

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA-PPGEnt**

**Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 ativos para
larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, *Anopheles darlingi* Root, 1926 e
Culex quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) e caracterização das
toxinas mosquitocidas**

JOELMA SOARES DA SILVA

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2017

Joelma Soares da Silva

Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 ativos para larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) e caracterização das toxinas mosquitocidas

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-Orientadora: Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2017

BANCA JULGADORA

Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/AM

Dra. Beatriz Rochi Teles

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dra. Rosemary Aparecida Roque

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dra. Malu Christine Barbosa Feitosa

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

Dra. Eleilza Litaiff de Abreu

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA

FICHA CATALOGRÁFICA

S586	<p>Silva, Joelma Soares da</p> <p>Seleção de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner, 1911 ativos para larvas de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762, <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926 e <i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1823 (Diptera: Culicidae) e caracterização das toxinas mosquitocidas / Joelma Soares da Silva.</p> <p>--- Manaus: [s.n.], 2017.</p> <p>144 f., il.</p> <p>Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2017.</p> <p>Orientador: Wanderli Pedro Tadei.</p> <p>Coorientadora: Gislene Almeida Carvalho-Zilse.</p> <p>Área de concentração: Entomologia.</p> <p>1. Mosquitos. 2. Bacillus entomopatogênicos. 3. <i>Aedes aegypti</i>. I. Título.</p>
------	--

Sinopse:

Estudou-se a diversidade de *Bacillus thuringiensis* obtidos de três biomas brasileiros com ação patogênica para larvas de *Ae. aegypti*, *An. darlingi* e *Cx. quinquefasciatus*. Aspectos como caracterização molecular das linhagens ativas e a importância do gene *cytIAa* também foram analisados.

Palavras-chave: Mosquitos, Controle, *Bacillus* entomopatogênicos, Genes *cry* e *cyt*

Dedico este trabalho a minha família, por todo apoio, carinho e amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as coisas maravilhosas que tive a oportunidade de viver.

Ao curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade que possibilitou a continuidade da minha formação.

Ao meu orientador Doutor Wanderli Pedro Tadei por todos os ensinamentos, paciência, confiança e oportunidade de fazer ciência.

À minha Co-orientadora Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse, pelos ensinamentos, discussões e, principalmente, por ter aceitado entrar no mundo do controle dos mosquitos.

A Coordenação Nacional de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES, pelo financiamento.

A Universidade Federal do Maranhão, Campus VII, pelo apoio para a realização do Curso de Doutorado.

Aos Corpo Docente do Curso de Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Campus VII, por todo apoio, carinho e respeito, em especial aos amigos.

À Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro por todo apoio desde do início da minha carreira na pesquisa, pelos ensinamentos e por ter cedido a estrutura do Laboratório de Entomologia Médica, do CESC/UEMA, o que foi crucial para a realização do trabalho.

À Dra. Antonia Suely Guimarães e Silva e a Mestre Mery Jouse de Almeida Holanda, pela ajuda prestada e, principalmente, pela amizade e apoio.

À Dra. Maria Cleoneide da Silva, por toda ajuda prestada para a realização do trabalho.

À equipe do Labem, UEMA (Universidade Estadual do Maranhão), em especial às alunas Maxcilene Oliveira, Maria dos Remédios, Juliete, Silmara Gomes e Jéssica Sobral que tiveram participação ativa nesse estudo.

À Dra. Rose Roque pela ajuda, o que foi essencial para o melhoramento do trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Malária e Dengue, em especial aos amigos: Sirley, William parceria de força em todos os momentos, e também aos amigos: Adriano, Augusto, dos velhos tempos, e Eunice, Elerson, Marta, Ricardo, Juan e aos meus estagiários Mateus Nunes e Thiago.

À Mestre Rejane Simões pelo auxílio prestado na criação de *Anopheles darlingi*, pela dedicação a esses insetos.

A toda equipe do Grupo de Pesquisas em Abelhas (GPA) do INPA, pela contribuição, em especial a André e Diana, que foram as mãos amigas essenciais no sequenciamento das amostras.

Aos professores da UNESP (Universidade Estadual Paulista), Ricardo Polanczyk, Manoel Victor e Janete Aparecida, pelo estágio no laboratório de genética de bactérias.

Aos Técnicos Carlos, Acelino, Nonato e Francisco do Laboratório de Malária e Dengue, pelo apoio nas coletas e identificação dos mosquitos.

Ao técnico Marcus pelo auxílio prestado e pela paciência de ajudar sempre que precisamos.

Um doutorado não se faz sozinho (a), as pessoas que nos amam entram na jornada junto com a gente, então, quero também agradecer à minha família, que tornou tudo possível, minha mãe Dona Teresina, meus irmãos, meus sobrinhos, primos e tios, em especial ao meu querido tio Seu Sivi e minha querida Vó, Dona Chiquinha, infelizmente não puderem acompanhar a minha jornada até o fim.

A minha irmã Juciane e meu cunhado Flávio pela ajuda na elaboração do trabalho e, as princesas Sarah e Safira, minhas lindas sobrinhas pela hospedagem.

Ao meu Sobrinho Allan, que sempre que possível estava comigo durante os experimentos.

Aos meus amigos Hellen, Hudson, Helena, Zilá, Adelina, Marlon, Fernada, por todo apoio na cidade de Manaus e pelo carinho.

Ao meu companheiro Robson Sobral Lima, pela paciência, pelo amor durante esses quatros anos.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”.

Carl Sagan

RESUMO

Os mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1758), *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 são insetos de grande importância para a saúde pública, pois são vetor de diversos agentes etiológicos de doenças ao homem. O controle desses vetores é a ferramenta mais eficiente para conter a transmissão desses patógenos e, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é o agente de controle biológico mais utilizado no mundo devido sua especificidade e segurança na aplicação. O presente estudo objetivou selecionar isolados de *B. thuringiensis* com patogenicidade para larvas de *Ae. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *An. darlingi* em laboratório. Além disso, verificou-se a presença do gene *cyt1Aa* em isolados obtidos de diferentes fontes de isolamento, as quais foram utilizadas para sequenciamento de uma região de 300 pares de bases. 553 isolados de *B. thuringiensis* obtidos dos biomas Amazônia, Caatinga e Cerrado, mantidas no Banco de Bacilos do Maranhão foram testadas em bioensaios de patogenicidade em larvas de terceiro instar de *Ae. aegypti*. Os isolados com atividade larvicida foram utilizados em bioensaios com larvas de *C. quinquefasciatus* e *An. darlingi* e caracterizados quanto a presença de 14 genes *cry*, 6 genes *cyt* e o gene *chi*. 37 (6,7%) isolados apresentaram atividade larvicida, com amplificação positiva para os genes *cry*, *cyt* e *chi*. Os genes mais frequentemente amplificados foram *cry4Aa* e *cry4Ba* (59,4%). 12 (2,2%) isolados que apresentaram 100% de mortalidade em 24 horas foram utilizadas em bioensaios para estimar as concentrações (CL₅₀) e (CL₉₀) contra larvas de *Ae. aegypti* e *An. darlingi*. Os isolados BtMA-690 e BtMA-1114 mostraram toxicidade semelhante a cepa padrão Bti T04 001 para *Ae. aegypti* com valor de CL₅₀ (0,003mg/L) após 48 horas de exposição. Os isolados BtMA-689 e BtMA-690 foram as mais tóxicas em *An. darlingi*, com valores de CL₅₀ de 0,003 mg/L e 0,004 mg/L, respectivamente. A maior frequência de isolados com a presença do gene *cyt1Aa* foi obtida de amostras do bioma Cerrado, tanto isolados de solo, quanto de insetos, ambos com 3,4%. O sequenciamento do gene *cyt1Aa* evidenciou que para essa região de 300 pares de bases o gene é conservado, pois não verificou-se variação de bases em nenhum dos isolados, que resultou em 100% de similaridade com as sequências depositadas no GenBank. Desta forma, considera-se que os isolados obtidos no presente estudo têm potencial para aplicação no controle desses insetos vetores.

Palavras chave: Vetores de doenças, Controle biológico, Bactéria entomopatogênica, Genes *cry* e *cyt*.

ABSTRACT

Aedes aegypti (Linnaeus, 1758), *Anopheles darlingi* Root, 1926 and *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 mosquitoes are insects of great importance for public health, because they are transmitters of several etiological agents of diseases to man. The vectors control is the most efficient tool to contain the transmission of these pathogens, and the bacterium *Bacillus thuringiensis* is the biological control agent most used in the world for its specificity and safety in use. The present study aimed to select strains of *B. thuringiensis* with pathogenicity for *Ae. aegypti*, *C. quinquefasciatus* and *An. darlingi* larvae in the laboratory. In addition, we verified the presence of the *cyt1Aa* gene in strains obtained from different sources of isolation and sequencing of a region of 300 base pairs. 553 strains of *B. thuringiensis* isolated from Amazonia, Caatinga and Cerrado biomes, maintained at the Bank of Bacilli of Maranhão, were tested in pathogenicity bioassays in third instar *Ae. aegypti* larvae. The isolates with larvicidal activity were used in bioassays with larvae of *C. quinquefasciatus* and *An. darlingi* and characterized as the presence of 14 *cry* genes, 6 *cyt* genes and the *chi* gene. 37 (6.7%) lines showed larvicidal activity, with positive amplification for the *cry*, *cyt* and *chi* genes. The most frequently amplified genes were *cry4Aa* and, *cry4Ba* (59.4%, both). 12 (2.2%) strains that presented 100% mortality in 24 hours were used in bioassays to estimate concentrations (LC₅₀) and (CL₉₀) against *Ae. aegypti* and *An. darlingi*. The BtMA-690 and BtMA-1114 strains showed similar toxicity to the Bti standard strain T04 001 for *Ae. aegypti* with LC₅₀ value (0.003mg/L) after 48 hours of exposure. The BtMA-689 and BtMA-690 strains were the most toxic in *An. darlingi* with LC₅₀ values of 0.003 mg/L and 0.004 mg/L, respectively. The highest frequency of isolates with the *cyt1Aa* gene presence was obtained from Cerrado biome samples, both soil isolates and insects, with 3.4% (both). Sequencing of the *cyt1Aa* gene showed that for this region of 300 base pairs the gene is conserved, since there was no base variation for any of the isolates under study, which resulted in 100% similarity to the sequences deposited in GenBank. Thus, it is considered that the isolates obtained in the present study have potential for application in the control of these insects vectors.

Keywords: Disease vectors, Biological control, Entomopathogenic bacterium, *cry* and *cyt* genes.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Mosquitos e importância epidemiológica.....	20
1.2 <i>Aedes aegypti</i> e a transmissão de patógenos	20
1.3 <i>Anopheles darlingi</i> e a transmissão da malária	23
1.4 Controle dos mosquitos vetores.....	24
1.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> , mecanismo de ação e controle de mosquitos.....	26
1.6 O Papel da toxina Cyt1Aa na patogenicidade de <i>Bacillus thuringiensis</i> para mosquitos ..	30
2. REFERÊNCIAS	33
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
CAPÍTULO I	46
Molecular characterization of the gene profile of <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance	47
ABSTRACT	48
1. Introduction	49
2. Methods	51
2.1. Sampling and isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
2.2. Morphological identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> isolates.....	52
2.3. Selection of strains for mosquito pathogenicity assays.	52
2.4. Pathogenicity bioassays in <i>Culex quinquefasciatus</i> and <i>Anopheles darlingi</i> larvae	53
2.5. Bioassays for estimating the lethal concentration (LC ₅₀) and (LC ₉₀) for <i>Aedes aegypti</i> larvae	54
2.6. Lethal concentration (LC ₅₀) and (LC ₉₀) and statistical analyses	55
2.7. Molecular characterization	55

2.8. Total DNA extraction and amplification reaction of mosquito-specific genes.....	58
3. Results.....	59
3.1. Isolation of <i>Bacillus thuringiensis</i>	59
3.2. Selection bioassays of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains pathogenic for mosquitoes.....	59
3.3. Molecular characterization	61
3.4. Bioassays for estimating the lethal concentration (LC ₅₀) and (LC ₉₀).....	65
4. Discussion	68
5.References.....	74
CAPÍTULO II.....	82
Seleção de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner com patogenicidade para larvas de <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926 (Diptera: Culicidae)	83
RESUMO.....	84
ABSTRACT	85
1.INTRODUÇÃO	86
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Seleção de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	89
2.2 Coleta e criação de <i>Anopheles darlingi</i>	91
2.3 Bioensaios seletivo para larvas de <i>Anopheles darlingi</i>	92
2.4 Bioensaios quantitativos	93
2.5 Obtenção das Concentrações Letais (CL ₅₀) e (CL ₉₀) e Análises Estatísticas	93
3. RESULTADOS	94
3.1 Seleção de linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i> patogênicas para <i>Anopheles darlingi</i>	94
3.2 Estimativa da concentração letal (CL ₅₀) e (CL ₉₀).....	95
4. DISCUSSÃO	98
5.REFERÊNCIAS	103
CAPÍTULO III	111
A importância da toxina Cyt1Aa para a patogenicidade de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner em mosquitos	112

RESUMO.....	113
ABSTRACT	114
1.INTRODUÇÃO	115
2. MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	119
2.2. Extração de DNA genômico.....	120
2.3 Reação de amplificação do gene <i>cyt1Aa</i> por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)....	121
2.4 Extração de DNA e amplificação do gene <i>cyt1Aa</i> para sequenciamento.....	122
2.5 Purificação do produto da PCR	122
2.6 Reação de Sequenciamento para confirmação dos fragmentos.....	123
2.7 Alinhamento, edição e comparação das sequências do gene <i>cyt1Aa</i>	124
3. RESULTADOS.....	125
3.1. Frequência dos gene <i>cyt1Aa</i> isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	125
3.2 Diversidade e polimorfismo das sequências do gene <i>cyt1Aa</i>	128
4. DISCUSSÃO	131
5. REFERÊNCIAS	137
SÍNTESE	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 lists the studied *B. thuringiensis* genes with the respective primers used and the expected fragment sizes from PCR as well as the annealing temperature. 56

Tabela 2 *Bacillus thuringiensis* isolates with 100% larvicidal activity for *Aedes aegypti* larvae at 24 and 48 h in the laboratory conditions according to the origin of the isolation substrate in municipally the isolated..... 60

Tabela 3 Gene profile of the 37 isolates of *Bacillus thuringiensis* active against *Aedes aegypti* larvae obtained from the three soil e insects Brazilian biomes. 63

Tabela 4 Lethal Concentrations LC50 and LC90 in mg/L at the 24-, 48-, and 72-hour evaluations for *Bacillus thuringiensis* isolates pathogenic to mosquitos. 66

