatura de 30° C por 90 minutos seguida de adição do tampão de amostra Laemmli 2X. Os produtos das traduções foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) e exposto ao filme β-Max® (Amersham) para autoradiografia.

4.2. Expressão e purificação da proteína recombinante (Rec-45 kDa)

Para expressar a proteína recombinante de ≈ 45 kDa (Rec-45 kDa), codificada pelo fragmento de ≈ 867 pb obtido pela associação de primers 2-3 (**Tabela 2**) e clonado no vetor de expressão pRSETc (**Figura 2 do apêndice**), células competentes do tipo BLR de *E. coli* foram transformadas com o plasmídio e plaqueadas em meio LB suplementado com ampicilina, tetraciclina (12 $\mu\text{g/ml}$) e cloranfenicol (20 $\mu\text{g/ml}$). Uma colônia da placa foi selecionada, inoculada em 10 ml de meio LB com os mesmos antibióticos acima citados e incubada a 37°C, sob agitação por 12 horas. A cultura crescida foi inoculada em 500 ml de meio de cultura (LB) suplementado apenas com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) e submetida às mesmas condições de incubação citadas anteriormente. O crescimento bacteriano foi monitorado através da densidade ótica ($\lambda=600$ nm) de alíquotas do meio de cultura no espectrofotômetro. Ao atingir densidade ótica de 0,5, as bactérias foram induzidas a 30° C com IPTG na concentração final de 0,1 mM durante 4 horas. Uma alíquota de 200 μl de meio de cultura foi centrifugada a 5.000 g por 3 min. Ao sedimento foi acrescentado 80 μl de tampão de amostra Laemmli 2X e 15 μl da amostra foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 15%, o gel foi corado com azul de comassie R-250 e analisado. O volume restante foi centrifugado a 5.000 g por 10 min a 4° C. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 20 ml de tampão PBS para posterior lise através de um sonificador. Foi adicionado Triton-X 1% final ao lisado para posterior centrifugação a 5.000 g por 10 min a 4° C. Ao sobrenadante foi adicionado imidazol 5 mM e 200 μl de resina de agarose Ni-NTA® (Qiagen) previamente equilibrada com PBS após três lavagens consecutivas. A mistura foi incubada por 1 hora a 4° C sob leve agitação. Após incubação a amostra foi centrifugada a 5.000 g por 2 min, o sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada três vezes com 1 ml de tampão PBS. A proteína Rec-45 kDa ligada a resina foi eluída

através de sucessivas lavagens com tampão de lavagem (50 mM de Na_2PO_4 /300 mM de NaCl/ 10% de glicerol pH 6) e 20 mM de imidazol (1ª lavagem); tampão de lavagem e 0.5 M de imidazol (2ª e 3ª lavagens). A resina final foi ressuspensa com 200 μl de PBS/glicerol 10% e armazenada a - 70°C. Um volume de 10 μl de cada eluato e da resina restante foi acrescido de igual volume de tampão Laemmli 2X e 10 μl foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE 15%, visualizado após coloração com azul de Coomassie R-250, para avaliar a purificação.

4.3. Obtenção de soro policlonal anti Rec-45 kDa

Foram utilizados dois coelhos para imunização com a proteína Rec-45 kDa. Antes da etapa de imunização, foi coletada uma amostra de 10 ml de sangue dos animais para obtenção do soro pré-imune. Este soro foi coletado do sangue após centrifugação a 5.000 g por 10 min e armazenado a - 70°C. Cerca de 200 μg da proteína Rec-45 kDa foi fracionada em gel preparativo SDS-PAGE 12,5%, visualizada após coloração com azul de Coomassie R-250 e extraída através de secção do gel preparativo. A banda extraída do gel, correspondente à Rec-45 kDa (200 μg), foi macerada em um sistema duplo de seringas junto com 200 μl de adjuvante de Freund (Gibco BRL Life Technologies) e 600 μl de tampão PBS. A emulsão foi inoculada em cada coelho pela via subcutânea em três pontos. Foram realizadas quatro imunizações com intervalo de 15 dias. Na 1ª imunização foi utilizado o adjuvante completo, enquanto que nas demais imunizações foi utilizado o adjuvante incompleto. Após a 3ª imunização, foram coletadas amostras de soro dos coelhos para o teste do anticorpo quanto ao reconhecimento da proteína Rec-45 kDa. De acordo com o resultado obtido no teste preliminar, foi realizada uma punção cardíaca nos animais para obter grande quantidade de soro contendo os anticorpos policlonais anti-45 kDa. O soro foi armazenado a - 70°C para posterior avaliação da sua eficácia em sistemas de western-blot para a detecção da própria proteína Rec-45 kDa ou do receptor nativo.

III. Resultados

1. Detecção do receptor em larvas da colônia CqSF e CqRL1/2362

1.1. Detecção do receptor por afinidade

Ensaio de ligação foram feitos entre a toxina Bin imobilizada e o extrato de proteínas de *microvilli* intestinal solubilizadas pelo CHAPS (extrato-CHAPS) das colônias susceptível CqSF e resistente CqRL1/2362. Foi evidenciada uma banda com aproximadamente 60 kDa na colônia CqSF. A presença desta banda demonstrou que aquela proteína liga-se especificamente à toxina imobilizada sobre as microesferas (**Figura 1, CqSF -**). A especificidade da banda foi comprovada pela redução da sua intensidade em amostras onde a incubação foi feita na presença de um excesso do competidor (**Figura 1, CqSF +**). Na incubação realizada com extrato da colônia CqRL1/2362 não foi detectada a presença de receptor funcional (**Figura 1, CqRL1/2362**).

2. Clonagem e sequenciamento do gene

2.1. Análise *in silico* de sequências

Inicialmente, a sequência de cDNA do receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, obtida no "GenBank" (AF222024) foi comparada às sequências dos genes de proteínas ortólogas identificadas em sequências genômicas de *Anopheles* e *Drosophila*. De uma forma geral as sequências protéicas são bastante semelhantes mas existem diferenças significativas em alguns trechos, em especial, nas extremidades amino e carboxi-terminal. A nível de nucleotídeos não existem sítios de restrição conservados entre as sequências de *C. pipiens* e *Anopheles* a não ser um sítio para *Pvu* II na posição 957 do gene de *Culex*. Em uma primeira abordagem partimos para amplificar por PCR e clonar o gene do receptor de *C.*

quinquefasciatus, utilizando para isso a sequência do gene de *C. pipiens* como molde para o desenho de primers 5' e 3' específicos. Entretanto, antevedendo dificuldades para o seu desenho, devido às variações nas sequências entre as duas subespécies, foram selecionados os trechos mais conservados no cDNA do receptor em *C. pipiens*, a partir da comparação com as sequências de *Anopheles* e *Drosophila*.

Uma observação interessante resultante da análise de sequências foi a identificação da presença de íntrons neste gene nas sequências genômicas obtidas de *Anopheles* e *Drosophila*. O primeiro íntron de ambas as sequências é o mesmo e parece ser conservado evolutivamente. Este é um íntron de fase 0 e que provavelmente estaria presente no gene do receptor da toxina Bin em *C. pipiens* (cuja sequência foi derivada do seu cDNA) e em *C. quinquefasciatus* (**Figura 2**). Este íntron em *Anopheles* começa após os aminoácidos TYY e termina antes dos aminoácidos GEE, da posição 1263 a 1325. Os mesmos aminoácidos flanqueiam o primeiro íntron em *Drosophila* que vai da posição 1231 a 1296. Essas trincas são conservadas no cDNA da α -glicosidase em *C. pipiens* sinalizando o possível local onde haveria um íntron. Com base na sequência de *Anopheles*, um segundo íntron foi previsto para o gene do receptor da toxina Bin em *C. pipiens* e em *C. quinquefasciatus*. Este íntron em *Anopheles* começa após os aminoácidos KAG e termina antes dos aminoácidos DEV, da posição 1763 a 1840. Essas trincas também são conservadas no cDNA da α -glicosidase em *C. pipiens* sinalizando o local onde haveria um segundo íntron nesta espécie. Estes dados da presença de íntrons são de grande relevância tendo em vista que neste trabalho foram utilizadas sequências genômicas de *C. quinquefasciatus*.

2.2. Amplificação do fragmento por PCR e clonagem

Foram desenhados oligonucleotídeos (primers) com sítios de restrição específicos para permitir a amplificação e clonagem de fragmentos do gene do receptor da toxina Bin à partir do DNA genômico

de larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias CqSF e CqRL1/2362. Inicialmente, todos os primers desenhados foram testados quanto a sua eficiência em amplificar fragmentos do gene a partir do DNA genômico de *C. pipiens* em reações de PCR. Todos os primers anelaram eficientemente a sequência gênica de *C. pipiens*, cujo DNA foi utilizado como molde (**Figura 3A**).

A técnica já otimizada foi aplicada em PCR utilizando como molde o DNA genômico de *C. quinquefasciatus* (**Figura 3B**). Três associações de primers foram selecionados e utilizados em PCRs com DNA genômico de *C. quinquefasciatus*: 1-3, 2-7 e 2-3 (**Tabela 3**). Os fragmentos de ≈ 960 pb (associação de primers 1-3) e ≈ 1449 pb (associação de primers 2-7) foram clonados em pGEM3Zf⁺, sequenciados e analisados. O fragmento de ≈ 867 pb (associação de primers 2-3) foi clonado no pRSETc, descrito mais adiante. As amplificações de fragmentos do gene do receptor foram obtidas de larvas da colônia CqSF e da colônia CqRL1/2362 (**Tabela 3**) evidenciando que o gene do receptor está presente em larvas da colônia resistente, apesar desta proteína não ter sido detectada em frações de *microvilli* intestinal de larvas desta colônia (**Figura 1**). Apenas os primers 8 e 5 (**Tabela 1**) não anelaram a sequência do gene resultando assim na ausência de um fragmento gênico correspondente a sequência de aminoácidos da porção carboxi-terminal do receptor, que incluiria o 2º íntron predito.