CAPITULO II

Tabela 1. Isolados de *Bacillus thuringiensis* utilizados em teste de patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi*, conforme origem do substrato de isolamento. 90

Tabela 2. Isolados de *Bacillus thuringiensis* com atividade larvicida para *Anopheles darlingi* nos intervalos de leitura de 24 e 48 horas, e respectivos conteúdos gênicos. 95

Tabela 3. CL50 e CL90 em mg/L nos intervalos de 24, 48 e 72 horas para isolados de *Bacillus thuringiensis* com patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi*. 97

CAPITULO III

Tabela 1. Frequência de isolados *Bacillus thuringiensis*, por substrato de isolamento, que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*. 126

Tabela 2. Isolados de *Bacillus thuringiensis* que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*, por bioma e substrato de isolamento, dados da localização de origem e atividade larvicida para *Aedes aegypti*. 128

Tabela 3. Comparação da sequência do gene *cyt1Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de diferentes substratos do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blastn, no NCBI. 130

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1 Mapa que demarca a área de registro de casos de dengue no mundo..... 21
- Figura 2. Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2017)..... 22
- Figura 3. Fêmea adulta de *Anopheles darlingi* realizando repasto sanguíneo. Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention)..... 23
- Figura 4. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* na membrana do epitélio intestinal de larvas de insetos. Fonte: Bravo et al. 2011..... 27
- Figura 5. Mecanismos de ação da toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* na membrana do epitélio intestinal de larvas de mosquitos. Fonte: Bukto 2003. Legenda: 1. Toxina difundida no meio extracelular. 2. Toxina em aproximação da membrana plasmática de insetos. 3.As moléculas intracelulares (círculos negros). 30

CAPITULO II

- Figura 1. Criação de *Anopheles darlingi* em laboratório: 1A) fêmeas coletadas em campo acondicionadas em copos parafinados; 1B) repasto sanguíneo de fêmeas com utilização de hamster em laboratório; 1C) fêmea colocada individualmente em copo plástico para oviposição; 1D) Bandeja de plástico com água, cotendo ovos para obteção de larvas..... 92

CAPITULO III

- Figura 1. Mapa do estado do Maranhão destacando os biomas amazônia, cerrado e caatinga, e pontos de coleta de amostras de solo, água e insetos para isolamento de *Bacillus thuringiensis*. 120
- Figura 2. Perfil de amplificação do gene *cyt1Aa* em 17 isolados de *Bacillus thuringiensis*, obtidos de amostras de solo do bioma Cerrado (1-17), em gel de agarose 1,5% submetido a eletroforese. M = marcador Ladder 1Kb (promega), C+ = controle positivo, C- = controle negativo 125
- Figura 3. Perfil de amplificação do gene *cyt1Aa* em isolados de *Bacillus thuringiensis*: solo da Amazônia (1-4); solo da caatinga (5); insetos (6-14); água (15 e 16) coletados no bioma cerrado, em gel de agarose 1,5% submetido a eletroforese. M = marcador Ladder 1Kb (promega), C+ = controle positivo, C- = controle negativo. 126

Figura 4. Alinhamento das sequências 300 pares de bases do gene *cytIAa* dos isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de diferentes substratos..... 129

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

BBENMA – Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão

BLASTn - The Basic Local Alignment Search Tool

Bt - *Bacillus thuringiensis*

Bti – *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis*

BtMA - *Bacillus thuringiensis* do Maranhão

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

Chi – Chitinase

CL – Concentração Letal

Cry – Crystal

Cyt – Citolítica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

f – Forward

FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC – Índice de Confiança

IRS – Indoor Residual Sprayng

KDa –Kilodalton

Kdr – Knock-down resistance

LABEM – Laboratório de Entomologia Médica

LGBBA – Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada

mg/L – Miligrama por litros

mim – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NA – Ágar Nutriente

NCBI - The National Center for Biotechnology Information

ng – Nanograma

° C = Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP – Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição.

r – Reverse

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

rcf = Força Centrífuga Relativa

rpm – Rotação por minuto

s – segundo

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TBE – Tris/Borato/EDTA

TF – Tamanho do Fragmento

TM – Melting temperature

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão

UNESP – Universidade Estadual Paulista

v -Volts

Vips – Proteínas vegetativa inseticidas

WHO – World Health Organization

WRBU – Walter Reed Biosystematics Unit

x g – Força gravitacional

µL – Microlitro

APRESENTAÇÃO

A presente tese trata sobre o estudo de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles darlingi* e *Culex quiquefasciatus*. Estudou-se os isolados obtidos de três biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado e Caatinga e os dados estão apresentados em três capítulos. O Capítulo I, publicado na Revista *Acta Tropica* (em 2017) discorre sobre a seleção das linhagens com patogenicidade para as três espécies e a toxicidade para larvas de *Ae. aegypti*, além da caracterização dos genes *cry* e *cyt* nas linhagens tóxicas. O Capítulo II aborda a toxicidade das linhagens para larvas de *An. darlingi* com estimativa de CL_{50} e CL_{90} . O Capítulo III, apresenta os dados sobre a frequência do gene *cyt1Aa* em isolados nativos obtidos do solo dos três biomas, insetos mortos e água e o sequenciamento de uma região de 300 pares de bases.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos e importância epidemiológica

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae, da qual são conhecidas atualmente mais de 3.500 espécies, distribuídas em todo o globo terrestre, presentes nas cinco regiões zoogeográficas (Harbach 2017; WRBU 2017). Muitas espécies são veiculadoras de algum patógeno ao homem, como vírus, bactérias, protozoários e nematódeos (WHO 2017; WRBU 2017).

As doenças cujos agentes etiológicos são transmitidos por mosquitos vetores, estão entre as principais enfermidades que afetam os humanos. No cenário atual, mais de 80% da população mundial encontra-se em áreas de risco de transmissão de algumas dessas doenças, e 50%, sob o risco de infecção por duas ou mais doenças, concomitantemente. Tais doenças causam grande impacto social e econômico em todo o mundo (WHO 2017).

Entre as principais doenças, as quais os mosquitos são vetores dos agentes etiológicos estão a malária, filariose, febre amarela, dengue, zika, chikungunya, todas com registro de casos no Brasil (Ebi e Nealon 2016; Ferreira e Castro 2016; Lima-Camara 2016).

Os mosquitos dos gêneros *Culex* Linnaeus, 1758, *Aedes* Meigen, 1818 e *Anopheles* Meigen, 1818 são os principais vetores de agentes patogênicos ao homem no Brasil. Notadamente as espécies *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Anopheles darlingi* Root, 1926, são as espécies transmissoras dos patógenos que acometem a maior parcela da população brasileira (Brasil 2017a).

1.2 *Aedes aegypti* e a transmissão de patógenos

O mosquito *Ae. aegypti* já foi encontrado infectado por múltiplos patógenos. No Brasil, é transmissor de diferentes agentes patogênicos ao homem, como vírus Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela Urbana entre outros (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994; Forattini 2002; Böhm *et al.* 2016; Brito e Cordeiro 2016; Lima-Camara 2016).

A dengue é reconhecida atualmente como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (Figura 1), é uma das arboviroses de maior impacto para a saúde pública do Brasil. É considerada doença reemergente, registrada de forma ininterrupta ao longo das últimas décadas (Böhm *et al.* 2016; Ebi e Nealon 2016). O número de casos de dengue cresceu nos últimos anos no Brasil, tendo sido registrados mais de 1 milhão de casos prováveis no ano de 2016 e, em 2017 até a 35ª semana epidemiológica, foram notificados 219.040 casos, como registro de casos graves e óbitos (Brasil 2017b).



Figura 1 Mapa que demarca a área de registro de casos de dengue no mundo.
Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

As doenças zika e chikungunya também têm preocupado os órgãos de saúde pública de todo o mundo, principalmente devido a associação do vírus Zika com complicações neurológicas em seres humanos, como a microcefalia, e também devido a síndrome de Guillain-Barré (Araújo *et al.* 2016; Duarte *et al.* 2017). No Brasil, a introdução desses vírus é recente (2014), porém encontram-se disseminados por todo território nacional, no qual são registrados elevados índices das doenças. Para chikungunya e zika, em 2016 foram notificados 277.882 e 216.207 casos prováveis, em 2017, até 35ª semana epidemiológica foram 171.930 e 15.586 casos, respectivamente (Brasil 2017b).

A transmissão desses patógenos ao homem se dá pela picada das fêmeas do *Ae. aegypti* infectadas com vírus, que, por sua vez, são contaminadas por meio de repasto sanguíneo em indivíduos infectados. Após a infecção, o homem serve como fonte de contaminação durante todo o período de viremia (Forattini 2002; Lima-Camara 2016).

O *Ae aegypti* é altamente domiciliado e antropófilo, vive diretamente associado às habitações humanas e coloca seus ovos nos mais variados tipos de recipientes com água,

mantidos pelo homem. Tem se mostrado capaz de usar diferentes tipos de micro-habitat, o que facilita a sua dispersão (Forattini 2002; Soares-da-Silva *et al.* 2012; Ferreira-Keppler *et al.* 2017; Montagner *et al.* 2017).

Assim como os demais mosquitos, o *Ae. aegypti* é holometábolo, apresenta os estágios de ovo, larva, pupa e adulto, sendo os estágios imaturos aquáticos (Figura 2). As fêmeas são sugadoras rápidas e persistentes, realizam hematofagia, o que é necessário para maturação dos ovos. Esse mosquito não apresenta concordância gonotrófica, pois, em um único ciclo, podem realizar mais de um repasto sanguíneo (Forattini 2002).

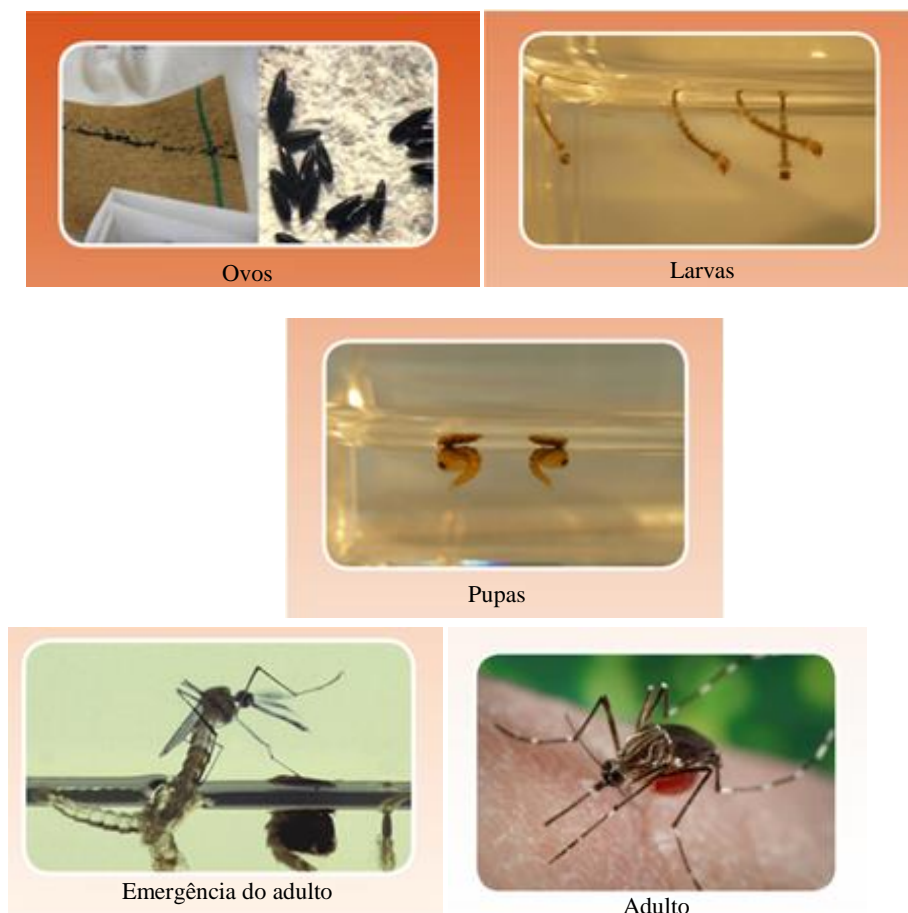


Figura 2. Ciclo biológico do *Aedes aegypti*. Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

O *Ae. aegypti* apresenta considerável habilidade de disseminação, o que ocorre devido à capacidade dos ovos em resistir às condições adversas por um longo período, devido a um processo denominado de diapausa embrionária (Forattini 2002; Soares-Pinheiro *et al.* 2017). A biologia do *Ae. aegypti* é bastante compreendida, devido à facilidade de manutenção de população desse vetor em laboratório, isso tem contribuído para o entendimento acerca do

desenvolvimento desses indivíduos e, principalmente, para estudos sobre as estratégias de controle.

1.3 *Anopheles darlingi* e a transmissão da malária

O gênero *Anopheles* também abrange mosquitos de grande importância para a saúde pública, pois as fêmeas são transmissoras dos plasmódios, agentes etiológicos da malária, que é considerada maior doença infecciosa da humanidade (Consoli e Oliveira 1994; Forattini 2002; Nussenzweig 2011). Nas últimas quatro décadas, o Brasil registrou mais de 30% dos casos de malária das Américas (Siqueira *et al.* 2016), sendo mais de 83% dos casos registrados na região amazônica (Siqueira *et al.* 2017).

Nas Américas, os principais vetores da malária são *Anopheles nuneztovari* Galbadon, 1940, *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820, *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 e a espécie *An. darlingi* (Figura 3), que é o principal responsável pela transmissão da doença no Brasil, especificamente na Amazônia brasileira, região que detém mais de 99% dos casos da doença no país (Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994; Tadei *et al.* 1998; Tadei e Duraty-Thatcher 2000; Nussenzweig 2011; Tadei *et al.* 2017).



Figura 3. Fêmea adulta de *Anopheles darlingi* realizando repasto sanguíneo. Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

Anopheles darlingi é considerado o anofelino mais frequente no domicílio e apresenta acentuada antropofilia e comportamento endófilo. Costuma picar o homem dentro das casas, com maior pico de atividade hematofágica no período crepuscular, podendo se estender durante a noite. Esse comportamento é considerado ciclo de picada unimodal (Forattini 2002; Gama *et al.* 2009; Barbosa *et al.* 2016). Outra característica importante é que esse mosquito possui elevada capacidade de colonizar áreas antropizadas, dessa forma, é capaz se estabelecer em áreas utilizadas pelo homem (Rodrigues *et al.* 2017).

A transmissão da malária ocorre pela picada de fêmeas do mosquito infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*. São conhecidas cinco espécies causadoras da malária em seres humanos: *Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulliga 1933, *Plasmodium ovale* Stephens 1922, *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti 1890, *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi 1889 e *Plasmodium falciparum* Welch 1897, sendo que somente as três últimas são registradas no Brasil. *P. falciparum* é a espécie causadora da malária grave, para qual pode até haver complicações neurológicas e morte (Nussenzweig 2011; Wassmer e Grau 2017).

Apesar da redução da malária no mundo inteiro, o número de casos da doença ainda é alarmante (WHO 2017). Fatores como o aquecimento global e as atividades antropogênicas, são condições predisponentes para o aumento da transmissão da doença (Rossati *et al.* 2016). Nesse sentido, é essencial a continuidade das ações que levaram a redução da malária no mundo, e o controle das populações dos vetores é a principal medida preventiva adotada pelos programas de eliminação da doença (WHO 2011; Ferreira e Castro 2016; Recht *et al.* 2017).

1.4 Controle dos mosquitos vetores

Atualmente vivemos um novo contexto na dinâmica da transmissão de agentes patogênicos por mosquitos, uma vez que, com a globalização e maior fluxo de pessoas entre os diferentes continentes, há o favorecimento da disseminação dos patógenos em um curto espaço de tempo (Benelli e Mehlhorn 2016; Lima-Camara 2016). Essas condições, aliadas à ampla distribuição dos vetores, podem proporcionar o surgimento de doenças em muitas áreas distintas (Imperato 2016).

Outros fatores também possuem correlação positiva com a dispersão dos mosquitos, como a urbanização sem planejamento, crescimento populacional desordenado, fatores

ambientais como o aquecimento global, o que torna esses mosquitos capazes de estabelecer populações em regiões não infestadas anteriormente (Lima-Camara 2016).

Desde a descoberta do papel dos mosquitos na transmissão de patógeno ao homem o conhecimento acerca do controle dessas espécies vem sendo amplamente estudada. Embora, um método efetivo para o controle desses insetos ainda constitui um grande desafio para os órgãos de saúde pública em todo mundo (WHO 2017).

Alguns fatores são os principais agravantes nas atividades de combate aos mosquitos, como: facilidade de reprodução e de adaptação as mais diversas condições e o rápido crescimento de população com resistência a inseticidas rotineiramente empregados, o que é favorecido pelo ciclo rápido e crescimento acelerado das gerações de mosquitos (Braga *et al.* 2004; Marcombe *et al.* 2012; Rocha *et al.* 2015; Al Nazawi *et al.* 2017; Moyes *et al.* 2017).

No Brasil, historicamente, o combate aos mosquitos transmissores de patógenos ao homem é feito com aplicações de inseticidas químicos. Essa medida tem sido a principal técnica utilizada, desde do início das primeiras campanhas de combate a mosquitos vetores no país (Carvalho e Silva 1999; Pinheiro e Tadei 2002; Lima *et al.* 2003; Flores *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006; Braga e Valle 2007a; Silva *et al.* 2014).

A utilização prolongada e intensiva dos inseticidas químicos resultou em resistência para diversas espécies de mosquitos em diferentes lugares no mundo (Moyes *et al.* 2017). Resistência a quatro classes de inseticidas químicos: carbanatos, organoclorados, organofosforados e piretróides, foi detectada em populações de *Ae. aegypti* em pelo menos três continentes, em que foram detectadas mutações em sítios alvo dos inseticidas, também conhecidas como resistência *target site* e mutações do tipo Kdr “*knock-down resistance*” (Carvalho e Silva 1999; Braga e Valle 2007b; Macoris *et al.* 2014; Silva *et al.* 2014; Zara *et al.* 2016; Moyes *et al.* 2017). Para *An. darlingi* foi detectada perda de susceptibilidade a alguns inseticidas rotineiramente utilizados (Silva *et al.* 2014; Galardo *et al.* 2015).

Diante do cenário atual, métodos alternativos aos tradicionais químicos são recomendados, principalmente inseticidas para os quais há menor chance de causar resistência e danos na natureza (Corbel *et al.* 2017). Nessa perspectiva, os agentes de controle biológico ganham notoriedade, pois apresentam como principal vantagem a capacidade de interagir de forma específica com o inseto alvo; menor chance de levar a resistência; além de não causar danos aos ecossistemas nos quais são utilizados (Alves 1998; Lacey *et al.* 2015; Saldanã *et al.* 2017).

Considerando o controle de *Ae. aegypti* no Brasil, que se iniciou ainda no século XX para o controle da transmissão da febre amarela, foram feitas essencialmente aplicações de inseticidas químicos em criadouros artificiais encontrados no intradomicílio e peridomicílio das residências (Braga e Valle 2007a; Zara *et al.* 2016).

Com os avanços da biologia molecular, diferentes estratégias inovadoras para o controle biológico de mosquitos adultos estão em fase desenvolvimento e aprimoramento (Zara *et al.* 2016; Macias *et al.* 2017). Técnicas de manipulação genética (ex: *sterile insect technique*) (Alphey *et al.* 2010), bem como, a utilização de fêmeas de *Ae. aegypti* infestadas com a bactéria *Wolbachia* sp., que mostrou-se capaz de bloquear a infecção dos mosquitos pelos patógenos, estão sendo testadas (Oliveira *et al.* 2015; Pimenta de Oliveira *et al.* 2017). Até mesmo a utilização de técnicas de edição de genes (Macias *et al.* 2017).

De forma semelhante, no controle de *An. darlingi*, também foram utilizados, essencialmente, inseticidas químicos tanto para o controle de larvas, como para adultos. Até o momento, apesar dos estudos indicarem potencialidades quanto à aplicação de técnicas moleculares e controle biológico, estes ainda são pouco utilizados. Por outro lado, diversas classes de inseticidas químicos são recomendadas para utilização, como: piretróides, organoclorados, organofosforatos e carbamatos (WHO 2011), seja para aplicação direta em criadouros, onde se encontram as formas imaturas, ou para utilização combinada com métodos físicos de proteção, como exemplo, mosquiteiros impregnados com inseticidas (Hamel *et al.* 2011; West *et al.* 2015; Tukei *et al.* 2017).

Estudos de agentes microbianos com atividade inseticida contra larvas de mosquitos transmissores de agentes causadores de doenças ao homem estão em andamento (Costa *et al.* 2010; Sarmiento *et al.* 2016; Fukruksa *et al.* 2017). Nesse contexto, as bactérias entomopagênicas, como o *B. thuringiensis*, Berliner 1911, representam o princípio ativo mais promissor na fabricação de inseticidas, principalmente pelo mecanismo de ação específico.

1.5 *Bacillus thuringiensis*: mecanismo de ação e controle de mosquitos

A espécie *B. thuringiensis* é isolada em todo o planeta. É uma das bactérias mais utilizadas na fabricação de inseticidas biológicos e nas aplicações de técnicas biotecnológicas para o controle de insetos em todo o mundo (Höfte e Whiteley 1989; Polanczyk e Alves 2003; Glazer e Filho 2016; Liu *et al.* 2016). A sua utilização aumentou significativamente ao longo das últimas décadas, pois é uma bactéria facilmente produzida em larga escala, o que favorece

a sua aplicação em campo (Kumar *et al.* 2008; Andrade Angelo *et al.* 2010; Bravo *et al.* 2011). *Bacillus thuringiensis* é um bastonete 1 a 1,2 por 3 a 5 μm , é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa; cresce na faixa de temperatura de 10 a 45 $^{\circ}\text{C}$, e forma esporos elípticos e cilíndricos (Martin e Travers 1989; Habib e Andrade 1998; Soares-da-Silva *et al.* 2015; Boukedi *et al.* 2016; El-Kersh *et al.* 2016; Reyaz *et al.* 2017; Sauka e Benintende. 2017).

A ação inseticida de *B. thuringiensis* é conferida pela presença de cristal de proteínas produzido durante a fase de esporulação, que atuam como toxinas inseticidas (Alves 1998; Polanczyk e Alves 2003). Essas proteínas são conhecidas como δ -endotoxinas, que são compostas de duas famílias multigênicas, as proteínas Cry (Crystal) e Cyt (Citolíticas), as quais são tóxicas a insetos de diferentes ordens (Höfte e Whiteley 1989; Alves 1998; Bravo e Soberón 2007; Frankenhuyzen 2013; Badran *et al.* 2016).

As proteínas do cristal tornam-se tóxicas para os insetos quando são ingeridas pelas larvas. Após a ingestão, os cristais são solubilizados no pH alcalino intestinal, devido a presença de enzimas digestivas, e são convertidos em polipeptídios tóxicos. As toxinas ativas ligam-se aos receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, o que interfere no gradiente iônico e no balanço osmótico das células, formando poros, causando lise, conseqüentemente ruptura e desintegração, o que culmina com a morte do inseto (Hofte e Whiteley 1989; Bravo *et al.* 2007; Copping e Menn 2000; Zhang *et al.* 2016) (Figura 4).

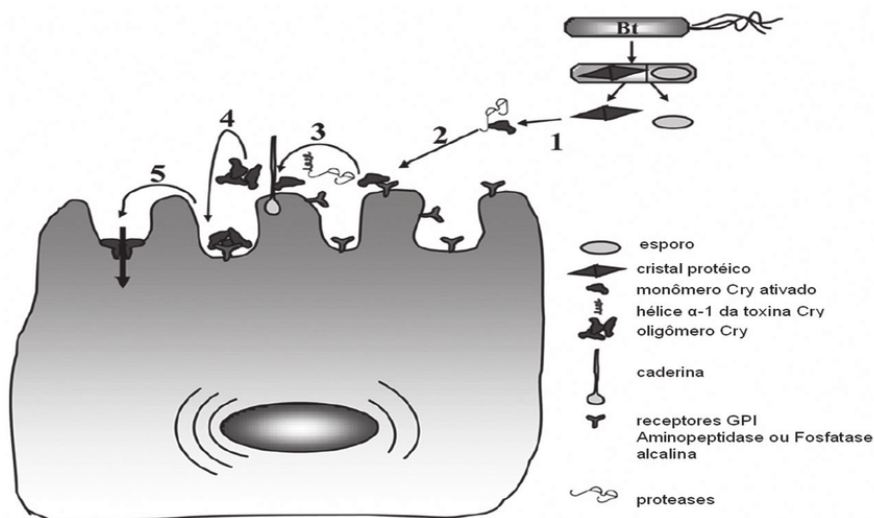


Figura 4. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* na membrana do epitélio intestinal de larvas de insetos. Fonte: Bravo *et al.* 2011.

Bacillus thuringiensis é continuamente isolado de diversos substratos, tais como: solo, insetos mortos, plantas entre outros. Os diferentes isolados obtidos têm mostrado elevada toxicidade para diversos grupos de insetos, o que evidencia o seu potencial como agente de controle biológico (Bravo *et al.* 1998; Raymond *et al.* 2010; Salama *et al.* 2015; Soares-da-Silva *et al.* 2015; El-Kersh *et al.* 2016; Reyaz *et al.* 2017).

A utilização de *B. thuringiensis* demonstra sucesso no controle de insetos de importância agrícola, pois as proteínas inseticidas Cry são empregadas para produção de plantas transgênicas que são resistentes a pragas. As plantas transgênicas demonstraram ser muito eficiente no controle de importantes insetos de interesse agrícola em todo mundo (Bobrowski *et al.* 2003; Galzer e Azevedo-Filho 2016).

Em relação ao emprego de *B. thuringiensis* no controle de mosquitos, a subespécie *Bacillus thuringiensis israelensis* é utilizada mundialmente, tem demonstrado eficiência e com histórico de sucesso em todas as regiões onde foi aplicada (Bravo *et al.* 2011). Até o momento, não há evidências de populações de mosquitos resistentes a *B. thuringiensis israelensis* (Tetreau *et al.* 2013; Ngoagouni *et al.* 2016; Suter *et al.* 2017). Contudo, a utilização de *B. thuringiensis israelensis* no controle de mosquitos ainda é bastante limitada, apesar da elevada eficiência no controle de forma imatura de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Ben-Dov 2014).

Bacillus thuringiensis apresenta diferentes características que o distinguem de outros entomopatógenos. A principal é a elevada variabilidade genética, pois os genes *cry* localizam-se geralmente em grandes plasmídeos, frequentemente conjugativos, o que pode possibilita a formação de linhagens com diversos perfis de toxicidade, o que representa vantagem frente a outros patógenos. Na natureza é possível encontrar linhagens com diferentes perfis genéticos e com toxicidade distinta (Costa *et al.* 2010; Elleuch *et al.* 2015).

Isolamento e seleção de *B. thuringiensis* em diferentes tipos de ambientes tem possibilitado a descoberta de diversas combinações de genes *cry* e *cyt* (Costa *et al.* 2010; Santos *et al.* 2012; El-Kersh *et al.* 2014; 2016). Atualmente, são conhecidas cerca de 400 toxinas Cry de *B. thuringiensis*, com ação para vários grupos de insetos: Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Isoptera, Orthoptera, Siphonaptera, Thysanoptera, Mallophaga, Hemiptera e Diptera (Frankenhuyzen 2013; Crickmore 2017).

A última revisão sobre a ação das toxinas Cry com ação para mosquitos, aponta que existem pelo menos 20 toxinas com atividade para esses insetos, das quais a maioria apresenta

toxicidade para larvas de *Ae. aegypti* (Frankenhuyzen 2013). Continuamente são descritos novos genes e toxinas Cry em isolados obtidos em todo mundo (Crickmore 2017).

Em contraste, para a família das toxinas Cyt, são conhecidas atualmente 11 proteínas inseticidas (Crickmore 2017). Diferente do amplo espectro das Cry, as toxinas Cyt mostram especificidade, principalmente à dipteros, e têm sido relatadas somente em linhagens com ação específica para esses insetos, mostrando-se importante componente para o controle de mosquitos (Ben-Dov 2014). Atualmente seis toxinas Cyt possuem ação comprovada para larvas de mosquitos: Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba, Cyt2Aa, Cyt2Ba e Cy2Bc (Crickmore 2017).

As toxinas Cry e Cyt, quando presentes na mesma linhagem, atuam em sinergismo. Tais toxinas mostram formas distintas de ação (Crickmore 1995; Otieno-Ayayo *et al.* 2008; Cantón *et al.* 2011; Côrrea 2012). As toxinas Cry precisam se ligar a receptores específicos no epitélio intestinal das larvas, por outro lado as toxinas Cyt apresentam ação hemolítica e citolítica; atuam interagindo diretamente com a membrana lipídica das células do intestino médio dos insetos. Dois mecanismos são propostos para explicar o mecanismo de ação das cyt: essas toxinas ou atuam formando poros na membrana ou destruindo-a através de ação detergente, o que propicia a inserção toxinas Cry no epitélio intestinal dos mosquitos e, conseqüentemente a sua morte (Fernández-Luna *et al.* 2010 a,b; Cantón *et al.* 2011).