2.3. RT-PCR e detecção do mRNA do gene do receptor

A técnica de RT-PCR foi realizada com o objetivo de detectar se o mRNA do gene do receptor estava presente nas larvas das colônias CqSF e CqRL1/2362, isto é, se o gene do receptor estava sendo transcrito. Em amostras de mRNA isolado de larvas armazenadas a - 70°C da colônia CqSF onde a enzima transcriptase reversa estava presente, foi observada uma banda de tamanho esperado do fragmento do cDNA do receptor (>550 pb) indicando a presença do mRNA na amostra de RNA total

(**Figura 4**). Já na amostra de mRNA isolado de larvas armazenadas a -70°C da colônia CqRL1/2362 não houve amplificação de nenhum fragmento, indicando que não havia mRNA no meio (**Figura 4**). É interessante ressaltar que nas duas amostras, sem a enzima transcriptase reversa, foi detectado um fragmento maior (>650 pb) idêntico ao gerado na PCR com DNA genômico (**Figura 4**). Esse resultado indica que a polimerização foi feita a partir de DNA genômico contaminante presente no tubo de RNA total. A diferença de tamanho dos fragmentos gerados a partir do cDNA (>550 pb) ou DNA genômico (>650 pb) é compatível com a presença de íntrons no gene, como predito a partir da análise de sequências. As mesmas amostras foram tratadas com DNase, submetidas ao RT-PCR, e nesse caso a amplificação de tais fragmentos na ausência de transcriptase reversa foi abolida (resultados não apresentados). A detecção por RT-PCR dos mesmos fragmentos a partir de RNA total, em lugar do mRNA purificado, de amostras de larvas armazenadas a -70°C das colônias CqSF e CqRL1/2362 mostrou resultados semelhantes.

Quando o RT-PCR foi conduzido novamente nas mesmas condições citadas anteriormente porém empregando larvas frescas, detectou-se a presença do mRNA do receptor tanto nas amostras de larvas sensíveis como nas de larvas resistentes (**Figura 5**). Estes resultados corroboram com a hipótese exposta posteriormente de que o mRNA do receptor de amostras de larvas resistentes é instável, e por isso não é detectado nas amostras congeladas ao contrário das amostras frescas.

2.4. Amplificação das extremidades 5' e 3' do cDNA do receptor por RACE e clonagem

Para obter o fragmento gênico de larvas das colônias CqSF e CqRL1/2362 correspondente a porção carboxi-terminal do receptor não obtido por PCR convencional (vide item 2.2), e para confirmar que a proteína de 60 kDa detectada nos ensaios de afinidade é o receptor da toxina Bin, foram isoladas as extremidades 5' e 3' do cDNA

correspondente. Oligonucleotídeos do GeneRacer® Kit (Invitrogen) e primers gene específicos permitiram a amplificação e clonagem de fragmentos 5' e 3' do cDNA do receptor da toxina Bin à partir de mRNA isolados de larvas das colônias CqSF e CqRL1/2362. Duas associações de primers foram utilizados em PCRs com cDNA do receptor: (GeneRacer® 5' primer e primer 7/GeneRacer® 3' primer e primer 2). Outros dois conjuntos de primers foram utilizados numa segunda amplificação feita à partir do produto de PCR anterior (GeneRacer® 5' Nested primer e primer 3/GeneRacer® 3' Nested primer e primer 6). Os fragmentos 5' (>1000 pb) e 3' (>850 pb) obtidos por RACE, que contém as extremidades 5' e 3' do cDNA do receptor, foram clonados em TOPO® vetor (vetor de clonagem), sequenciados e analisados.

2.5. Sequenciamento do gene e alinhamento múltiplo de sequências

Dois clones de cada construção plasmidial que continha o fragmento do gene do receptor correspondentes a associação de primers 1-3 e 2-7 para as colônias CqSF e CqRL1/2362 foram sequenciados. Quatro clones de cada construção plasmidial que continha o fragmento 5' para colônia CqSF e 3' para as colônias CqSF e CqRL1/2362, obtidos através da técnica de RACE, foram sequenciados em sua totalidade.

Após a montagem da sequência final do gene do receptor para *C. quinquefasciatus* da colônia CqSF foi obtida uma sequência de 1925 pb com 59 pb da região 5' não traduzida (5' UTR), 1743 pb de região codificadora, 50 pb do 1º íntron (identificado por comparação entre a sequência do cDNA de *C. pipiens* com as sequências genômicas e derivadas do RACE de *C. quinquefasciatus*) e 73 pb da região 3' não traduzida (3' UTR) (**Figura 6**). Na região da 3' UTR foram identificados, a partir dos vários fragmentos de RACE obtidos, quatro sítios de início da cauda poli-A com dois possíveis sinais de poliadenilação, sendo que

apenas um deles é idêntico ao consenso AATAAA e está associado a 3' UTR completa.

A sequência do gene do receptor da toxina Bin de *C. quinquefasciatus* comparada ao cDNA do receptor de *C. pipiens* apresentou uma variação de 83 nucleotídios e a sequência protéica deduzida variou em 16 aminoácidos, evidenciando a variação genética existente entre estas duas subespécies (**Figura 6**).

A comparação das sequências do gene do receptor de *C. quinquefasciatus* entre as colônias CqRL1/2362 e CqSF apresentou variação de um único nucleotídeo e uma deleção de 19 nucleotídeos, na posição 1333 a 1352 (**Figura 6**). Essa deleção de 19 pb provoca uma mudança na fase de leitura gerando 28 aminoácidos em fase diferente e um códon de finalização na posição 1439. Este códon de finalização estaria localizado antes do 2º íntron previsto, através da análise de sequências *in silico* (item 2.1). Este 2º íntron não pôde ainda ser confirmado experimentalmente uma vez que está posicionado fora da sequência presente nos fragmentos genômicos utilizados no sequenciamento.

A sequência protéica do receptor de *C. quinquefasciatus*, composta por 580 aminoácidos, foi utilizada em comparações com sequências depositadas no banco de dados de proteínas visando identificar proteínas ortólogas de outros dípteros. Várias maltases de insetos tiveram uma alta homologia. Esta proteína foi então alinhada a proteínas ortólogas de *C. pipiens* (Darboux *et al.*, 2001), *Ae. aegypti* (TC 44701 - 251 aminoácidos da porção carboxi-terminal de uma sequência de "EST" gerada pelo projeto genoma de *Ae. aegypti* realizado pelo TIGR), *An. gambiae* (EAA14808) e *D. melanogaster* (AAF53128.2) com similaridades de sequência de 98, 80, 78 e 65% respectivamente (**Figura 7**). É possível identificar múltiplos trechos de alta homologia e alguns segmentos mais divergentes, em especial nas extremidades amino e carboxi terminais e mais especificamente em *D. melanogaster*.

3. Produção da proteína recombinante do receptor

3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante

Ensaio de transcrição e tradução *in vitro*, utilizando lisado de reticulócito de coelho, demonstraram que o plasmídeo pRSETc contendo o fragmento gênico obtido pela associação de primers 2-3 gerou por transcrição um mRNA específico (por volta de 1 kb) que foi traduzido em presença de metionina marcada radioativamente. A autoradiografia evidenciou uma banda protéica no tamanho esperado de 45 kDa (**Figura 8**).

A partir deste resultado foi realizada a expressão da proteína recombinante de 45 kDa fusionada a uma sequência de poli-histidinas na sua extremidade amino-terminal. A análise em SDS-PAGE de extrato total de *E. coli* transformada com esse plasmídeo mostrou a presença da proteína recombinante esperada com um peso molecular de $\cong 45$ kDa (Rec-45 kDa). Esta foi produzida em larga escala através de indução da expressão em bactérias competentes transformadas (**Figura 9**), purificada por cromatografia de afinidade e utilizada para imunização de coelhos e obtenção de soro policlonal específico (vide item 3.3).

3.2. Funcionalidade da proteína recombinante (Rec-45 kDa)

Os ensaios de afinidade para verificar a funcionalidade da proteína recombinante mostraram que a Rec-45 kDa se ligou especificamente a toxina Bin imobilizada. Na presença de um excesso do competidor, a banda não foi observada o que demonstra a especificidade de ligação (**Figura 10**). Nesta figura pode ser observado o controle positivo representado pela proteína nativa de 60 kDa do extrato de *microvilli* intestinal solubilizado que ligou-se especificamente às esferas-Bin (**Figura**

10). Este resultado evidenciou pela primeira vez que o sítio de ligação da toxina Bin localiza-se na porção amino-terminal da molécula do receptor, através da funcionalidade observada para esta proteína recombinante.

3.3. Funcionalidade dos anticorpos policlonais anti Rec-45 kDa

O teste preliminar realizado após 3^a imunização dos animais demonstrou que apenas um deles apresentou uma resposta positiva. O soro policlonal anti Rec-45 kDa obtido após punção cardíaca foi testado quanto a sua capacidade de reconhecer a proteína Rec-45 kDa e a proteína nativa de 60 kDa presente em extrato-CHAPS (proteínas de *microvilli* intestinais solubilizadas) de larvas de *C. quinquefasciatus*. O soro pré-imune coletado também foi testado em paralelo. Os ensaios de afinidade seguidos por western-blot, utilizando o anticorpo primário anti Rec-45 kDa, mostrou que o anticorpo reconheceu especificamente a proteína recombinante de 45 kDa e o receptor nativo (60 kDa) em extrato-CHAPS de larvas da colônia CqSF (**Figura 11**). O anticorpo policlonal apresentou um ótimo reconhecimento do receptor nativo de 60 kDa pois esta molécula foi detectada tanto no extrato-CHAPS previamente incubado com a toxina Bin imobilizada (**Figura 11, Extrato total -**), como no extrato total sem ter passado pela etapa seletiva de incubação (**Figura 11, Ex-T**). Estes anticorpos servirão como ferramenta de detecção da expressão/localização do receptor nativo em preparações de larvas.