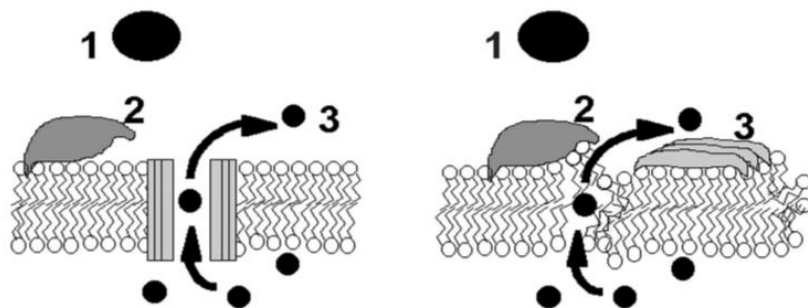
As toxinas Cry e Cyt são sintetizadas sob condições restritas de crescimento, sendo que as proteínas Cry possuem massa molecular entre 40 e 140 kDa e são codificadas por diferentes genes denominados genes *cry*, e as toxinas Cyt são proteínas menores, com massa em torno de 25 kDa e codificadas por gene *cyt* (Agaisse e Lereclus 1995; Saraswathy e Kumar 2004).

A presença de Cyt1Aa em combinação com as toxinas Cry 4Aa, Cry 4Ba, Cry 10Aa, Cry 11Aa e Cry 11Ba, em *B. thuringiensis israelensis*, torna essa cepa a mais eficiente no controle de vetores. Essa combinação apresenta boa efetividade contra larvas de mosquitos do gênero *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Hofte e Whiteley 1989; Crickmore *et al.* 1998; De Barjac 1990; Frankenhuyzen 2013; Ben-Dov 2014). A toxina Cyt1Aa têm o potencial de aumentar a eficiência de um isolado no controle de mosquitos, e tem sido apontada como responsável pela falta de resistência de mosquitos a *B. thuringiensis israelensis* (Gómez *et al.* 2007; Ben-Dov 2014; Stalinski *et al.* 2016).

1.6 O Papel da toxina Cyt1Aa na patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para mosquitos

A proteína Cyt1Aa é a toxina Cyt mais estudada; é utilizada como modelo para a compreensão do mecanismo de ação dessas toxinas em larvas de mosquitos (Soberón *et al.* 2013; Cantón *et al.* 2014). Cyt1Aa é codificada por uma sequência de 744 pares de bases, a proteína apresenta peso molecular de 28 kDa e, após ativação por proteases presentes no intestino médio dos insetos susceptíveis, gera um fragmento tóxico de 22-25 kDa (Ben-Dov 2014).

O mecanismo de ação da toxina Cyt1Aa ainda não está bem elucidado. A principal hipótese de ação da toxina Cyt1Aa é que esta atue diretamente na membrana plasmática das células do intestino de dípteros ou formando poros ou tenha ação detergente, o que ocorre devido a inserção da proteína por ação inespecífica na bicamada lipídica, que leva à desintegração da membrana (Butko 2003) (Figura 5).



A) Modelo de formação de poros B) Modelo por ação detergente

Figura 5. Mecanismos de ação da toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* na membrana do epitélio intestinal de larvas de mosquitos. Fonte: Bukto 2003. Legenda: 1. Toxina difundida no meio extracelular. 2. Toxina em aproximação da membrana plasmática de insetos. 3As moléculas intracelulares (círculos negros).

Tem sido sugerido ainda que a toxina Cyt1Aa atue como receptor adicional para as proteínas Cry em mosquitos, devido ao mecanismo complexo de ligação entre as proteínas e pela afinidade de ligação das Cyt com os lipídios presentes na membrana do epitélio intestinal desses insetos (Cantón *et al.* 2011; López-Díaz *et al.* 2013; Elleuch *et al.* 2015).

Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* tem evidenciado o potencial de Cyt1Aa em agir em sinergismo com as toxinas Cry. A hipótese é que Cyt1Aa funciona como um receptor para Cry4Ba e Cry11Aa, o que explica a interação entre essas toxinas na linhagem *B. thuringiensis israelensis*, na qual essa toxina acumula-se, podendo ocupar até 45-50 % do cristal, quantidade suficiente para agir em sinergismo com as demais (Chow *et al.* 1989; Pérez *et al.* 2005; Promdonkoy *et al.* 2005; Frankenhuyzen 2009; 2013; Cantón *et al.* 2011). Em contrapartida, foi verificado que quando há mutação na Cyt1Aa, o sinergismo não acontece (Pérez *et al.* 2005; 2007; Cantón *et al.* 2011).

Além disso, a toxina Cyt1Aa mostrou-se eficiente em suprimir resistências as toxinas Cry isoladas de *B. thuringiensis israelensis* em população de *C. quinquefasciatus*, sendo que com a presença de Cyt1Aa, não houve resistência, mesmo após a pressão de seleção por muitas gerações. Também foi verificado que Cyt1Aa em combinação com as toxinas Bin de *Lysinibacillus sphaericus*, foi capaz de suprimir resistências em mosquitos (Wirth *et al.* 2005; Wirth *et al.* 2015).

As toxinas pertencentes à família Cyt são, portanto, o principal componente que não pode ser excluído quando se objetiva melhorar a potência de isolados de *B. thuringiensis* para serem utilizados como larvicidas de mosquitos (Promdonkoy *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011). Com isso é essencial investigar a presença das toxinas Cry mosquitocida e Cyt1Aa, no sentido de compreender o sinergismo de ambas as toxinas, pois Cyt1Aa tem implicações importantes para desenvolver estratégias de manejo da resistência de toxinas Cry já utilizadas no controle de mosquitos (Pérez *et al.* 2005; Promdonkoy *et al.* 2005; Cohen *et al.* 2011).

Poucos estudos foram realizados para caracterização das toxinas Cyt em linhagens nativas de *B. thuringiensis* no Brasil. Somente um estudo foi desenvolvido para verificar se as toxinas Cyt estavam relacionadas com a patogenicidade de *B. thuringiensis* para insetos na ordem Lepidoptera, contudo, não foi verificada relação significativa (Costa *et al.* 2014). Até o momento, não há dados quanto a caracterização e relação em linhagens nativas com patogenicidade para mosquitos.

Há um interesse no sentido de investigar mais o potencial dessa proteína inseticida; dados sobre frequência de Cyt1Aa em isolados de nativos de *B. thuringiensis* são importantes para se compreender as relações dessas toxinas com larvas de mosquitos (Wu *et al.* 2008; Soberón *et al.* 2013; Cantón *et al.* 2014; Costa *et al.* 2014)

Diante do potencial dessas toxinas, vários trabalhos de seleção de linhagem com ação inseticida para mosquitos têm sido iniciados pela investigação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* e *cry11Ba* e *cyt*, principalmente *cyt1Aa*. Associados a isto, têm sido realizados bioensaios de patogenicidade e toxicidade para confirmar o potencial dessas proteínas inseticidas (Dias *et al.* 2002; Costa *et al.* 2010; Campanini *et al.* 2012; Santos *et al.* 2012; Soares-da-Silva *et al.* 2015).

A grande variabilidade genética das linhagens de *B. thuringiensis* presente na natureza possibilita encontrar diferentes combinações de genes *cry* e *cyt*. Desta forma, torna-se evidente a importância de caracterizar, por meio de ferramentas moleculares, novos isolados obtidos de diferentes regiões para ampliar o número de toxinas de *B. thuringiensis* disponíveis para serem usadas (Sun *et al.* 2013). Portanto, novas combinações de toxinas Cry e Cyt podem ser utilizadas nos programas de controle para, no futuro, diminuir o emprego do uso dos inseticidas químicos e ampliar os programas de controle biológico (Bravo *et al.* 2011).

O Brasil vive atualmente uma situação de emergência sanitária, devido à ocorrência de várias arboviroses concomitantemente nas populações humanas (Honório *et al.* 2015; Ferreira-de-Brito *et al.* 2016; Valle 2016). Apesar do intenso esforço para controlar os mosquitos vetores, os casos das doenças ainda continuam sendo registrados. Essa situação exige múltiplas intervenções e, até o momento, o controle vetorial é a medida mais eficiente. No entanto, permanece a necessidade de desenvolvimento de medidas alternativas e eficazes que possam ser utilizadas no controle vetorial.

2. REFERÊNCIAS

- Agaisse, H.; Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*, 177: 6027-6032.
- Al Nazawi, A.M.; Aqili, J.; Alzahrani, M.; McCall, P.J.; Weetman, D. 2017. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites & Vectors*, 10: 161.
- Alphey, L.; Benedict, M.; Bellini, R.; Clark, G. G.; Dame, D. A.; Service, M. W.; Dobson, S. L. 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10: 295-311.
- Alves, S.B. 1998. *Controle microbiano de insetos*. 2da ed. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1163p.
- Andrade Angelo, E.; Vilas-Bôas, G.T.; Castro-Gómez, R.J.H. 2010. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(4).
- Araujo, L.M.; Ferreira, M.L.B.; Nascimento, O.J.M. 2016. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 74: 253-255.
- Badran, A.H.; Guzov, V.M.; Huai, Q.; Kemp, M.M.; Vishwanath, P.; Kain, W.; Nance, A.M.; Evdokimov, A.; Moshiri, F.; Turner, K.H.; *et al.* 2016. Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533: 58-63.
- Barbosa, L.M.C.; Souto, R.N.P.; Ferreira, R.M.A.; Scarpassa, V.M. 2016. Behavioral patterns, parity rate and natural infection analysis in anopheline species involved in the transmission of malaria in the northeastern Brazilian Amazon region. *Acta tropica*, 164: 216-225.
- Ben-Dov, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*, 6: 1222-1243.
- Benelli, G.; Mehlhorn, H. 2016. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*, 115: 1747-1754.
- Bobrowski, V.L.; Fiuza, L.M.; Pasquali, G.; Bodanese-Zanettini, M.H. 2003. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural. Santa Maria*, 33: 843-850.
- Böhm, A.W.; Costa, C.S.; Neves, R.G.; Flores, T.R.; Nunes, B.P. 2016. Dengue incidence trend in Brazil, 2002-2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25: 725-733.

- Boukedi, H.; Sellami, S.; Ktari, S.; Hassan, N.B.B.; Sellami-Boudawara, T.; Tounsi, S.; Abdelkefi-Mesrati, L. 2016. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. *Microbiological Research*, 186: 9-15.
- Braga, I.A.; Lima, J.B.P.; Soares, S.S.; Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* Resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99:199-203.
- Braga, I.A.; Valle, D. 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16: 113-118.
- Braga, I.A.; Valle, D. 2007b. *Aedes aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16: 279-293.
- Brasil 2017a. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>. Acesso em 25 de setembro de 2017.
- Brasil 2017b. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Volume 48. ISSN 2358-9450.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; *et al.* 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4965-4972.
- Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.
- Brito, C.A.A.; Cordeiro, M.T. 2016. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49: 537-54.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2415-2422.
- Campanini, E.B.; Davolos, C.C.; Alves, E.C.C.; Lemos, M.V.F. 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Brazilian Journal of Biology*, 72: 243-247.
- Cantón, P.E.; Reyes, E.Z.; De Escudero, I.R.; Bravo, A.; Soberón, M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32: 595-600.

- Cantón, P.E.; López-Díaz, J.A.; Gill, S.S.; Bravo, A.; Soberón, M. 2014. Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. *Peptides*, 53: 286-291.
- Carvalho, L.A.F.; Silva, I.G. 1999. Atividade larvívica do Temephos a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin., 1762), em diferentes criadouros artificiais. *Revista Patologia Tropical*, 28: 211-232.
- Chow, E.; Singh, G.J.; Gill, S. S. 1989. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2779-2788.
- Cohen, S.; Albeck, S.; Ben-Dov, E.; Cahan, R.; Firer, M.; Zaritsky, A.; Dym, O. 2011. Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of Molecular Biology*, 413: 804-814.
- Consoli, R.A.B.G.; Oliveira, R.L. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 1da ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 228p.
- Copping, L.G.; Menn, J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56: 651-676.
- Corbel, V.; Fonseca, D.M.; Weetman, D.; Pinto, J.; Achee, N.L.; Chandre, F.; *et al.* 2017. International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10: 278.
- Corrêa, R.F.T.; Ardisson-Araújo, D.M.P.; Monnerat, R.G.; Ribeiro, B.M. (2012). Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PloS one*, 7: 46121.
- Costa, J.R.V.; Rossi, J.R.; Marucci, S.C.; Alves, E.C.C.; Volpe, H.X.L.; Ferraudó, A.S.; Lemos, V.F.M.; Desidério, J.A. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). *Neotropical Entomology*, 39: 757-766.
- Costa, M.L.M.; Lana, U.G.P.; Barros, E.C.; Paiva, L.V.; Valicente, F.H. 2014. Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Agricultural Science*, 6: 128-137.
- Crickmore, N.; Bone, E.J.; Williams, J.A.; Ellar, D.J. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology. Letters*. 131: 249-254.

- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Rie, J.V.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 807-813.
- Crickmore, N., 2017. Full list of delta-endotoxins <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em 23/09/2017.
- De Barjac, H. 1990. Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. Springer, Netherlands, p. 10-15.
- Dias, D.G.S.; Silva, S.F.; Martins, E.S.; Soares, C.M.S.; Falcão, R.; Gomes, A.C.M.M.; Praça, L.B.; Dias, J.M.C.S.; Monnerat, R. G. 2002. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 1676-1340.
- Duarte, G.; Moron, A.F.; Timerman, A.; Fernandes, C.E.; Neto, C.M.; Almeida Filho, G.L.; Junior, H.W.; Santo, H.F.B.E.; Steibel, J.A.P.; Filho, J.B.; et al. 2017. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics*, 39: 235-248.
- Ebi, K.L.; Nealon, J. 2016. Dengue in a changing climate. *Environmental Research*. 151: 115–123.
- Elleuch, J.; Tounsi, S.; Hassen, N.B.B.; Lacoix, M.N.; Chandre, F.; Jaoua, S.; Zghal, R.Z. 2015. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 90–97.
- El-kersh, T.A.; Al-akeel, R.A.; Al-sheikh, Y.A.; Alharbi, S.A. 2014. Isolation and distribution of mosquito-larvicidal *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*, 31: 616–632.
- El-kersh, T.A.; Ahmed, A.M.; Al-sheikh, Y.A.; Tripet, F.; Ibrahim, M.S.; Metwalli, A.A.M. 2016. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). *Parasites & Vectors*, 9: 647.
- Fernandez-Luna, M.T.; Lanz-Mendoza, H.; Gill, S.S.; Bravo, A.; Soberon, M.; Miranda-Rios, J. 2010a. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Microbiology*, 12: 746-757.