IV. Discussão

Apesar do excelente desempenho do *B. sphaericus* como larvicida em programas de controle de vetores, sabe-se que populações de *Culex* submetidas ao uso intensivo e prolongado podem apresentar resistência a este agente (Georghiou *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995; Silva-filha *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003). Neste trabalho foi

investigado o mecanismo molecular de resistência de uma colônia de *C. quinquefasciatus* (CqRL1/2362) que foi submetida à forte pressão de seleção em laboratório e apresentou um nível de resistência elevado e de uma ordem superior a 100.000 vezes em relação a uma colônia susceptível (CqSF) (Pei *et al.*, 2002). Estudos recentes indicaram que o mecanismo de resistência nesta colônia está associado a uma falha da ligação da toxina Bin ao receptor (Oliveira *et al.*, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho de fato confirmaram que larvas da colônia resistente (CqRL1/2362) não possuem receptores funcionais em preparações ricas em *microvilli* intestinal (BBMF) ao contrário do que foi demonstrado para a colônia CqSF. Nesta observou-se que uma proteína de 60 kDa é o receptor da toxina Bin. Este resultado preliminar mostrou que o receptor em *C. quinquefasciatus* poderia ser o mesmo do que aquele descrito para larvas de *C. pipiens* (Silva-Filha *et al.*, 1999; Darboux *et al.*, 2001)

Com base nestes resultados foi realizada a clonagem, sequenciamento e caracterização do gene do receptor da toxina Bin das colônias CqSF e CqRL1/2362, para identificação de eventuais mutações associadas à resistência e comparação do mecanismo de resistência com aquele descrito em *C. pipiens* (Darboux *et al.*, 2002). Os primers específicos, desenhados a partir de cDNA do receptor da toxina Bin em *C. pipiens*, permitiram a amplificação e clonagem de 89 % da sequência do gene do receptor (fragmentos gênicos gerados pela associação de primers 1-3 e 2-7 que correspondem a uma sequência de 1590 pb contando com 1º íntron previsto) em larvas de *C. quinquefasciatus* de ambas as colônias. O não anelamento de dois dos oito primers sintetizados na sequência gênica estudada, impossibilitou a obtenção do trecho do gene correspondente a porção carboxi-terminal do receptor onde está presente o 2º íntron predito. Este evento é justificado pelas variações genéticas evidenciadas entre a sequência do cDNA do receptor de *C. pipiens* (Darboux *et al.*, 2001), utilizado como molde para o desenho de primers,

e a sequência do gene do receptor em *C. quinquefasciatus*, obtida neste trabalho.

As reações de transcrição reversa realizadas com mRNA isolados de RNA total de larvas frescas das colônias CqSF e CqRL1/2362 evidenciaram a presença do mRNA do receptor da toxina Bin em larvas de ambas as colônias, embora não houvesse moléculas funcionais nas preparações de BBMF das larvas da colônia resistente. Porém deve ser ressaltado que a ausência do mRNA do receptor na colônia CqRL1/2362 quando foram empregadas larvas congeladas leva a crer que este mRNA pode ser instável. A hipótese inicialmente proposta a partir destes resultados é que poderia haver uma mutação no gene que desse origem a um mRNA aberrante que estaria sendo degradado, e o receptor da toxina Bin não estaria sendo expresso. Será necessária a utilização de uma técnica mais refinada para a análise quantitativa deste mRNA em amostras resistentes, como o "northern-blot" ou PCR em tempo real, já que a técnica de RT-PCR apenas detecta a presença ou ausência do mRNA do receptor.

Os mRNAs de larvas frescas das colônias CqSF e CqRL1/2362 foram submetidos à técnica de RACE para o isolamento e clonagem das extremidades do cDNA do receptor. O sequenciamento de fragmentos do gene do receptor da toxina Bin ou do cDNA correspondente de larvas de *C. quinquefasciatus* das colônias CqSF e CqRL1/2362 foi um passo fundamental para a elucidação do mecanismo molecular da resistência. A análise comparativa dessas sequências facilitou a identificação de mutações no gene da linhagem resistente que poderiam estar envolvidas neste mecanismo, e a existência de variações genéticas (polimorfismos) entre os genes do receptor de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*. A comparação entre as sequências do gene bem como do cDNA do receptor de larvas sensíveis e resistentes, mostrou que uma deleção de 19 nucleotídeos na colônia resistente é responsável pela mudança na fase de leitura de 28 aminoácidos e por um códon de terminação prematuro (posição 1439). Este códon de terminação está localizado logo após o 1º íntron e antes do 2º íntron predito. É sabido que na maioria das vezes um

mRNA aberrante que possui um códon de terminação da tradução prematuro (PTC), ou seja posicionado antes do último íntron do gene, pode ser instável e ser degradado pela via de decaimento de mRNA mediada por mutações "nonsense" (NMD/"nonsense-mediated mRNA decay") (González *et al.*, 2001). Este mecanismo regula a terminação prematura da tradução e promove a degradação dos transcritos aberrantes que codificariam proteínas não funcionais e incompletas (González *et al.*, 2001). O NMD é um exemplo de mecanismo de sobrevivência evidenciado em vários organismos (Wilkinson e Shyu, 2002; Singh e Lykke-Andersen, 2003; Culbertson e Leeds, 2003; Graham, 2003; Holbrook *et al.*, 2004). Uma outra hipótese, caso o mRNA seja estável, é que ele codificaria uma proteína de cerca 452 aminoácidos que seria desprovida de uma extremidade carboxi-terminal contendo a âncora GPI. Para que esta proteína atue como receptor da toxina Bin, é sabido através de outros estudos, que é necessário haver um sítio de ligação funcional e se apresentar sob a forma de proteína de membrana no epitélio intestinal de larvas (Nielsen-LeRoux e Charles, 1992; Silva-Filha *et al.*, 1997, 1999).

O único trabalho sobre a base molecular da resistência à toxina Bin do *B. sphaericus* (Darboux *et al.*, 2002) foi realizado a partir de uma colônia de *C. pipiens* denominada GEO, selecionada previamente em laboratório e que apresentou alto nível de resistência (Wirth *et al.*, 2000). No caso da colônia GEO a base da resistência foi uma mutação pontual no gene do receptor, responsável pela formação de um códon de terminação da tradução prematuro, que resultou na produção de uma proteína de 566 aminoácidos desprovida de âncora GPI. O interessante é que a base molecular da resistência investigada neste trabalho está relacionada a uma mutação bem mais extensa e que eventualmente interromperia a expressão desta molécula, mesmo sob a forma de proteína secretada. A partir destes resultados poder-se-ia pensar que a molécula que atua como receptor para a toxina Bin em *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* estaria presente em outras espécies, mesmo refratárias como *Ae. aegypti*, porém com diferenças básicas que não permitissem a sua ação no mesêntero.

Como o receptor na realidade é uma enzima que possui primordialmente um papel fisiológico no processo digestivo, este achado seria bastante plausível (Darboux *et al.*, 2002; Silva-Filha *et al.*, 1999).

A proteína recombinante (Rec-45 kDa) obtida se ligou especificamente à toxina Bin confirmando a identidade do fragmento clonado no plasmídio de expressão como sendo o receptor da toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus*, além de caracterizar o local onde está presente o sítio de ligação à toxina Bin. Este resultado demonstrou que o sítio de ligação da toxina Bin está localizado na porção amino-terminal da molécula. O estudo comparativo desta região com as respectivas sequências de outras espécies susceptíveis e refratárias poderiam permitir, através do emprego de técnicas específicas como mutagênese sítio dirigida, a determinação do epitopo correspondente ao sítio de ligação propriamente dito. Serão realizados ensaios de afinidade entre as respectivas proteínas Rec-45 kDa clonadas a partir do DNA das colônias CqSF e CqRL1/2362 para confirmar que o sítio de ligação da proteína Rec-45 kDa da colônia resistente é também funcional e reforçar a base molecular da resistência evidenciada neste trabalho.

Uma vez comprovada a eficácia do anticorpo anti Rec-45 kDa em reconhecer especificamente o receptor nativo da toxina Bin em extratos protéicos de larvas de *C. quinquefasciatus* da colônia CqSF, será necessário testar a presença deste receptor em preparações de larvas da colônia CqRL1/2362. Este anticorpo policlonal servirá como ferramenta de detecção da expressão/localização do receptor em larvas de *Culex* através de ensaios de imunodetecção com diferentes tipos teciduais para demonstrar a hipótese de degradação do mRNA do receptor pela via NMD. Estes anticorpos policlonais, bem como primers desenhados com base no estudo comparativo de sequências do gene do receptor, podem ser empregados como ferramentas de diagnóstico de populações resistentes de *Culex* durante a execução de programas de controle utilizando larvicidas a base de Bs.

Estudos de resistência às toxinas Cry produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), detectada por larvas de coleópteros e lepidópteros têm sido extensivamente realizados dada à importância do seu emprego na agricultura (Ferré & Van Rie, 2002). Já foram detectados dois mecanismos básicos de resistência: 1 – modificação ou ausência de ligação entre as toxinas Bt e seus receptores de membrana intestinal específicos (Van Rie *et al.*, 1990; Ferré *et al.*, 1991) e 2 - alterações na atividade de proteinases intestinais responsáveis pela ativação da protoxina no intestino das larvas (Forcada *et al.*, 1996; Oppert *et al.*, 1997; Pang *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2001). Ainda não foram realizados estudos mais aprofundados com a finalidade de elucidar qual a base molecular do mecanismo de resistência ao Bt, a nível estrutural de sequência gênica codificadora do receptor específico, como foi elucidado neste trabalho para o gene do receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*. Neste trabalho, os resultados evidenciam que o receptor nativo (60 kDa) da toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus* é o mesmo descrito inicialmente para *C. pipiens* (Silva-Filha *et al.*, 1999; Darboux *et al.*, 2001) e que a deleção existente na sequência do gene do receptor de larvas da colônia CqRL1/2362 não afeta o sítio de ligação na molécula do receptor, ao contrário de hipóteses propostas em outros trabalhos (Nielsen-LeRoux *et al.*, 1995). A partir dos resultados obtidos seria possível sugerir que a molécula alvo de ação da toxina Bin seria passível de um certo nível de polimorfismo nas populações naturais e este seria um aspecto importante a ser investigado. A produção de conhecimento científico a respeito do receptor da toxina Bin em *C. quinquefasciatus* e a compreensão da base molecular da resistência ao Bs nesta espécie permitem adotar estratégias capazes de evitar ou retardar o fenômeno da resistência bem como fornecer suporte para o uso racional deste biolarvicida.

V. Conclusão

O receptor nativo da toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus* é uma maltase de 60 kDa cujo sítio de ligação para toxina Bin está localizado na porção amino-terminal desta proteína. O gene do receptor de larvas da colônia CqSF possui uma sequência de 1925 pb. A sequência do cDNA do receptor de *C. quinquefasciatus* apresenta variações genéticas em relação ao cDNA de *C. pipiens*. A deleção detectada na sequência do gene do receptor de larvas da colônia CqRL1/2362 é responsável pela resistência. Os anticorpos policlonais detectaram eficientemente o receptor nativo sendo uma ferramenta eficaz de detecção do receptor em preparações de larvas.

VI. Referências bibliográficas

Ayres, C.F.J., Romão, T.P.A., Melo-Santos, M.A.V., Furtado, A.F., 2002. Genetic diversity in brazilian populations of *Aedes albopictus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 871-875.

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

Barbazan, P., Baldet, T., Darriet, F., Escaffre, H., Djoda, D.H., Hougard, J.M., 1997. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. J. Am. Mosq. Control Assoc. 13, 263-269.

Bourgouin, C., Delecluse, A., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. Appl. Environ. Microbiol. 56, 340-344.

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

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.

Chevillon, C., Bernard, C., Marquine, M., Pasteur, N., 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. J. Med. Entomol. 38, 657 – 664.

Culbertson, M.R. & Leeds, P.F., 2003. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. Curr. Opin. Genetics Develop. 13, 207 – 214.

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 as a mechanism of bioinsecticide resistance. Proc. Nat. Acad. Sci. Usa. 99, 5830 - 5835.

Davidson, E.W., Oei, C., Meyer, M., Bieber, A.L., Hindley, J., Berry, C., 1990. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. Can. J. Microbiol. 36, 870 - 878

Ferré, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinseticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 5119 – 5123.

Ferré, J., & Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol. 47, 501 - 33.

Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M.D., Martínez, R., 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archiv. Insect Biochem. Physiol.* 31, 257 – 272.

Georghiou, G.P., Malik, J.I., Wirth, M., Sainato, K., 1992. Characterization of resistance of *Culex quinquefasciatus* to the insecticidal toxins of *Bacillus sphaericus* (strain 2362). *In: University Of California, Mosq. Control Research, Annual Report (J Coast & L Chase, Eds)*, 34 - 35.

González, C.I., Bhattacharya, A., Wang, W., Peltz, S.W., 2001. Non-sense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 274, 15 – 25.

Graham, S.V., 2003. Nonsense-mediated decay breaks the circle? *Biochem. J.* 373.

Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J., 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *App. Environ. Microbiol.* 67, 1085 – 1089.

Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature Genetics*. 36, 801 – 808.

Hougard, J.M., Mbentengam, R., Lochouarn, L., Escaffre, H., Darriet, F., Barbazan, P., Quillevere, D., 1993. Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. *Bull. World Health Org.*, 71, 367-375.

Kumar, P.A., Sharma, R.P., Malik, V.S., 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Adv. Appl. Microbiol., 42, 1-43.

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., Thiéry, 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* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 34, 321 - 327.

Nielsen-LeRoux, C., Pasteur, N., Pretre, J., Charles, J.-F., Sheikh, H.B., Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-mediterranean countries. J. Med. Entomol. 39, 729 - 735.

Oliveira, C.M.F., Costa Filho, F., Beltràn, J.F.N., Silva-Filha, M.H., Regis, L., 2003. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* populations and its

resistance to *Bacillus sphaericus*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 19, 125 - 129.

Oliveira, C.M.F., Silva-Filha, M.H.N.L., Nielsen-LeRoux, C., Pei, G., Yuan, Z., Regis, L.N., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* from China and Brazil (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 41, 58 - 64.

Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Donovan, J., McGaughey, W.H., 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biological Chemistry. 272, 23473 - 23476.

Pang, A.S.D., Gringorten, J.L., Bai, C., 1999. Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. Can. J. Microbiol. 45, 816 - 825.

Pei, G., Oliveira, C.M.F., Yuan, Z., Nielsen-LeRoux, C., Silva-Filha, M.H., Yan, J., Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3003 - 3009.

Rao, D.R., Mani, T.R., Rajendran, R., Joseph, A.S.J., Gajanana, A., Reuben, R., 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11, 1 - 5.

Regis, L., Silva-Filha, M.H., Oliveira, C.M., Rios, E.M., Da Silva, S.B., Furtado, A.F., 1995. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90, 115-119.

Regis, L., Da Silva, S.B., Melo-Santos, M.A., 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1, 207-210.

Rodcharoen, J., & Mulla, M.S., 1994. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to the microbial agent *Bacillus sphaericus*. J. Econ. Entomol. 87, 1133 – 1140.

Silva-Filha, M.H.N.L., Regis, L.N., 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.N.L., Charles, J.-F., Nielsen-LeRoux, C., 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.

Singh, G. & Lykke-Andersen, J., 2003. New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. Trends Biochem. Sciences. 28, 464 – 466.

Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H., 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Env. Microbiol. 56, 1378 – 1385.

Wilkinson, M.F., & Shyu, A.-B., 2002. RNA surveillance by nuclear scanning? Nat. Cell Biol. 4, E144 – 147.

Wirth, M.C., Georgiou, 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.

Yadav, R.S., Sharma, V.P., Upadhyay, A.K., 1997. Field trial of *Bacillus sphaericus* strain B-101 (serotype H5a, 5b) against filariasis and Japanese encephalitis vectors in India. J. Am. Mosq. Control Assoc., 13, 158-163.

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.

FIGURAS

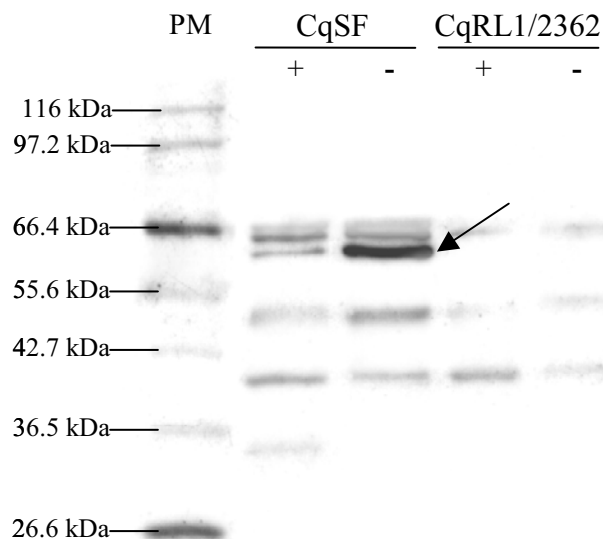


Figura 1. Ensaio de afinidade para detecção do receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* (Bs). Incubação entre extratos-CHAPS (proteínas de microvilli intestinal solubilizadas) de larvas de *Culex quinquefasciatus* sensíveis (CqSF) e resistentes (CqRL1/2362) e a toxina Bin imobilizada. Incubação feita na presença (+) ou na ausência (-) da toxina livre em excesso (competidor). Immunodetecção com anticorpos primários anti-BBMF. PM: marcador de peso molecular. A seta indica o receptor nativo (60 kDa).

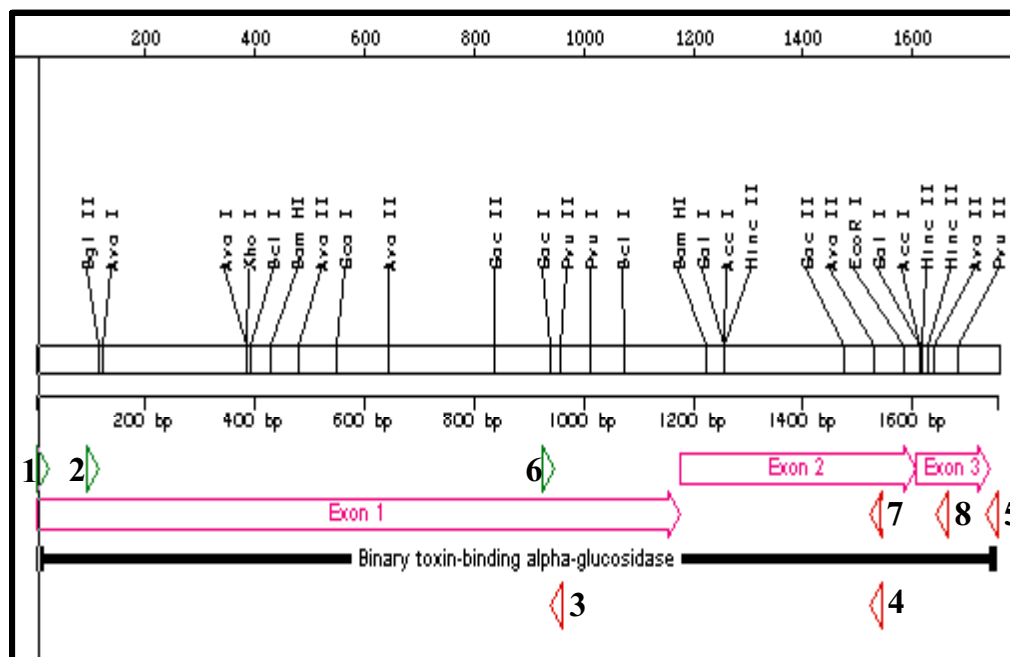


Figura 2. Esquema do cDNA do receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em *Culex pipiens*. Setas em verde indicam a posição dos primers 5' utilizados, setas em vermelho indicam a posição dos primers 3' utilizados. Setas largas em rosa ilustram a posição dos éxons e na intersecção das setas temos a localização dos dois íntrons preditos por análise de sequência de proteínas ortólogas de *Anopheles* sp. e *Drosophila* sp.