- Fernández-Luna, M.T.; Tabashnik, B.E.; Lanz-Mendoza, H.; Bravo, A.; Soberón, M.; Miranda-Ríos, J. 2010b. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104: 231–233.
- Ferreira-Keppler, R.L.; Neiss, U.G.; Torreias, S.R.S.; Campos, C.M. 2017. The community of Diptera (Insecta) colonizing axils of *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don (Araceae), with records of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in urban areas of Manaus, Amazonas. *Biota Neotropica*, 17(3). e20160291.
- Ferreira-de-Brito, A.; Ribeiro, I.P.; Miranda, R.M.; Fernandes, R.S.; Campos, S.S.; Silva, K.A.B.; Castro, M.G.; Bonaldo, M.C.; Brasil, P.; Lourenço-de-Oliveira, C. 2016. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111: 655-658.
- Ferreira, M.U.; Castro, M.C. 2016. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria journal*, 15: 284.
- Flores, A.V.; Ribeiro, J.N.; Neves, A.A.; Queiroz, E.L.R. 2004. Organoclorados: Um problema de Saúde Pública. *Ambiente & Sociedade*, 8: 111-125.
- Forattini, O.P., 2002. *Culicidologia Médica*. 2da ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 860p.
- Frankenhuyzen, K.V. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1-16.
- Frankenhuyzen, K.V. 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 76–85.
- Fukruksa, C.; Yimthin, T.; Suwannaroj, M.; Muangpat, P.; Tandhavanant, S.; Thanwisai, A.; Vitta, A. 2017. Isolation and identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria associated with entomopathogenic nematodes and their larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 10: 440.
- Galardo, A.K.R.; Póvoa, M.M.; Sucupira, I.M.C.; Galardo, C.D.; Santos, R.L.C. 2015. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48: 765-769.
- Galzer, E. C. W.; Azevedo Filho, W. S. 2016. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*, 1: 13-16.

- Gama, R.A.; Santos, R.L.; Santos, F.D.; Silva, I.M.; Resende, M.C.; Eiras, Á. E. 2009. Periodicity of capture of the *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Porto Velho, Rondônia, Brazil. *Neotropical Entomology*, 38: 677-682.
- Gómez, I.; Pardo-López, L.; Muñoz-Garay, C.; Fernandez, L.E.; Pérez, C.; Sánchez, J.; Soberón, A.; Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28: 169-173.
- Habib, M.E.M.; Andrade, C.F.S. 1998. Bactérias Entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*, FEALQ, Piracicaba, São Paulo, p 383-446.
- Hamel, M.J.; Otieno, P.; Bayoh, N.; Kariuki, S.; Were, V.; Marwanga, D.; Laserson, K.F.; Williamson, J.; Slutsker, L.; Gimnig, J. 2011. The combination of indoor residual spraying and insecticide-treated nets provides added protection against malaria compared with insecticide-treated nets alone. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 1080-1086.
- Harbach, R.E. 2017. Mosquito Taxonomic Inventory (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>). Acesso em 11/ 02/ 2013.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*, 53: 242-255.
- Honório, N.A.; Câmara, D.C.P.; Calvet, G.A.; Brasil, P. 2015. Chikungunya: Uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. 31: 906-908.
- Imperato, P.J. 2016. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. *Journal of Community Health*, 41: 674-679.
- Kumar, S.; Chandra, A.; Pandey, K. C. 2008. Bacillus thuringiensis (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J Environ Biol*, 29: 641-653.
- Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132:1-41.
- Lima, J.B.P.; Da-Cunha, M.P.; Silva Júnior, R.C.; Galardo, A.K.R.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P.; Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several 85 municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 329-333.
- Lima, E.P.; Filho, A.M.O.; Lima, A.N.R.J.; Cavalcanti, L.P.G.; Pontes, R.J.R. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 259-263.

- Lima-Camara, T.N. 2016. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 50.
- Liu, Q.; Hallerman, E.; Peng, Y.; Li, Y. 2016. Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1561.
- López-Díaz, J.A.; Cantón, P.E.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2013. Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae. *Environmental Microbiology*, 15: 3030-3039.
- Macias, V.M.; Ohm, J.R.; Rasgon, J.L. 2017. Gene Drive for Mosquito Control: Where Did It Come from and Where Are We Headed?. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14: 1006.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Wanderley, D.M.V.; Ribolla, P.E.M. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the state of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47: 573-578.
- Marcombe, S.; Mathieu, R.B.; Pocquet, N.; Riaz, M.A.; Poupardin, R.; Sélior, S.; *et al.* 2012. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. *Plos One*, 7: e30989.
- Martin, P. A.; Travers, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2437-2442.
- Montagner, F.R.G.; Silva, O.S.; Jahnke, S.M. 2017. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban areas. *Brazilian Journal of Biology*.
- Moyes, C.L.; Vontas, J.; Martins, A.J.; Ng, L.C.; Koou, S.Y.; Dusfour, I.; Raghavendra, K.; Pinto, J.; Cordel, V.; David, J.P.; Weetman, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11: 1-20.
- Ngoagouni, C.; Kamgang, B.; Brengues, C.; Yahouedo, G.; Paupy, C.; Nakouné, E. Kazanji, M.; Chandre, F. 2016. Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. *Parasites & Vectors*, 9: 599.
- Nussenzweig, R.S. 2011. Breakthroughs towards a malaria vaccine. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 18: 559-564.

- Oliveira, C.D.; Gonçalves, D.S.; Baton, L.A.; Shimabukuro, P.H.F.; Carvalho, F.D.; Moreira, L.A. 2015. Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of Entomological Research*, 105: 305-315.
- Oliveira, S.P.; de Oliveira, C.D.; Sant'Anna, M.R.V.; Dutra, H.L.C.; Caragata, E.P.; Moreira, L.A. 2017. Wolbachia infection in *Aedes aegypti* mosquitoes alters blood meal excretion and delays oviposition without affecting trypsin activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 65-74.
- Otieno-Ayayo, Z.N.; Zaritsky, A.; Wirth, M.C.; Manasherob, R.; Khasdan, V.; Cahan, R.; Ben-Dov, E. 2008. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental Microbiology*, 10: 2191–2199.
- Pérez, C.; Fernandez, L.E.; Sun, J.; Folch, J.L.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18303-18308.
- Pérez, C.; Muñoz-Garay, C.; Portugal, L.C.; Sánchez, J.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cellular Microbiology*, 9: 2931-2937.
- Pinheiro, V.C.S.; Tadei, W.P. 2002. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44: 245-250.
- Polanczyk, R.; Alves S. 2003. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. *Agrociência*. 2: 1-10.
- Promdonkoy, B.; Promdonkoy, P.; Panyim S. 2005. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiol. Letters*. 252: 121–126.
- Raymond, B.; Johnston, P.R.; Nielsen-LeRoux, C.; Lereclus, D.; Crickmore, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. *Trends in Microbiology*, 18: 189-194.
- Recht, J.; Siqueira, A.M.; Monteiro, W.M.; Herrera, S.M.; Herrera, S.; Lacerda, M.V. 2017. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, 16: 273.
- Reyaz, A.L.; Gunapriya, L.; Arulselvi, P.I. 2017. Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. *3 Biotech*, 7: 143.

- Rocha, H.D.R.; Paiva, M.H.S.; Silva, N.M.; Araújo, A.P.; Camacho, D.R.R.A.; Moura, A.J.F.; Gómez, L.F.; Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V.M. 2015. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Tropica*, 152: 66-73.
- Rodrigues, M.S.; Batista, E.P.; Silva, A.A.; Costa, F.M.; Neto, V.A.; Gil, L.H.S. 2017. Change in Anopheles richness and composition in response to artificial flooding during the creation of the Jirau hydroelectric dam in Porto Velho, Brazil. *Malaria Journal*, 16: 87.
- Rossati, A.; Bargiacchi, O.; Kroumova, V.; Zaramella, M.; Caputo, A.; Garavelli, P.L. 2016. Climate, environment and transmission of malaria. *Le Infezioni in Medicina*, 24: 93-104.
- Salama, H.S.; Abd El-Ghany, N.M.; Saker, M.M. 2015. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13: 101-109.
- Saldaña, M.A.; Hegde, S.; Hughes, G.L. 2017. Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112: 81-93.
- Santos, F.P.; Lopes, J.; Vilas-Bôas, G.T.; Zequi, J.A.C. 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 122: 64-70.
- Saraswathy, N.; Kumar, P.A. 2004. Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7: 178-188.
- Sarmiento, U.C.; Miguita, C.H.; Almeida, L.H.O.; Gaban, C.R.G.; Silva, L.M.G.E.; Souza, A.S.; Garcez, W.S.; Garcez, F.R. 2016. Larvicidal efficacies of plants from Midwestern Brazil: melianodiol from *Guarea kunthiana* as a potential biopesticide against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111: 469-474.
- Sauka, D.H.; Benintende, G.B. 2017. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 273-281.
- Silva, A.P.; Santos, J.M.M.; Martins, A.J. 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasites & Vectors*, 7:450.
- Siqueira, A.M.; Mesones-Lapouble, O.; Marchesini, P.; Sampaio, V.S.; Brasil, P.; Tauil, P.L.; et al. 2016. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 95: 87–96.

- Siqueira, A.M.; Bassat Q.; Rodovalho, S.; Lacerda, M.V. G. 2017. Raising the red flag for malaria elimination and integrated fever surveillance in the Brazilian amazon. Comment. *The Lancet Global Health*, 5: e257-e258.
- Soares-da-Silva, J.; Ibiapina, S.S.; Bezerra, J.M.T.; Tadei, W.P.; Pinheiro, V.C.S. 2012. Variation in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae) infestation in artificial containers in Caxias, state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45: 174-179.
- Soares-da-Silva, J.; Pinheiro, V.C.S.; Litaiff-Abreu, E.; Polanzyk, R.A.; Tadei, W.P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 59: 1-6.
- Soares-Pinheiro, V.C.; Dasso-Pinheiro, W.; Trindade-Bezerra, J.M.; Tadei, W.P. 2017. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 77: 396-401.
- Soberón, M.; López-Díaz, J.A.; Bravo, A. 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41:87-93.
- Stalinski, R.; Laporte, F.; Tetreau, G.; Després, L. 2016. Receptors are affected by selection with each *Bacillus thuringiensis israelensis* Cry toxin but not with the full *Bti* mixture in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*, 44: 218-227.
- Sun, Y.; Zhao, Q.; Xia, L.; Ding, X.; Hu, Q.; Federici, B.A.; Park, H.W. 2013. Identification and characterization of three previously undescribed crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. jegathesan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3364-3370.
- Suter, T.; Crespo, M.M.; de Oliveira, M.F.; de Oliveira, T.S.A.; de Melo-Santos, M.A.V., de Oliveira, C.M.F.; et al. 2017. Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from Brazil and the Swiss-Italian border region. *Parasites & Vectors*, 10: 431.
- Tadei, W.P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on *Anopheline* vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 59: 325-335.
- Tadei, W.P.; Duraty-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42: 87 - 94.

- Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S.; Sampaio, R.T.M.; Mesquita, H.G.; Pinheiro, V.C.S.; Zequi, J.A.C.; Roque, R.A.; Santos, J.M.M. 2017. Adaptive processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. *Hydrobiologia*, 789: 179–196.
- Tetreau, G.; Stalinski, R.; David, J.P.; Després, L. 2013. Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 894-900.
- Tukei, B.B.; Beke, A.; Lamadrid-Figueroa, H. 2017. Assessing the effect of indoor residual spraying (IRS) on malaria morbidity in Northern Uganda: a before and after study. *Malaria Journal*, 16: 4.
- Valle, D.; Pimenta, D.N.; Aguiar, R. 2016. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25: 419-422.
- Wassmer, S.C.; Grau, G.E.R. 2017. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?. *International Journal for Parasitology*, 47: 145-152.
- West, P.A.; Protopopoff, N.; Wright, A.; Kivaju, Z.; Tigererwa, R.; Mosha, F.W.; Kisinza, W.; Rowland, M.; Kleinschmidt, I. 2015. Enhanced Protection against Malaria by Indoor Residual Spraying in addition to Insecticide Treated Nets: Is It dependent on Transmission Intensity or net Usage?. *PLoS One*, 10: e0115661.
- World Health Organization (WHO). *Global Malaria Programme: World Malaria Report*. Geneva: WHO 2011.
- WHO - World Health Organization, 2017. Draft global vector control response 2017-2030.
- WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. 2017. Mosquito identification resources. (<http://www.wrbu.org/VeclD MQ.html>). Acesso em 12 de outubro de 2017.
- Wirth, M.C.; Park, H.W.; Walton, W.E.; Federici, B.A. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 185-189.
- Wirth, M.C.; Walton, W.E.; Federici, B.A. 2015. Evolution of resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) selected with a recombinant *Bacillus thuringiensis* strain-producing Cyt1Aa and Cry11Ba, and the binary toxin, Bin, from *Lysinibacillus sphaericus*. *Journal of medical entomology*, 52: 1028-1035
- Wu, Y.; Gao, M.; Dai, S.; Yi, D.; Fan, H. 2008. Investigation of the cyt gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of Bt isolates from the soil of China. *Biological Control*, 47: 335-339.

- Zara, A.L.D.S.A.; Santos, S.M.D.; Fernandes-Oliveira, E.S.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E. 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25: 391-404.
- Zhang, Q.; Hua, G.; Adang, M.J. 2016. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24: 714-729.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial inseticida de isolados de *Bacillus thuringiensis* mantidos na Coleção de Bacilos do Maranhão, enquanto agente de controle biológico dos vetores *Aedes aegypti*, *Anopheles darlingi* e *Culex quinquefasciatus*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a presença de genes *cry* e *cyt* díptero-específicos em isolados de *B. thuringiensis* mantidos na Coleção de Bacilos do Maranhão com toxicidade em *Ae. Aegypti*, *An. darlingi* e *Culex quinquefasciatus*.
- ✓ Obter o perfil molecular dos isolados com ação entomopatogênica para larvas de *Ae. aegypti*, *An. darlingi* e *Culex quinquefasciatus*.
- ✓ Determinar o potencial larvicida dos isolados de *B. thuringiensis* ativos, com a obtenção da Concentração Letal Mediana (CL₅₀) para larvas de *Ae. aegypti*;
- ✓ Estimar a Concentração Letal Mediana (CL₅₀) dos isolados de *B. thuringiensis* selecionados para larvas de *An. darlingi*;
- ✓ Investigar a presença do gene codificador para toxina citolítica Cyt1Aa em isolados de *B. thuringiensis* obtidos de diferentes fontes de isolamento, bem como conhecer a sua diversidade e verificar possível polimorfismo genético.