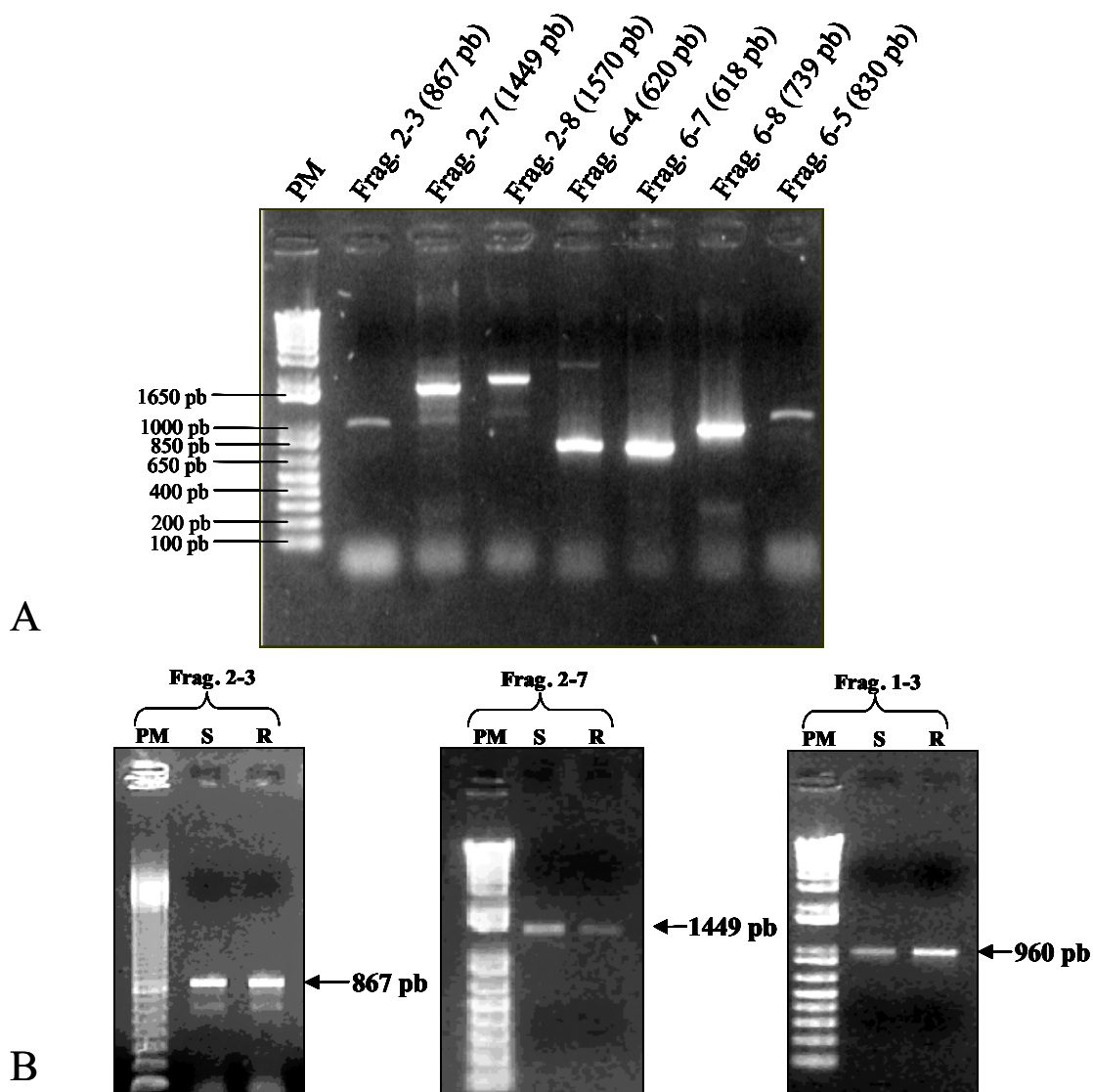


Figura 3. Análise dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico de larvas de *Culex pipiens* (A) e *Culex quinquefasciatus* (B) de uma colônia susceptível (S) e resistente (R). PM: marcador de peso molecular em pares de bases (pb). Fragmentos do gene do receptor obtidos pela associação de primers e tamanho em pares de bases (pb) sem considerar o 1º íntron.

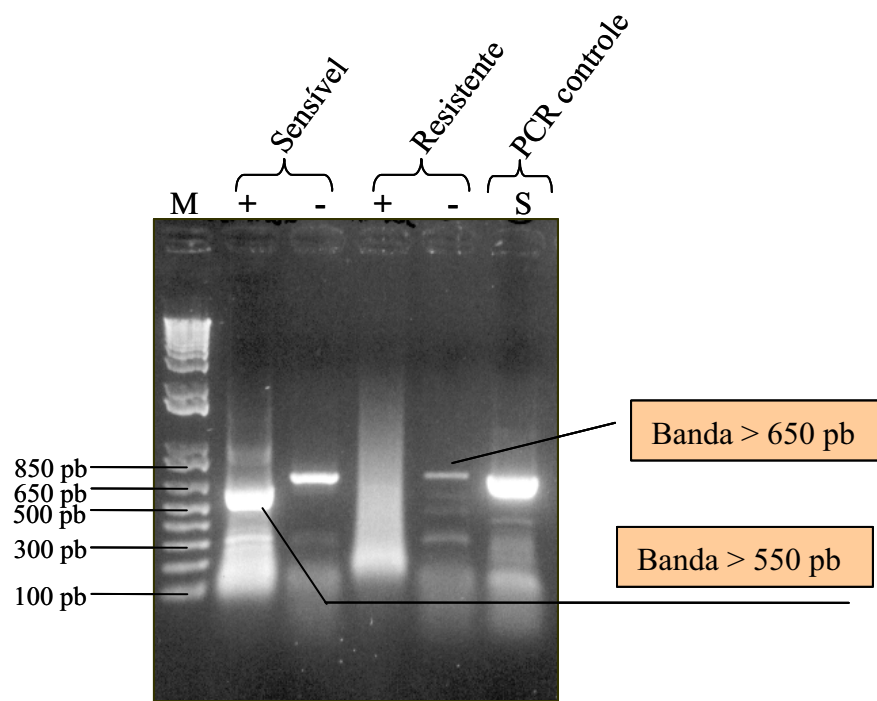


Figura 4. Detecção do mRNA do receptor da toxina Bin em larvas de *Culex quinquefasciatus* armazenadas a -70°C . RT-PCR de amostras de mRNA isolados de RNA total de larvas congeladas sensíveis (CqSF) e resistentes (CqRL1/2362) não tratados com DNase. M: marcador de peso molecular. RT-PCR com (+) e sem (-) a enzima transcriptase reversa (controle negativo). PCR controle de DNA genômico de larvas sensíveis (S) (controle positivo). As setas indicam os fragmentos obtidos a partir de cDNA (>550 pb) e de DNA genômico (>650 pb).

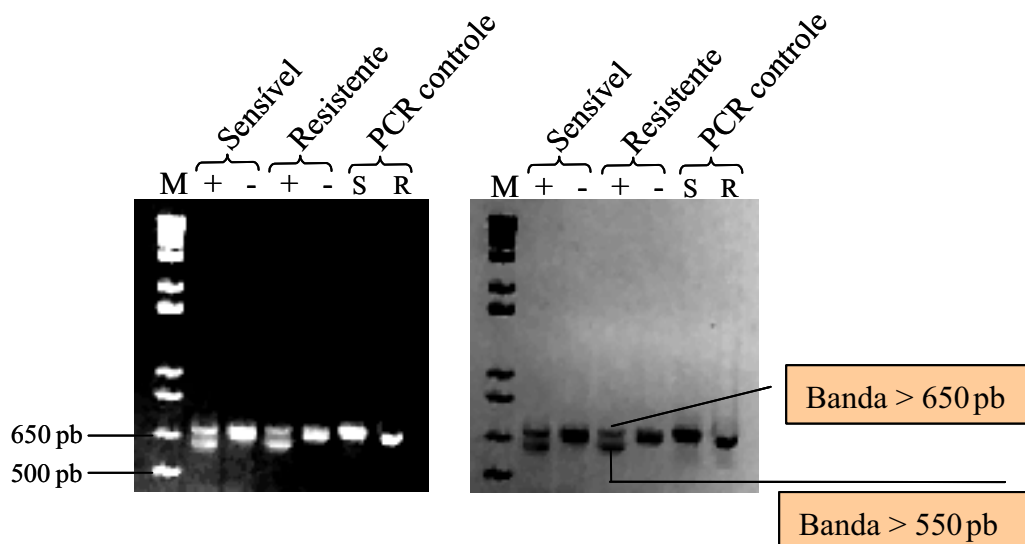


Figura 5. Detecção do mRNA do receptor da toxina Bin em larvas frescas de *Culex quinquefasciatus*. RT-PCR de amostras de mRNA isolados de RNA total de larvas frescas sensíveis (CqSF) e resistentes (CqRL1/2362) não tratados com DNase. M: marcador de peso molecular. RT-PCR com (+) e sem (-) a enzima transcriptase reversa (controle negativo). PCR de DNA genômico de larvas sensíveis (S) (controle positivo) e resistentes (R). As setas indicam os fragmentos obtidos a partir de cDNA (>550 pb) e de DNA genômico (>650 pb).

.....ggacactggacatggactgaaggagtagaaagtttcaatcgagctgctctccgagcaag 59

Primer 1
 atgcgaccgctgggagctttgagcctagtcgctctgttggcgatgaccgtcaacgggctagcgattcggaaccggactc 139
 t gt c g t
 M R P L G A L S L V A L L A M T V N G L A I R E P D S

Primer 2
 gaaggactggatatcagcagcgacgttctaccagatctatccgaggtcggttttggacagcaacggcgatgggattgggtg 219
 c c a g
 K D W Y Q H A T F Y Q I Y P R S F L D S N G D G I G

atttggcggggatcacctccaagatgaagtactttggcggatattgggattgacgcgacgtggttgagcccgccgttcaag 299
 c
 D L A G I T S K M K Y L A D I G I D A T W L S P P F K

tcaccgctgaaagactttgggtatgatgtgtcggatttctacgctatccagccggagtacgggaaatttgacggattttga 379
 g c c
 S P L K D F G Y D V S D F Y A I Q P E Y G N L T D F D

caagtgtggtggaggaaatcgacacaagaatgggatcaagctgatgctggaattttattccgaaccactcgagtgaacagcacg 459
 g c t
 K L V E E S H K N G I K L M L D F I P N H S S D Q H

agtgtttgtgaagtctgtggcgcgggatccggagtaacgtgacttttatgtgtggaagaccctcgcgacagggggtggt 539
 a t a t
 E W F V K S V A R D P E Y S D F Y V W R P P A T G G G

ccgccaataattggatctcggtatttggagggctcggtggacatataatacagcgagaggggagtactatctgacca 619
 c c a g t
 P P N N W I S V F G G S A W T Y N T A R G E Y Y L H Q

gtttacgcctcagcagccggatttgaactaccggaatccgaaggtgctggcgagatgaccaagatgttgttcttctggt 699
 t
 F T P Q Q P D L N Y R N P K V L A E M T K M L F F W

tggaccgtggagtggtggttccggttggacgctatcaaccacatgttcgaggatgagcagttccgggatgagccgttg 779
 g
 L D R G V D G F R L D A I N H M F E D E Q F R D E P L

tctgggtggggacagtccggagagtagcattcttggatcacatttatacaaaaggacatcccgatgtgtatgatgtggt 859
 c t a c
 S G W G Q S G E Y D S L D H I Y T K D I P D V Y D V V

ttacaactggcgggatcagatggataagattccgcgagagaagggcgtactatcatcttgatgacggaagcgatttoga 939
 g g ct
 Y N W R D Q M D K Y S A E K G R T I I L M T E A Y S

Primer 6 **Primer 3**
 gcatcgagggaacgatgctgtatacagagagtgcggacgggaagcgccaggagctcacatgcgttcaacttcacgtg 1019
 t t a
 S I E G T M L Y Y E S A D R K R Q G A H M P F N F Q L

atctatgactttaagaaggagcagaacgccgttgggctgaagagttcgatcgactggtggatgaacaacatgccggctcg 1099
 I Y D F K K E Q N A V G L K S S I D W W M N N M P A R

acacactccaagctgggtagctggatcgcatgatcactcgcggttagcgtcacgagttggactagatcgggttgatcagg 1179
 a g a
 H T P S W V A G S H D H S R V A S R V G L D R V D Q

Intron 1
 tcatgacgttgcctgcataccctgccggggactagtagtattacgtattacgtaagtaccagtgagttcctccaagattctgtc 1259
 a a
 V M T L L H T L P G T S I T Y Y - - - - -

taacatttgttttccagggtgaagaggtagccatgcaggacttcaaagaggctcagcagttcgacaaccgagatccgaac 1339
 - - - - - G E E V A M Q D F K E A Q Q F D N R D P N

cggacgccgatgagtcgggactcgtcgaccagtgcggggttcagtaccaacaccaacacctggctccgagttcatccgga 1419
 R T P M Q W D S S T S A G F S T N T N T W L R V H P D

ctacgctcgggtacaacgtagacgtgatgcagaagaatccaaaagtaccttccaccacttccagcatctgaccaagcttc 1499
 Y A R Y N V D V M Q K N P Q S T F H H F Q H L T K L

gacggcacccggacgatgcagagtgggtgagtacgtgcaaacgacggtcggaaaccaaggtgtacgcattgctgagggaaactc 1579
 R R H R T M Q S G E Y V H K T V G T K V Y A L L R E L

cggtgagggattcgttcttgacggtgctgaacatggccggagcagaggataccgtggatctgggagatttcgctgaatct 1659
 R G E D S F L T V L N M A G A E D T V D L G D F V N L

Intron 2 - provável
 ↓

tccgcagaagatgcgagtcgaggtggcgcaaccgaaatccaagtcgaagggcggcaatgaggtcgacatcggcaagttga 1739
 P Q K M R V E V A Q P N S K S K A G N E V D I G K L

cgctgggaccgtacgattcgggtgtgctgagagcaacgggttcgctcggcagctgctatcaacctttcgattggattgctg 1819
 T L G P Y D S V V L R A T V S S A A A I N L S I G L L

ctacgcatatggccaggtatatcttcgtgtagtaa--attacggtcacgtgcatggctgatacaggcgttaattagcct 1896
 L A I M A R Y I F V .

↓ ↓ ↓ ↓
 ttgtaacataaaaactctcttatcaacc 1925

Figura 6. Sequência de nucleotídeos do gene do receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus* e sequência de aminoácidos deduzida. Os primers 5' e 3' utilizados estão indicados pelo texto em azul e rosa respectivamente (o texto em verde indica local de intersecção dos primers 3 e 6). Os nucleotídeos e aminoácidos em vermelho são aqueles divergentes em relação a sequência de *Culex pipiens* (os nucleotídeos correspondentes à *C. pipiens* estão abaixo da sequência). O texto em itálico indica o 1º íntron conservado evolutivamente nas sequências homólogas de *Anopheles* sp. e *Drosophila* sp. A seta larga indica a provável localização do 2º íntron predito. A deleção de 19 nucleotídeos presente no gene do receptor das larvas resistentes da colônia CqRL1/2362 está sublinhada (a localização do códon de terminação da tradução subsequente está indicada em caixa com texto em negrito). Flanqueando a deleção houve duas mudanças de nucleotídeos que estão indicadas acima do texto em negrito. Os dois prováveis sinais de poliadenilação estão indicados em caixas e os sítios de adição de cauda poli-A identificados por setas. O sítio de *Hind* III assinalado está presente apenas na sequência de *C. quinquefasciatus* e indica o final do fragmento 2-7 clonado e usado no sequenciamento.

<i>C.p.quinquefasciatus</i>	1	--MRPLG--	ALSIVALIAM	TVNGIAIRPP	SKORYQHAT	SKORYQHAT	EYOIYPRSF	DSNGDGIGD	AGITSKRYL	ADIGIDATWL	SPFFKSPKQ	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD
<i>C.p.pipiens</i>	1	--MRPLG--	ALSIVALIAM	TVNGIAIRPP	DAKWOQHAT	DAKWOQHAT	EYOIYPRSF	DSNGDGIGD	AGITSKRYL	ADIGIDATWL	SPFFKSPKQ	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD
<i>Ae.aegypti</i>	1												
<i>An.gambiae</i>	1	MKFEPEVTV	STIVALISAC	ALQAAEVRPP	DEKWOQHAT	DEKWOQHAT	EYOIYPRSF	DSNGDGIGD	KGITARKEVY	ACIGIDATWL	SPFFKSPKQ	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD
<i>D.melanogaster</i>	1	--MRAPLAQIL	LPSILNSGSI	MAGLWKSDETE	DFIDWHEITV	DFIDWHEITV	EYOIYPRSF	DSNGDGIGD	KGITARKEVY	ADIGIDATWL	SPFFKSPKQ	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD
<i>C.p.quinquefasciatus</i>	106	FDKLVESFK	NGIKLMDFI	PNHSSDOHWM	FVKSVARDE	FVKSVARDE	YSEYVWRPP	----	PNNMWISVFC	GSMTVNTAR	GEYVHQHPT	QPDINYNRP	KVLAETKML
<i>C.p.pipiens</i>	106	FDKLVESFK	NGIKLMDFI	PNHSSDOHWM	FVKSVARDE	FVKSVARDE	YSEYVWRPP	----	PNNMWISVFC	GSMTVNTAR	GEYVHQHPT	QPDINYNRP	KVLAETKML
<i>Ae.aegypti</i>	1												
<i>An.gambiae</i>	111	MEETAEARR	HGIKLMDFI	PNHSSDOHWM	FVKSVARDE	FVKSVARDE	YSEYVWRPP	----	PNNMWISVFC	GSMTVNTAR	GEYVHQHPT	QPDINYNRP	KVLAETKML
<i>D.melanogaster</i>	110	FEELIDTAFE	LGIKVLDVDF	PNHSSDOHWM	FVKSVARDE	FVKSVARDE	YSEYVWRPP	----	PNNMWISVFC	GSMTVNTAR	GEYVHQHPT	QPDINYNRP	KVLAETKML
<i>C.p.quinquefasciatus</i>	211	FWLDRGVDC	ERLDATNHME	EDEQERDEFL	SGMCOSEY	SGMCOSEY	DSJDHLYTKD	IPDVYEVVN	WRDQDKVSA	EKGR--TIIIL	MTEAVSSTEG	TMLYVESADR	KROGAHMPFN
<i>C.p.pipiens</i>	211	FWLDRGVDC	ERLDATNHME	EDEQERDEFL	SGMCOSEY	SGMCOSEY	DSJDHLYTKD	IPDVYEVVN	WRDQDKVSA	EKGR--TIIIL	MTEAVSSTEG	TMLYVESADR	KROGAHMPFN
<i>Ae.aegypti</i>	1												
<i>An.gambiae</i>	221	SEWEEKGVDC	ERLDATNHME	EDEQERDEFL	SGMCOSEY	SGMCOSEY	DSJDHLYTKD	IPDVYEVVN	WRDQDKVSA	EKGR--TIIIL	MTEAVSSTEG	TMLYVESADR	KROGAHMPFN
<i>D.melanogaster</i>	219	LFWLNKGWAG	ERLDATNHME	EDEQERDEFL	SGMCOSEY	SGMCOSEY	DSJDHLYTKD	IPDVYEVVN	WRDQDKVSA	EKGR--TIIIL	MTEAVSSTEG	TMLYVESADR	KROGAHMPFN
<i>C.p.quinquefasciatus</i>	318	FOLYDFRKE	QNAVGLKSSI	DWMNMMPAR	HTPSWAGSH	HTPSWAGSH	DHSRVASRVG	IPRVQVMTL	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>C.p.pipiens</i>	318	FOLYDFRKE	QNAVGLKSSI	DWMNMMPAR	HTPSWAGSH	HTPSWAGSH	DHSRVASRVG	IPRVQVMTL	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>Ae.aegypti</i>	84	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MIKVVHNYAS	INVDIOQNAE	INVDIOQNAE	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>An.gambiae</i>	327	FOLYDFRHD	QNAVGLKSSI	DWMNMMPAR	HTPSWAGSH	HTPSWAGSH	DHSRVASRVG	IPRVQVMTL	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>D.melanogaster</i>	328	HFTELVAGD	STARDYVINV	EMKLTIMPRG	HAANWVYGNH	HAANWVYGNH	DHSRVASRVG	IPRVQVMTL	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>C.p.quinquefasciatus</i>	411	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MURVHPDYAR	YNVDVWCKNP	YNVDVWCKNP	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>C.p.pipiens</i>	411	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MURVHPDYAR	YNVDVWCKNP	YNVDVWCKNP	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>Ae.aegypti</i>	84	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MIKVVHNYAS	INVDIOQNAE	INVDIOQNAE	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>An.gambiae</i>	420	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MURVHPDYAR	YNVDVWCKNP	YNVDVWCKNP	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>D.melanogaster</i>	438	RTPMQIDGTT	SAGFSTNNTT	MURVHPDYAR	YNVDVWCKNP	YNVDVWCKNP	OSTEHHHQHL	TSRRHRTMQ	LHTLPGTSIT	YXGEEVAMQD	EKBAQCFD--	----	NRDPN
<i>C.p.quinquefasciatus</i>	521	MRVEVAQPNIS	KSKAGNEVDI	CKLITLGPYDS	WILRAIVSSA	WILRAIVSSA	AAINUSIGLL	TAIMARVTEV	SGEYVHRTVG	TKYVALLREL	RGEDSFLTVL	NMAKAEITVD	LGDFVNLPOK
<i>C.p.pipiens</i>	521	MRVEVAQPNIS	KSKAGNEVDI	CKLITLGPYDS	WILRAIVSSA	WILRAIVSSA	AAINUSIGLL	TAIMARVTEV	SGEYVHRTVG	TKYVALLREL	RGEDSFLTVL	NMAKAEITVD	LGDFVNLPOK
<i>Ae.aegypti</i>	194	MTVQVACSNS	TIKAGDVHEI	SKVITLGPYDS	WILRAIVSSA	WILRAIVSSA	AAINUSIGLL	TAIMARVTEV	SGEYVHRTVG	TKYVALLREL	RGEDSFLTVL	NMAKAEITVD	LGDFVNLPOK
<i>An.gambiae</i>	530	LTVELAQPNIS	NYKAGNEVDI	HOVTLQOYDS	WILRAIVSSA	WILRAIVSSA	AAINUSIGLL	TAIMARVTEV	SGEYVHRTVG	TKYVALLREL	RGEDSFLTVL	NMAKAEITVD	LGDFVNLPOK
<i>D.melanogaster</i>	548	LTVELAQPNIS	NYKAGNEVDI	HOVTLQOYDS	WILRAIVSSA	WILRAIVSSA	AAINUSIGLL	TAIMARVTEV	SGEYVHRTVG	TKYVALLREL	RGEDSFLTVL	NMAKAEITVD	LGDFVNLPOK