CAPÍTULO I

Soares-da-Silva, J. Queirós, S.G., Aguiar, J. S., Viana, J. L., Neta, M.R.A.V., Silva, M. C., Pinheiro, V.C.S., Polnczyk, R.A., Carvalho-Zilse, G.A., Tadei, W.P. 2017. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance.

Artigo publicado na revista Acta Tropica (Anexo)

Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance

Joelma Soares-da-Silva ^{a,b*}; Silmara G. da Conceição ^c; Jéssica S. de Aguiar ^c; Juliete L. Viana ^c; Maria dos R.A.V. Neta ^c; Maria C. da Silva ^c; Valéria C.S. Pinheiro ^c; Ricardo A. Polanczyk ^d; Gislene A. Carvalho-Zilse ^e; Wanderli P. Tadei ^b.

^a Curso Ciências Naturais, Campus VII, Universidade Federal do Maranhão, Avenida Dr. José Anselmo, 2008, São Sebastião, Codó, Maranhão, 65400-000, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

^c Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Química e Biologia, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias, Maranhão, 65604-380, Brasil.

^d Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Paulo Donato Castellane s/n. Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brasil.

^e Grupo de Pesquisas em Abelhas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

*author corresponding: Joelma Soares-da-Silva, Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

Email address: joelmasoares12@gmail.com

ABSTRACT

The occurrence of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and mosquitoes of the genus *Anopheles* potentiate the spread of several diseases, such as dengue, Zika, chikungunya, urban yellow fever, filariasis, and malaria, a situation currently existing in Brazil and in Latin America. Control of the disease vectors is the most effective tool for containing the transmission of the pathogens causing these diseases, and the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* has been widely used and has shown efficacy over many years. However, new *B. thuringiensis* (*Bt*) strains with different gene combinations should be sought for use as an alternative to *Bti* and to prevent the resistant insects selected. Aiming to identify diversity in the *Bt* in different Brazilian ecosystems and to assess the pathogenicity of this bacterium to larvae of *Ae. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, and *Anopheles darlingi*, *Bt* strains were obtained from the Amazon, Caatinga (semi-arid region), and Cerrado (Brazilian savanna) biomes and tested in pathogenicity bioassays in third-instar larvae of *Ae. aegypti* under controlled conditions in the laboratory. The isolates with larvicidal activity to larvae of *Ae. aegypti* were used in bioassays with the larvae of *C. quinquefasciatus* and *An. darlingi* and characterized according to the presence of 14 *cry* genes (*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry24*, *cry32*, *cry44Aa*, *cry1Ab*, *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, and *cry11Ba*), six *cyt* genes (*cyt1*, *cyt2*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* and *cyt2Ba*), and the *chi* gene. Four hundred strains of *Bt* were isolated: 244 from insects, 85 from Amazon soil, and 71 from the Caatinga biome. These strains, in addition to the 153 strains isolated from Cerrado soil and obtained from the Entomopathogenic Bacillus Bank of Maranhão, were tested in bioassays with *Ae. aegypti* larvae. A total of 37 (6.7%) strains showed larvicidal activity, with positive amplification of the *cry*, *cyt*, and *chi* genes. The most frequently amplified genes were *cry4Aa* and *cry4Ba*, both occurring in 59.4% in these strains, followed by *cyt1Aa* and *cyt2Aa*, with 56.7% and 48% occurrence, respectively. Twelve (2.2%) strains that presented 100% mortality within 24

h were used in bioassays to estimate the median lethal concentration (LC₅₀) for *Ae. aegypti* larvae. Two strains (BtMA-690 and BtMA-1114) showed toxicity equal to that of the *Bti* standard strain, and the same LC₅₀ value (0.003 mg/L) was recorded for the three bacteria after 48 h of exposure. Detection of the presence of the *Bt* strains that showed pathogenicity for mosquito larvae in the three biomes studied was possible. Therefore, these strains are promising for the control of insect vectors, particularly the BtMA-1114 strain, which presents a gene profile different from that of *Bti* but with the same toxic effect.

Keywords: Mosquitoes vectors; biological control; Bacteria; genes cry e cyt

1. Introduction

Diseases whose etiological agents are transmitted by mosquito vectors are among the major diseases affecting humans (WHO, 2017). Considering Latin America, among the species of greater epidemiological importance is *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) (Linnaeus, 1762), it is the main vector of the Zika, dengue, chikungunya, and urban yellow fever viruses (Honório et al., 2015; Ebi and Nealon, 2016; Ferreira-de-Brito et al., 2016).

Culex quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) is another species of mosquitoes of importance to public health in the Americas. It is the vector of lymphatic filariasis, a disease of a chronic nature that mainly affects populations of low socioeconomic level (Brasil, 2016; Rebollo et al., 2017).

The species *Anopheles darlingi* Root 1926 is the main vector of malaria in America, mainly in the Amazon region, which recorded more than 83% of the cases (Siqueira et al., 2017; Tadei et al., 2017).

There are epidemic cycles of these diseases in the Latin America, it is necessary to seek ways to control. Several obstacles to mosquito control exist, with resistance to chemical agents being noted as one of the main challenges to the current vector control program (Moyes et al., 2017; Seixas et al., 2017).

The use of the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner, 1915 is one of the biological control strategies that has been showing better efficacy (Bravo et al. 2011; Lacey et al., 2015). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) is a natural enemy of several species of mosquitoes of the genera *Culex* Linnaeus, 1758; *Aedes* Meigen, 1818; and *Anopheles* Meigen, 1818. It is the microbial agent more commonly used in the control of these insects, and its continued use for more than 30 years has not resulted in the evolution of resistance in mosquito populations treated in different regions of the world (Bravo et al., 2011; Stalinski et al., 2016).

The lack of resistance is attributed to the complex mechanism of action of *Bti*, which has toxins known as Cry toxins (4Aa, 4Ba, 11Aa, 11Ba, and 10Aa) that are capable of interacting with the intestinal epithelium of the mosquito larvae and also has cytolytic (Cyt) toxins that are less specific but facilitate the insertion of Cry toxins into the intestinal epithelium and may thus increase insecticidal activity (Bravo et al., 2007; Ben-Dov, 2014; Zhang et al 2016). The synergism between the Cry and Cyt toxins is fundamentally important for the efficacy of the bacterium (Frankenhuyzen, 2013; Zhang et al 2016).

Some *Bt* strains also produce vegetative insecticidal proteins (Vips) produced in vegetative phase and chitinolytic toxins (Chi), the toxins chitinolytics are another group of toxins that may contribute to larval mosquitoes mortality by destroying the peritrophic matrix of insects (Sampson and Gooday, 1998; Djenane et al., 2017).

Although no records exist of resistance to *Bti*, the possibility of the select of resistant populations cannot be discounted. This bacterium is an important biological agent;

therefore, the use of other strains with different combinations of *cry* and *cyt* genes is necessary as a form of management and prevention of resistance to *Bti* (Cánton et al., 2015; Peralta and Palma, 2017).

The diversity of the Cry toxins already found and described in the literature demonstrates the possibility of discovery of different combinations of *Bti* with different insecticidal potentials (Crickmore et al., 2017).

Several studies have sought to obtain more *B. thuringiensis* isolates with insecticidal potential for mosquitoes, which is done by isolating native strains from substrates such as soils from different ecosystems, dead insects, plants, and other sources. In addition, these strains are investigated at the molecular level by detecting the genes encoding the Cry and Cyt toxins present in the toxic crystal, which makes predictions of their insecticidal activity possible (Bravo et al., 1998; Jouzani et al., 2008; Costa et al., 2010; El-kersh et al., 2016).

The present study investigated the diversity of *Bt* strains isolated from soils of different Brazilian biomes and from dead insects, and showing larvicidal activity against mosquitoes *Ae aegypti*, *Cx quinquefasciatus* and *An darlingi* in the laboratory which are the main mosquitoes of medical importance in Latin America.; in addition, the gene profiles of the strains pathogenic.

2. Methods

2.1. Sampling and isolation of *Bacillus thuringiensis*

A total of 37 soil samples from two biomes (15 from the Caatinga biome and 22 from the Amazon biome) and 44 samples from dead insects were processed according to the World Health Organization (1985) protocol for the isolation of *Bt* strains.

The soil samples consisted of 10 g of soil, which was collected at a depth of 5 cm, placed in sterile flasks, and sent to the Laboratory of Medical Entomology (LABEM) at the Universidade Estadual do Maranhão - UEMA.

The insect samples consisted of 44 dead insects collected in the Cerrado biome. The insects were identified as belonging to the orders Coleoptera (22), Hymenoptera (15), and Hemiptera (07). All samples were collected in the state of Maranhão, Brazil, which contains the three biomes (SISBIO/59840; IBGE, 2017).

2.2. Morphological identification of *Bacillus thuringiensis* isolates

The strains were cultured in nutrient agar (peptic digest of animal tissue 5 g/L, sodium chloride 5 g/L, meat extract 1.5 g/L, and yeast extract 1.5 g/L pH 7.4 ± 2) containing penicillin G (100 mg/L) for 48 h; then, and viewed at 1000x magnification under an Axio Scope A.1 (*Zeiss*) microscope by phase-contrast to detect the presence of crystal for differentiation from *Bacillus cereus*. The *Bt* strains were submitted the gram-staining test (Jung et al., 1998).

The strains the *Bt* were stored at 4°C in filter-paper strips, impregnated with spore suspension, immersed in autoclaved distilled water, and stored at 4°C in triplicate. The strains were individually identified with BtMA (*Bacillus thuringiensis* from Maranhão) followed by the number corresponding to the order of isolation and deposited in the Entomopathogenic Bacillus Bank of Maranhão (BBENMA), located in the municipality of Caxias, Maranhão, Brazil.

2.3. Selection of strains for mosquito pathogenicity assays.

For preliminary screening of strain pathogenicity to *Ae. aegypti*, 553 strains of *Bt*, of which 400 were obtained in this study and 153 were isolated from Cerrado soil and kept at

BBENMA, were used after preselection of the strains for larvicidal activity. The bioassay was performed in triplicate: three plastic cups containing 10 mL of drinking distilled water and 10 third-instar *Ae. aegypti* larvae were used, with 1 mL of the total bacterial culture being added to each. The negative control consisted of 10 larvae placed in a plastic cup with water, but without inoculation with the bacterium; for the positive control, *Bti* T04001 lyophilized was used under the same conditions. The bioassays were conducted at the LABEM, UEMA, with a temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of 80% and photoperiod of 12 h light followed by 12 h dark (12L:12D) (WHO, 2005).

The strains that reached 100% mortality in up to 48 h, along with the *Bti* standard strain, were grown in NYSM medium incubated at 28°C for 5 days for complete sporulation and release of the crystal proteins. After, the samples were centrifuged at $1700\times g$ for 15 minutes at 4°C , and the pellet was recovered and transferred to Falcon tubes with 10 mL of autoclaved distilled water and 0.01% Triton[®] X-100. The spores were then counted using a Neubauer chamber in an Axio Scope A.1 (*Zeiss*) phase-contrast optical microscope (Alves and Moraes, 1998). The strains were tested again for *Ae. aegypti* larvae at the standard concentration of 1.5×10^7 spores/mL under the same abovementioned conditions.

Strains that killed 100% of the larvae in 48 h were cultured in 600 mL of nutrient yeast extract salt medium (NYSM) (Yousten, 1984) for 5 days at 28°C at 180 rpm. The culture obtained was centrifuged at $10.000\times g$ for 30 min at 4°C , washed with autoclaved distilled water, frozen, and lyophilized for approximately 16 h (Santos et al., 2012).

2.4. Pathogenicity bioassays in *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles darlingi* larvae

Strains that killed 100% of the *Ae. aegypti* were selectively tested at a concentration of 10 mg/L against *C. quinquefasciatus* and *An. darlingi* larvae. The larvae of the F1

generation, obtained from adults collected in the field and eggs reared in the laboratory (SISBIO/21264-3). Collection was carried out in the city of Caxias, Maranhão for *C. quinquefasciatus* and in Manaus, Amazonas for *An. darlingi*. The bioassays followed the same conditions of the tests described above for *Ae. aegypti*.

2.5. Bioassays for estimating the lethal concentration (LC₅₀) and (LC₉₀) for *Aedes aegypti* larvae

These bioassays were performed with the 12 strains that showed 100% mortality in 24 h for *Ae. aegypti*. Toxicity bioassays were performed in the laboratory with *Ae. aegypti* due to the ease of obtaining this species.

For each strain, six concentrations (0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008 and 0.005 mg/L) were initially tested, from which more concentrations (0.09 to 0.001 mg/L) were established to obtain a mortality of 90-100% and 5-15% for each strain.

Each concentration was tested in three replicates, was performed in the different days. Each replicate used five plastic cups containing a final volume of 150 mL and 20 third-instar larvae, and the amount corresponded to each concentration of the isolates. For each bioassay, a negative control group was added, which consisted of a cup with larvae and without inoculation with the bacillus. The bioassays were monitored at intervals of 24, 48, and 72 h after the application of the bacillus, with dead larvae being counted at each interval.

To compare the larvicidal activity of the isolates, *Bti* T04001 was used. The bioassay was performed under the same conditions described for the other isolates and in accordance with the recommendations Guidelines For Laboratory And Field Testing Of Mosquito Larvicides (WHO, 2005).

2.6. Lethal concentration (LC₅₀) and (LC₉₀) and statistical analyses

The mortality data obtained in the toxicity bioassays were submitted to Probit analysis at $p = 0.05$ (Finney, 1971), with the statistical software POLO PLUS (LeOra Software, 2003) being used to estimate the LC₅₀ and LC₉₀.

The toxicity of each isolate was compared to that of the standard strain *Bti* T04001 using Student's t test when the data were parametric or the Mann-Whitney test for non-normal data; the level of significance was set as 5% ($\alpha = 0.05$). The statistical program used was BioEstat 5.0 (summer) for Windows (Ayres et al., 2007).

2.7. Molecular characterization

The strains of *Bt* with larvicidal activity were investigated for the presence of the *cry* (14), *cyt* (6), and *chi* genes encoding toxins active against mosquito larvae using polymerase chain reaction (PCR). Eleven universal primers—*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry24*, *cry32*, *cry44*, *cyt1*, *cyt2* and *chi*—and 10 specific primers—*cry1Ab*, *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* and *cyt2Ba*—were used for gene amplification (Table 1). The following strains were used as positive controls: *B. thuringiensis* var. *aizawai* (XenTari-WDG; *cry1*, *cry1Ab*), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel WP; *cry2*), *B. thuringiensis* *sotto* (T03 001; *cry24*), *B. thuringiensis* var. *yunnanensis* (T20 001; *cry32*), *B. thuringiensis* *entomocidus* (T06a 001; *cry44*) and *B. thuringiensis* var. *israelensis* (T04 001) for the remaining genes, provided by the Laboratory of Bacterial Genetics and Applied Biotechnology (LGBBA) of the School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Universidade Estadual Paulista - FCAV/UNESP Jaboticabal).

Table 1

Lists the studied *B. thuringiensis* genes with the respective primers used and the expected fragment sizes from PCR as well as the annealing temperature.

Gene	Sequence of primers (5' - 3')	TF of pb	TM
<i>cry1^l</i>	CTGGATTTACAGGTGGGGATAT (f)	543-594	52
	TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT (r)		
<i>cry1Ab²</i>	AAGCAAGGGTTATTACATTACG (f)	~550	56
	CCAATACTAAGATCAGAGGG (r)		
<i>cry2³</i>	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG (f)	689-701	52
	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT (r)		
<i>cry4³</i>	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC (f)	439-459	52
	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC (r)		
<i>cry4Aa⁴</i>	GAACTGGGTATGGCACTCAAC (f)	777	50
	CTCACAACGATTAGACCCTTC (r)		
<i>cry4Ba⁴</i>	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC (f)	347	52
	GTTGTAGGGTGGAAATTGTTATC (r)		
<i>cry10³</i>	TCAATGCTCCATCCAATG (f)	348	51
	CTTGTATAGGCCTTCCTCCG (r)		
<i>cry10Aa⁴</i>	ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG (f)	995	50
	AATACTTTGGATGTGTCTTGAG (r)		
<i>cry11¹</i>	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (f)	305	51
	CATTTGTACTTGAAGTTGTAATCCC (r)		
<i>cry11Aa⁴</i>	AGGATGGATAGGAAACGGAAG (f)	470	50
	CCGTATTCCAGCAGGTAAGC (r)		
<i>cry11Ba⁴</i>	TACAGGATGGATAGGGAATGG (f)	608	52
	TAATACTGCCATCTGTTGCTTG (r)		
<i>cry24³</i>	TTATCAATGTTAAGGGATGC (f)	304	48

	ACTGGATCTGTGTATATTTTCCTAG (r)		
<i>cry32</i> ³	TGGTCGGGAGAGAATGGATGGA (f)	676-677	54
	ATGTTTGCGACACCATTTTC (r)		
<i>cry44Aa</i> ⁵	CATTACACGGGGTGC GTTAT (f)	444	60
	CCGCACTTACATGTGTCCAA (r)		
<i>cyt1</i> ³	CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT (f)	477-480	52
	TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT (r)		
<i>cyt1Aa</i> ⁴	AACTCAAACGAATAACCAAG (f)	300	53
	TGTTCCTTTACTGCTGATAC (r)		
<i>cyt1Ab</i> ⁴	AAGCAAGGGTTATTACATTACG (f)	698	54
	CCAATACTAAGATCAGAGGG (r)		
<i>cyt2</i> ³	ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (f)	355-356	52
	TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC (r)		
<i>cyt2Aa</i> ⁴	GCATTAGGAAGACCATTTG (f)	361	53
	AAGGCTAAGAGTTGATATCG (r)		
<i>cyt2Ba</i> ⁶	CAGGAACTCTTAATCAAAGTGTAAT (f)	177	50
	CATCTACTTGAGGTTCTAAATTTGT (r)		
<i>chi</i> ⁷	ATGGTCATGAGGTCTC (f)	2027	45
	CTATTTGCTAATGACG (r)		

Legend (f)= forward; (r)= reverse; Pb= base pair. ¹ Bravo et al.,1998; ² Fatoretto (2007); ³ Jouzani et al., 2008; ⁴ Costa et al., 2010; ⁵ Vidal-Quist et al., 2009; ⁶ Costa et al., 2014; ⁷ Lin e Xiong (2004). Legend: TF= Fragment size, pb= pairs of base and TM = melting temperature.

2.8. Total DNA extraction and amplification reaction of mosquito-specific genes

Total DNA extraction from the strains was performed using the InstaGene Matrix DNA extraction kit (Bio-Rad, USA), according to the manufacturer's recommendations. One colony of each isolate was grown for approximately 12 h in nutrient agar and transferred to a microtube containing 1 mL of sterile Milli-Q water; this sample was then centrifuged for 1 min at 12,000 rpm and 20°C. The supernatant was discarded; then, 200 µL of InstaGene Matrix (Bio-Rad) was added, and the material was incubated in a water bath at 56°C for 25 min, after vortexed thoroughly for 10s and then incubated at 100 °C for 8 min. The sample was again vortexed at moderate speed for 10 s and centrifuged at 20 °C for 2.5 min. The DNA which were stored in a freezer at -20°C until the time of use.

PCR reactions were performed at a final volume of 25 µL with: 1X GoTaq® Flexi DNA Polymerase buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega), 0.2 pmol/µL of each primer (Invitrogen), 1U of GoTaq® DNA Polymerase enzyme (Promega), and 50 ng of DNA. The PCR was performed for all genes mentioned above; the reaction was performed in a Gencycler-G96G thermocycler (Biosystems). The general amplification conditions were programmed according to the following specifications: 94°C for 5 min; followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, with the annealing temperature optimized according to each primer (Table 1), and final extension at 72°C for 5 min. For amplification of the *chi* (chitinase) gene, the program was as follows: 5 min at 94 ° C; 30 cycles of 1 min at 94° C, 1 min at 45° C, and 1.5 min at 72° C; and 10 min at 72° C for a final extension (Costa et al., 2010).

Amplification products were analyzed by electrophoresis in a 1,5 % agarose gel with current applied at 90 V in 1X TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer with alkaline pH and photographed in an L-PIX device (Loccus Biotechnology).

3. Results

3.1. Isolation of *Bacillus thuringiensis*

Four-hundred strains of *Bt* were obtained, 244 from insects, 85 from the Amazon soil, and 71 from the Caatinga soil. The Amazon soil was the substrate with the highest isolation rates, with 72.7% of the samples presenting *Bt*, followed by the Caatinga soil with 53.3% and then dead insects with 43.2%.

However, the highest mean occurrence of *Bt* per sample was observed for dead insects, with 5.5 strains, whereas for soil samples, the rates were 4.7 for the Caatinga and 3.9 for the Amazon.

In the insects, Hymenoptera was the group with the highest number of *Bt* strains, with 193 strains and a mean of 12.9 for sample, a value three times higher than that found for the other orders, Coleoptera and Hemiptera, which had 100 and 21 strains and means of 4.5 and 3, respectively.

3.2. Selection bioassays of *Bacillus thuringiensis* strains pathogenic for mosquitoes

From the total of 553 strains of *Bt* selectively tested against *Ae. aegypti*, 37 (6.7%) showed pathogenicity, 12 of which killed 100% of the larvae in 24 h (Table 2). The remaining 25 strains showing pathogenicity reached 100% mortality after 48 h.

Among the 37 pathogenic strains, approximately one-half (47.7%) were obtained from the Cerrado soil. The rate of strains from this biome that are active against mosquitoes was 11.11% of the total number of strains tested, three times higher than that obtained for the Caatinga biome, for which the lowest rate (3.5%) was found.

Table 2

Bacillus thuringiensis isolates with 100% larvicidal activity for *Aedes aegypti* larvae at 24 and 48 h in the laboratory conditions according to the origin of the isolation substrate in municipality the isolated.

Biome	Substrate	Larvicidal		Municipality	Latitude (S) Longitude (W)
		activity			
		24 h	48h		
Amazônia					
BtMA- 37	solo	100	-	Viana	S 03°13'12.3" W 045°08'88.7"
BtMA-179	solo		100	Santa Luzia	S 04°38'20.5" W 046°23'30.1"
BtMA-215	solo		100	Bela Vista	S 03°75'60.3"W 045°22'62.9"
BtMA-229	solo		100	Santa Inês	S 03°85'73.3"W 045°53'49.2"
BtMA-233	solo		100	Santa Inês	S 03°85'73.3"W 045°53'49.2"
BtMA-237	solo		100	Santa Inês	S 03°85'73.3"W 045°53'49.2"
BtMA-241	solo		100	Santa Inês	S 03°85'73.3"W 045°53'49.2"
Cerrado					
BtMA-459	solo		100	São J. dos Patos	S 06°50'37.5" W 043°68'65.8"
BtMA-527	solo		100	Benedito Leite	S07°22'55.5" W 044°55'97.2"
BtMA-559	solo		100	Balsas	S 07°53'53.3"W 046°03'91.1"
BtMA-626	solo		100	Coelho Neto	S 04°25'31.0" W 043°01'38.9"
BtMA-676	solo		100	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-679	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-681	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5"W 042°94'91.8"
BtMA-682	solo		100	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-684	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5"W 042°94'91.8"
BtMA-685	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5"W 042°94'91.8"
BtMA-686	solo		100	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-687	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"

BtMA-688	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-689	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-690	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-691	solo	100	-	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
BtMA-694	solo		100	Duque Barcelar	S 04°13'72.5" W 042°94'91.8"
Insetos					Nº da Amostra
BtMA-1054	Hymenoptera		100	Mirador	1
BtMA-1061	Hymenoptera		100	Mirador	1
BtMA-1107	Coleoptera		100	Mirador	2
BtMA-1108	Coleoptera		100	Mirador	2
BtMA-1109	Coleoptera		100	Mirador	2
BtMA-1114	Coleoptera	100	-	Mirador	3
BtMA-1115	Coleoptera		100	Mirador	3
BtMA-1116	Coleoptera		100	Mirador	3
BtMA-1119	Coleoptera		100	Mirador	3
BtMA-1120	Coleoptera		100	Mirador	3
BtMA-1134	Hymenoptera		100	Mirador	4
BtMA-1147	Hymenoptera		100	Mirador	5
Caatinga					
BtMA -703	solo		100	Santa Quitéria	S 03°48'34.6"W 042°55'59.8"

3.3. Molecular characterization

In all 37 strains that showed pathogenic activity, positive amplification occurred for the genes tested using the universal and specific primers (Table 3).

The PCR reactions showed positive amplification of all genes studied; however, variation was observed in the number of *cry* and *cyt* genes per strain. Twelve different gene combinations were observed, with three strains (BtMA-37, BtMA-626, and BtMA-215)

containing a single gene, whereas five strains (BtMA-676, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-688, and BtMA-690) amplified fragments with the expected size for 15 genes, thus confirming the presence of six families of genes active against Diptera (*cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1*, *cyt2*, and *chi*) and the presence of nine genes specific to mosquitos. This profile was similar to the one obtained with the *Bti*-T4001 standard strain, for which positive amplification was also observed for the nine genes encoding toxins active against mosquitoes and for the *chi* gene. The BtMA -679 and 687 strains, in addition to the nine *Bti* genes, showed amplification for the *cry32* gene (Table 3).

The *cry4Aa* and *cry4Ba* genes had a higher occurrence rate in the strains (59.4%), followed by the *cyt1Aa* and *cyt2Aa* genes, which were present in 56.7% and 48% of the strains, respectively. Next, in decreasing order of frequency, were *cry10Aa* (45%), *cyt1Ab* (43.24%), *cry11Aa* and *cyt2Ba* (37.8%), *chi* (35.3%), *cry11Ba* (32.4%), *cry32* (27%), *cry1* (8.1%), and *cry44Aa* (2.7%). No positive amplification was found for the *cry1Ab*, *cry2*, and *cry24* genes.

Table 3

Gene profile of the 37 isolates of *Bacillus thuringiensis* active against *Aedes aegypti* larvae obtained from the three soil e insects Brazilian biomes.

Isolates	<i>cry I</i>	<i>cry IAb</i>	<i>cry 2</i>	<i>cry 4</i>	<i>cy4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry 10</i>	<i>cry10Aa</i>	<i>cry 11</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cytI</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2</i>	<i>cyt2Aa</i>	<i>cyt2Ba</i>	<i>chi</i>	<i>cry 24</i>	<i>cry 32</i>	<i>cry 44Aa</i>	
<i>Bt israelensis</i>			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Bt azawai</i>	+	+																				
<i>Bt kustaki</i>	+																					
<i>Bt sotto</i>																				+		
<i>Bt entomocidus</i>																						+
<i>Bt yuannanensis</i>																						+
Amazônia																						
BtMA-37					+																	
BtMA-179			+			+			+			+										
BtMA-215																						+
BtMA-229			+			+			+						+	+						
BtMA-233									+						+	+	+	+		+	+	
BtMA-237												+	+									+
Cerrado																						
BtMA-241							+					+			+	+						+
BtMA-459	+		+			+						+			+	+						+
BtMA-527							+	+				+	+						+			
BtMA 626														+								
BtMA-559									+								+		+			
BtMA-676			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
BtMA-679			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
BtMA-681			+			+	+	+	+	+		+	+		+	+	+					

BtMA-682		+	+			+				+	+	+	+		
BtMA-684		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BtMA-685		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BtMA-686						+					+	+		+	
BtMA-687		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BtMA-688		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BtMA-689		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
BtMA-690		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BtMA-691		+		+		+	+		+	+	+	+	+	+	
BtMA-694		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
Insetos															
BtMA-1054			+			+						+			
BtMA-1061		+				+			+		+				
BtMA-1107	+		+			+	+								
BtMA-1108		+	+		+	+					+			+	
BtMA-1109	+		+	+		+									
BtMA-1114		+	+	+	+		+	+		+	+		+		+
BtMA-1115			+	+						+	+				
BtMA-1116			+	+							+				
BtMA-1119			+	+						+	+				
BtMA-1120			+	+							+				
BtMA-1134		+			+										
BtMA-1147		+		+											
Caatinga															
BtMA-703		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Legend: + = presence and - = absence

3.4. Bioassays for estimating the lethal concentration (LC₅₀) and (LC₉₀)

The toxicity bioassays were performed with the 12 strains of *Bt* that achieved 100% mortality after 24 hours. Based on the obtained values of LC₅₀ and LC₉₀ and the respective confidence intervals, four toxicity groups were formed. The most toxic strains were BtMA-690, BtMA-1114, and the *Bti* T4001 standard strain, followed by the group composed of BtMA-679, BtMA-687, and BtMA-688, and then the strains BtMA-37, BtMA-681, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-689, and 703. The lowest toxicity was observed for the BtMA-691 strain, which showed the highest values for LC₅₀ and LC₉₀ (Table 4).