Figura 7. Alinhamento múltiplo no programa Clustal W da sequência de aminoácidos do receptor da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em *Culex quinquefasciatus* com sequências de proteínas ortólogas de outros dípteros. Estas sequências são de *Culex pipiens* (AF222024), *Aedes aegypti* (seqüência parcial de "EST" gerada pelo projeto genoma de *Ae. aegypti* realizado pelo TIGR), *Anopheles gambiae* (EAA14808) e *D. melanogaster* (AAF53128.2). Os aminoácidos idênticos estão marcados em preto e os aminoácidos similares estão mostrados em cinza. Quando necessário foram inseridos espaços representados por traços para permitir um melhor alinhamento.

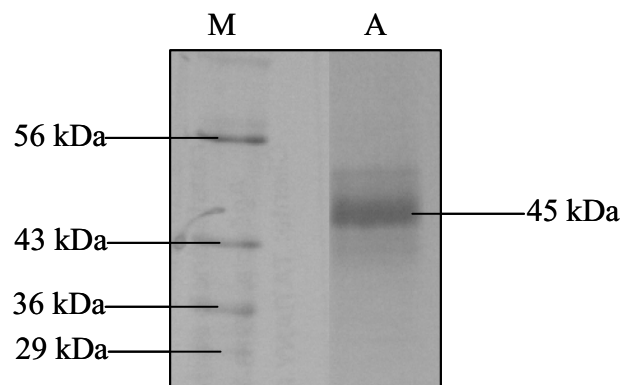


Figura 8. Transcrição e tradução *in vitro* do fragmento 2-3 do gene do receptor da toxina Bin. Autoradiografia de eletroforese em gel de poliacrilamida da tradução de mRNA transcrito *in vitro* e traduzido em meio com lisado de reticulócito e metionina marcada radioativamente. M: marcador de peso molecular radioativo. A: amostra da proteína recombinante (Rec-45 kDa) traduzida *in vitro*.

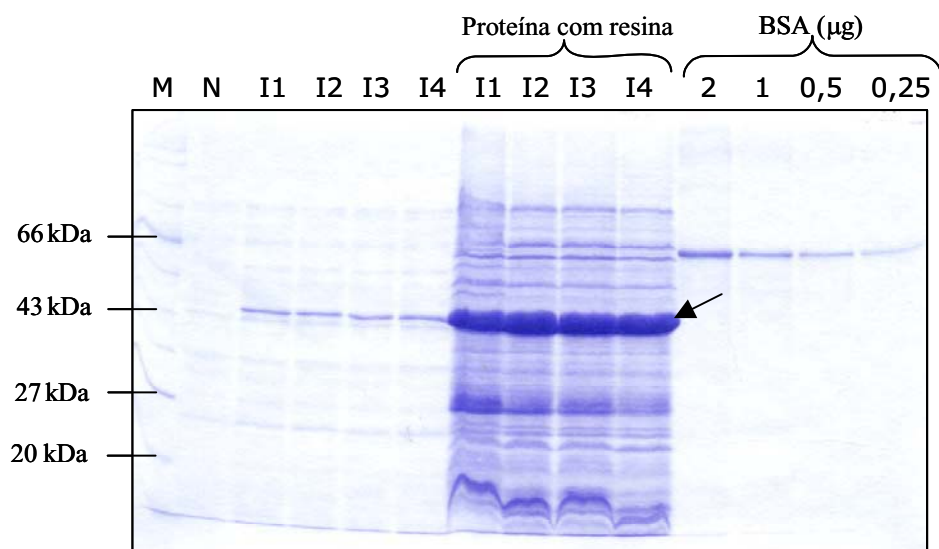


Figura 9. Separação eletroforética da proteína recombinante de 45 kDa em SDS-PAGE após indução da expressão em larga escala. M: marcador de peso molecular. N: controle negativo. I1, I2, I3 e I4: induções da expressão em larga escala da proteína recombinante antes e após a purificação com resina NI-NTA®. BSA: albumina do soro bovino. A seta indica a proteína Rec-45 kDa purificada.

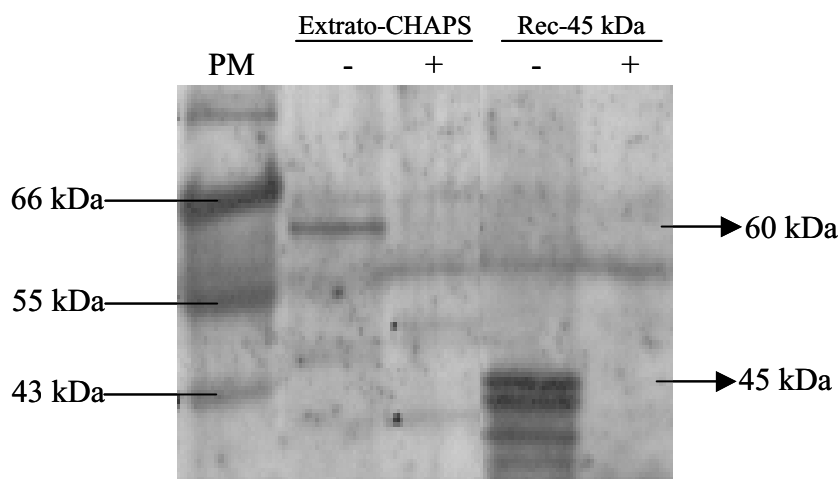


Figura 10. Ensaio de afinidade para testar a funcionalidade da proteína recombinante de 45 kDa (Rec-45 kDa). Incubação entre extrato-CHAPS (proteínas de *microvilli* intestinal solubilizadas) de larvas de *Culex quinquefasciatus* ou a Rec-45 kDa, e a toxina Bin imobilizada. Incubação feita na presença (+) ou na ausência (-) da toxina livre em excesso (competidor). Immunodeteccção com anticorpos primários anti-BBMF. PM: marcador de peso molecular. As setas indicam o receptor nativo (60 kDa) e a Rec-45 kDa.

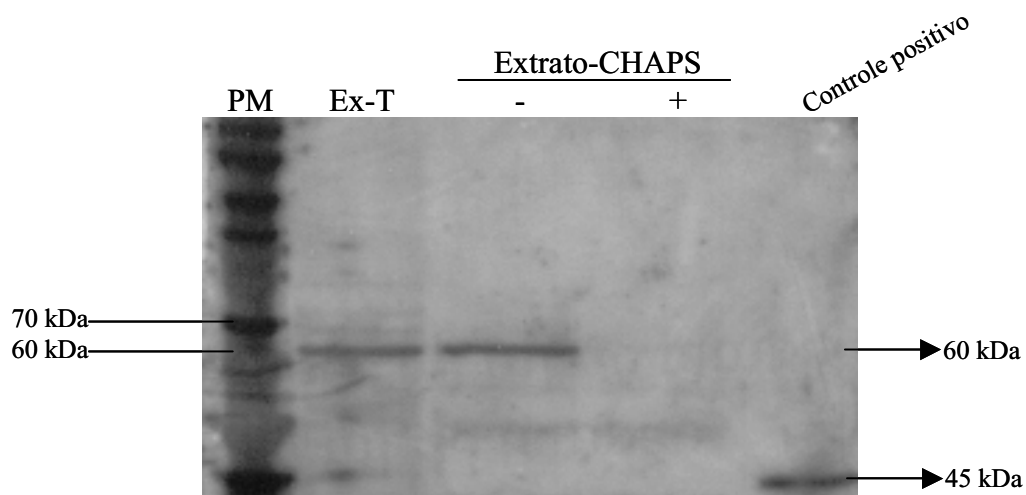


Figura 11. Ensaio de afinidade para avaliação da eficácia dos anticorpos policlonais anti Rec-45 kDa. Incubação entre extrato-CHAPS (proteínas de *microvilli* intestinal solubilizadas) de larvas de *Culex quinquefasciatus* e a toxina Bin imobilizada. Extrato total sem incubação com esferas Bin (Ex-T). Controle positivo Rec-45 kDa. Incubação feita na presença (+) ou na ausência (-) da toxina livre em excesso (competidor). Imunodeteccção com anticorpos anti Rec-45 kDa. PM: marcador de peso molecular. As setas indicam o receptor nativo (60 kDa) e a Rec-45 kDa.

APÊNDICE

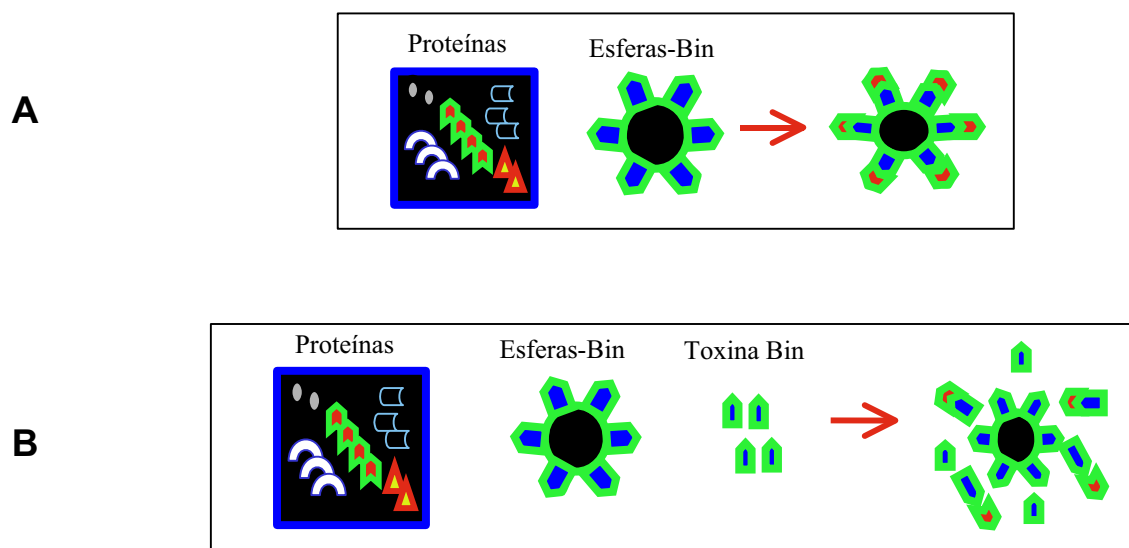


Figura 1. Representação do princípio dos ensaios de afinidade para detecção específica do receptor. Incubação das amostras de proteínas a serem analisadas com as esferas-Bin na ausência (A), e na presença de um excesso de competidor (B), para determinar a ligação específica de proteínas à toxina Bin.

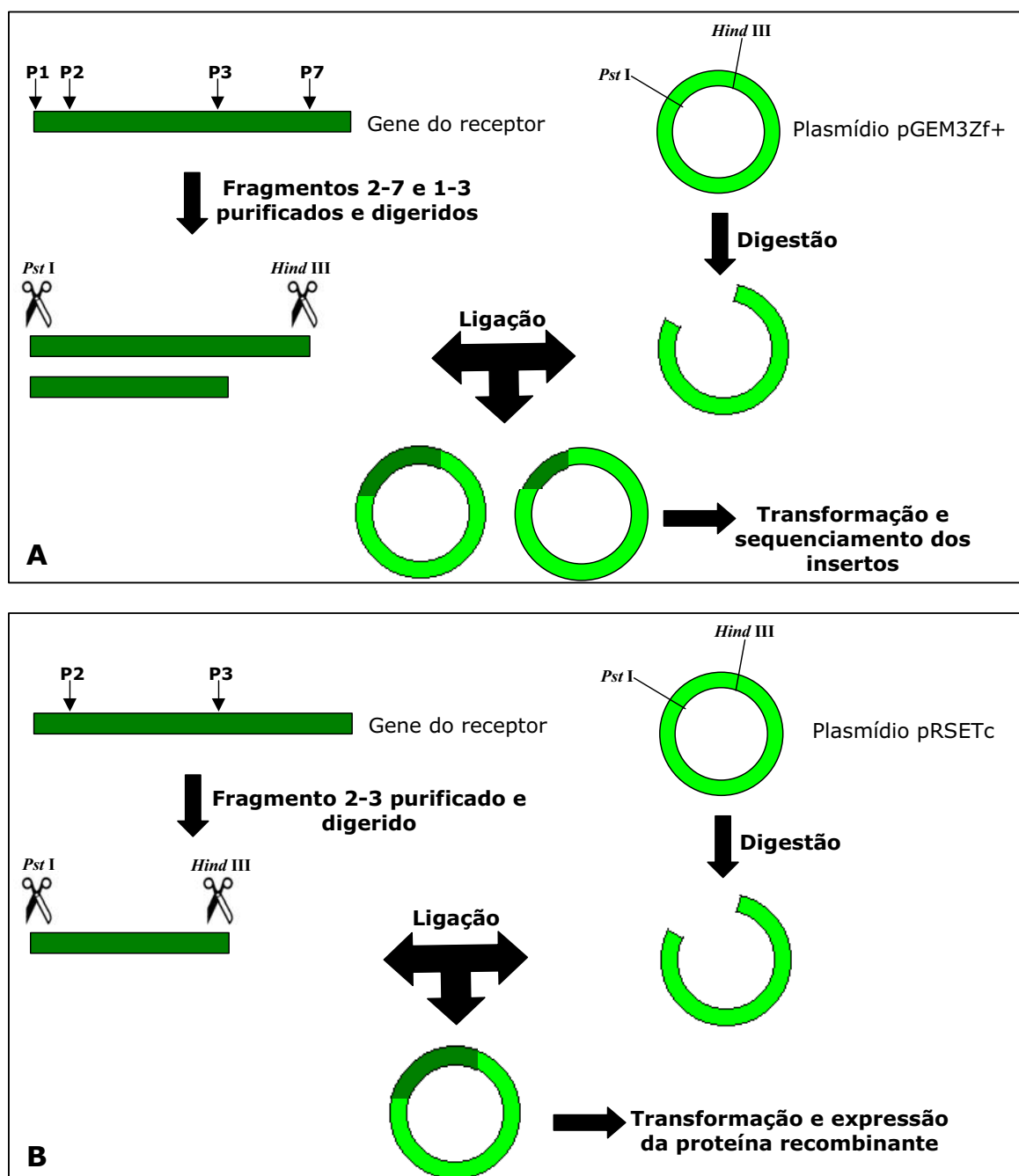


Figura 2. Representação esquemática da clonagem de fragmentos do gene do receptor da toxina Bin de larvas de *Culex quinquefasciatus* em vetores específicos de clonagem e expressão. (A), fragmento 2-7 (1449 pb, associação dos primers 2 e 7) e fragmento 1-3 (960 pb, associação dos primers 1 e 3) clonados para sequenciamento. (B), fragmento 2-3 (867 pb, associação dos primers 2 e 3) clonado no vetor de expressão para obtenção da proteína recombinante de 45 kDa.

ABSTRACT

The larvicidal activity of the *Bacillus sphaericus* (*Bs*) is due to the interaction of its binary toxin (Bin) with a specific receptor present in the midgut epithelium of Culicidae larvae. This work describes the cloning and sequencing of the gene encoding this receptor obtained from larvae of *Culex quinquefasciatus* colonies susceptible (CqSF) and resistant (CqRL1/2362) to *Bs*, in order to elucidate the molecular mechanism of resistance. First, *in vitro* affinity assays demonstrated that the Bin toxin receptor in the CqSF colony is a 60 kDa protein and that no functional molecule was observed in preparations of CqRL1/2362 larvae. The sequencing of the receptor gene from the CqSF colony revealed a 1925 pb sequence composed of 5' and 3' untranslated regions, coding sequence and intron. The corresponding sequence from the CqRL1/2362 colony showed a deletion of 19 nucleotides which generates a change in the reading frame for 28 amino acids and one premature translation stop codon. The presence of this premature stop codon can destabilize the respective mRNA, and prevent its translation, as well as lead to the synthesis of a truncated protein lacking the GPI anchor required for its positioning in the epithelial membrane. In both cases the absence of the receptor in the midgut epithelium would be the reason for the resistance. Here also a 45 kDa receptor recombinant protein was obtained and found to be functionally active, demonstrating that the toxin-binding site is located in the N-terminal portion of the molecule. Antibodies raised against this recombinant protein proved to be an excellent tool for the detection of the native receptor.