The quantitative bioassays showed that two strains (BtMA-690 and BtMA-1114) had similar performance to the *Bti* standard strain, for which no significant difference between the LC₅₀ values was observed in the three evaluation periods (ANOVA: $F = 16$, $p = 0.06$). In the 24-h evaluation, BtMA-690 and *Bti* obtained the same LC₅₀ value of 0.003 mg/L; however, the LC₉₀ was 0.009 mg/L and 0.014 mg/L, respectively. For BtMA-1114, the LC₅₀ was 0.004 mg/L, and the LC₉₀ was 0.008 mg/L (Table 4).

Table 4

Lethal Concentrations LC₅₀ and LC₉₀ in mg/L at the 24-, 48-, and 72-hour evaluations for *Bacillus thuringiensis* isolates pathogenic to mosquitos.

24 hour				
Isolados	LC ₅₀ (IC 95%)	LC ₉₀ (IC 95%)	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-37	0.063 (0.056-0.073)	0.158 (0.114-0.380)	3.184 (0.323)	6.3
BtMA-679	0.015 (0.012-0.019)	0.042 (0.029-0.082)	2.904(0.143)	14.5
BtMA-681	-	-	-	-
BtMA-684	0.078 (0.065-0.120)	0.161 (0.110-0.415)	4.047 (0.881)	2.4
BtMA-685	0.032 (0.021-0.038)	0.049 (0.040-0.103)	6.608 (0.428)	32.2
BtMA-687	0.017 (0.014-0.019)	0.052 (0.040-0.076)	2.603 (0.138)	5.1
BtMA-688	0.012 (0.011-0.013)	0.030 (0.027-0.034)	3.205 (0.148)	1.2
BtMA-689	0.049 (0.030-0.166)	0.319 (0.113-6.440)	1.579 (0.153)	7.7
BtMA-690	0.003 (0.002-0.003)	0.009 (0.007-0.011)	2.763 (0.137)	5.2
BtMA-691	0.437 (0.252-1.290)	3.997 (1.338-35.925)	1.334 (0.230)	0.5
BtMA-703	0.038 (0.029-0.044)	0.057 (0.047-0.130)	7.208 (0.549)	24.1
BtMA -1114	0.004 (0.003-0.005)	0.008 (0.006-0.018)	4.827 (0.271)	30.6
Bti t4001	0.003 (0.002-0.003)	0.014 (0.011-0.017)	2.010 (0.075)	12.5
48 hours				
Isolados	LC ₅₀ (IC 95%)	LC ₉₀ (IC 95%)	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-37*	0.0474 (0.038-0.053)	0.1 27 (0.098-0.240)	2.994 (0.319)	5.0
BtMA-679	0.011 (0.011-0.012)	0.027 (0.025-0.030)	3.408 (0.154)	1.1
BtMA-681*	0.044(0.039-0.050)	0.072 (0.059-0.117)	5.968 (0.596)	6.5
BtMA-684	0.053 (0.049-0.058)	0.114 (0.093-0.157)	3.828 (0.466)	2.3
BtMA-685	0.015 (0.009-0.025)	0.057 (0.031-0.204)	2.163 (0.111)	19.5
BtMA-687*	0.015 (0.008-0.029)	0.046 (0.025-0.709)	2.593 (0.140)	48.8
BtMA-688*	0.009 (0.008- 0.010)	0.022 (0.020-0.025)	3.276 (0.168)	1.8
BtMA-689*	0.040 (0.029-0.109)	0.131 (0.066-3.681)	2.480 (0.371)	5.9

BtMA-690	0.003(0.002-0.004)	0.009 (0.006-0.016)	2.650 (0.122)	20.0
BtMA-691*	-	-	-	-
BtMA-703*	0.036 (0.033-0.038)	0.051 (0.047-0.059)	8.287 (0.633)	5.1
BtMA-1114	0.003(0.0026-0.0034)	0.006 (0.005-0.008)	4.006 (0.206)	6.7
Bti t4001	0.003 (0.0021-0.0033)	0.011 (0.009-0.015)	2.055 (0.093)	3.8
72 hours				
Isolado	LC ₅₀ (IC 95%)	LC ₉₀ (CIC 95%)	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-37	0.023(0.006-0.033)	0.104 (0.085-0.196)	1.945 (0.542)	1.2
BtMA-679	0.008 (0.007-0.008)	0.018(0.016-0.019)	3.622 (0.173)	2.3
BtMA-681	0.034 (0.030-0.037)	0.072(0.061-0.096)	3.880 (0.351)	3.01
BtMA-684	0.044 (0.035-0.049)	0.064 (0.056-0.101)	7.963 (0.693)	37.2
BtMA-685	0.011 (0.009-0.013)	0.051 (0.036-0.081)	1.901 (0.091)	4.05
BtMA-687	0.011 (0.008-0.014)	0.031 (0.021-0.069)	2.799 (0.138)	21.7
BtMA-688	0.008 (0.007-0.009)	0.018 (0.016-0.023)	3.587 (0.211)	3.3
BtMA-689	0.033(0.023-0.069)	0.207 (0.089-1.638)	1.605 (0.138)	7.4
BtMA-690	0.002 (0.001-0.002)	0.005 (0.004-0.006)	3.009 (0.150)	0.6
BtMA-691	1.487 (0.440- 39.74)	548.28 (25.29- NE)	0.499 (0.119)	0.4
BtMA-703	0.034 (0.027-0.038)	0.049 (0.043-0.068)	8.282 (0.695)	12.5
BtMA-1114	0.003 (0.002-0.004)	0.006 (0.005 -0.001)	4.048 (0.206)	28.9
Bti T4001	0.001 (0.001-0.002)	0.006 (0.005-0.008)	1.924 (0.090)	2.7

Legend: LC₅₀ and LC₉₀= Lethal Concentration; CI, Confidence interval. NE= NE, not estimated.

Strains that showed a difference in toxicity for T Student. The control showed mortality ≤ 5%.

In the period (48 h), BtMA-690, BtMA-1114, and the *Bti* T4001 obtained the same value of LC₅₀ (0.003 mg/L), but the LC₉₀ was 0.009 mg/L for the two isolates and 0.011 mg/L for the standard strain. At the evaluation after 72 h, the LC₅₀ value was 0.001 mg/L for *Bti* and 0.002 and 0.003 mg/L for BtMA-690 and BtMA-1114, respectively, whereas the LC₉₀ was 0.005 mg/L for BtMA-690 and 0.006 mg/L for the other two strains (Table 4).

Based on the LC₅₀ values obtained at the three evaluation periods, the less toxic isolates (BtMA-37 and BtMA-691) showed LC₅₀ values approximately 20 times higher than the BtMA-690, BtMA-1114, and *Bti* standard strains, whereas the groups BtMA-679, BtMA-687, and BtMA-688 were five times less toxic than *Bti*.

4. Discussion

The bacterium *Bt* is found in all environments, but soil has been the most used source of isolation (Polanczyk et al., 2004; Gobatto et al., 2010; El-Kersh et al., 2016; Reyaz et al., 2017). In the present work, in which soil samples and insects were analyzed, the insects were the substrates with the highest number of *B. thuringiensis* per sample, and the presence of the bacterium was detected in 56% of the insect samples used.

The presence of *Bt* in insects is generally high (Gobatto et al. 2010; Pinto et al., 2003; Assaedi et al., 2011). These bacteria develop with these organisms, thus making them a natural source of the pathogen and making it possible to find new strains of this bacterium both in dead and live insects (Berhnhard et al., 1997; Abulreesh et al., 2012).

In the present work, detection of the bacterium was possible in three orders of insects, with Hymenoptera being the most promising, for which was found in 66% of the samples, corresponding to more than twice the percentage occurrence for the orders Coleoptera with 31.8% and Hemiptera with 28.5%.

Other studies have shown different results for *Bt* occurrence rates in insects, such as the order Coleoptera with 60% (Hernández et al., 2005), whereas for Hymenoptera, 40% of the bacterial colonies obtained from two species of this order of insects were identified as *Bt* (Pinto et al., 2003).

The Caatinga biome showed a higher mean number of strains per samples compared to the Amazon soil when was isolated from the soil of the two biomes. The Caatinga, located

in the northeastern region of Brazil, had already been reported as the region with the greatest abundance of *Bt* in the country (Silva et al., 2012), for which the presence of the bacteria was detected in 16.9% of the samples (Silva et al., 2002).

The number of strains of *Bt* per sample in the Amazon biome found in this study corroborates previous findings, in which even lower mean values 0.48 and 2.28 strains per sample were observed (Pereira et al., 2013; Soares-da-Silva et al., 2015). In contrast, *Bt* occurred in approximately 70% of the soil samples of this biome used for isolation, which demonstrates the wide distribution of this bacterium in this environment.

The persistence of *Bt* spores in the soil involves different factors, with the soil chemical constituents being suggested as one of the main factors affecting this persistence (Polanczyk et al., 2004). The number *Bt* of strains obtained from the different biomes varied considerably, the presence of this bacterium in all types of environments indicates that *Bt* must undergo intense selective pressure and, to survive, has developed different ways of resisting natural enemies (Habib and Andrade, 1998). This is confirmed by the pathogenicity of *Bt* to different groups of insects (Frankenhuyzen, 2009; 2013).

About the pathogenicity of *Bt* strains active against mosquitoes, mortality, in general, is low compared to other groups of insects (Armengol et al., 2006; Gobatto et al., 2010). In the present study, 6.7% of the tested strains showed pathogenic activity against larvae of the three species, confirming the low occurrence of the mosquito-specific strains.

These studies carried out in Brazil with native strains of *Bt* active against mosquito larvae also showed low occurrence of these strains, rate below 2% of *Bt* active against mosquitoes (Dias et al., 2002; Praça et al. 2004; Ootani et al., 2011). In Saudi Arabia, 33.8% of the native strains isolated from distinct parts in that country showing pathogenicity for *Anopheles gambiae*, an important vector of African malaria (El-kersh et al., 2016).

Studies performed on Amazon soil showed similar rates to that found in the present study, 8.7% and 2% of strains were active against *Ae. aegypti*, Pereira et al., 2013 and Soares-da-Silva et al., 2015, respectively.

The variation in the number of native strains of *Bt* with larvicidal activity against mosquitoes observed for the different biomes can be explained by the different profiles of the insecticidal toxin-producing *cry* and *cyt* genes (Bravo et al., 1998; Armengol et al., 2006; Abulreesh et al., 2012; Reyaz et al., 2017).

In the isolates used in the present study, the variation of the gene profile of naturally occurring strains active against mosquitoes showed different combinations of the genes encoding insecticidal proteins (Bravo et al., 1998; Ibarra et al., 2003; Jouzani et al., 2008; González et al., 2011; El-kersh et al., 2016). Gene profile variation was also observed in *Bt* isolates native to Colombia in a study of selection of strains in *C. quinquefasciatus* and Lepidopteran larvae (Armengol et al., 2006).

The Cerrado biome showed the largest number of strains with combinations of mosquito-specific toxin-encoding genes, including *cry4*, *cry11*, *cry10*, *cyt1*, and *cyt2*, similar to the standard strain, and the only Caatinga isolate with larvicidal activity also has the same *Bti* genes. On the other hand, this gene profile was not observed for the Amazon strains.

The high frequency of mosquito-specific *cry* genes presents in 97.2% of isolates with larvicidal activity demonstrates the importance of this class of genes in the pathogenicity of *Bt* for this insect group. Among the mosquito-active *cry* genes described in the literature, the genes of the *cry4* and *cry11* stand out due to their larvicidal potential. In the present study, it was found that the *cry4Aa* and *cry4Ba* genes were the most frequent, presents in more than half (59.4%) of the strains. Higher frequency of *cry4Ba* genes in isolates with larvicidal activity against *Ae. aegypti* (Costa et al., 2010; Campanini et al., 2012).

In the present study, the frequency of *cyt* genes was lower than that of *cry*, the *cyt1Aa* gene was the most frequent. The presence of this gene is often detected in strains active against mosquito larvae (Costa et al., 2010; El-kersh et al., 2016).

This gene plays a key role in the activity of *Bt* against mosquitoes, as the Cyt1Aa proteins act directly in the insertion of the Cry toxins into the intestinal epithelium of the larvae, which can increase the toxicity of the strains where they are found (Pérez et al., 2005; Elleuch et al., 2015b). The toxin *cyt1Aa* may hinder selection by mosquito populations for resistance (Pérez et al., 2005).

The synergism between Cry and Cyt proteins presents greater toxicity than the use of Cry proteins alone or the combination between two or more Cry (Crickmore et al., 1995; Xu et al., 2014; Elleuch et al., 2015b;). In the present study, the presence of the combination of *cry/cyt* genes was observed in 78% of isolates with pathogenic activity, and the results showed that the most toxic strains obtained in this study contain different combinations of *cry* and *cyt* genes.

The bioassays with *Ae. aegypti* help relate the toxicity information of each strain to the molecular identification of the genes that may be directly involved in the larvicidal activity in mosquitoes, this is the culicid species with the highest number of toxins with larvicidal activity already described (Frankenhuyzen, 2009; 2013)

In the present study, two strains (BtMA-690 and BtMA-1114) were found to have similar toxicity to the standard strain *Bti*-T4001, with equal LC₅₀ values in at least one of the three mortality evaluations.

Notably, the two isolates with the highest toxicity were obtained from different substrates BtMA-690 from a soil sample and BtMA-1114 from Coleoptera insects- both collected in a Cerrado area. These data are important for obtaining the diversity of toxic strains.

Considering the gene profile of the most toxic strains, all genes present in *Bti* were detected in BtMA-690, whereas BtMA-1114 presented positive amplification for the genes *cry4*, *cry11*, *cry10*, *cyt1*, and *cyt2*, but did not show amplification for the *cry11Ba* and *cyt1Ab* genes; in addition, the *cry32* gene was also identified in this strain.

Cry32 insecticidal proteins have three different genes *cry32Ba*, *cry32Ca*, and *cry32Da* encoding toxins active against *Ae. aegypti* (Frankenhuyzen, 2009). The presence of the *cry32* gene is an indication that for the BtMA-1114 strain, indicate the diversity of the gene profile of the pathogenic strains for mosquitoes obtained in this study.

Several studies show the variation of the gene profile and toxicity of *Bt* González et al. (2011), while studying strains native to Cuba, observed that for three of these, the LC₅₀ values were better than that of the standard strain, and two strains contained the same gene profile as *Bti*, whereas the other strain showed different plasmid and protein profiles. This was also observed in two strains—BLB355 from Portugal and BLB196 from Saudi Arabia—that presented larvicidal activity against *Ae. aegypti*, but the presence of *Bti* genes was not detected in these strains (Elleuch et al., 2015a).

On the other hand, other studies have reported that strains with a *Bti*-like gene profile are the most effective (Costa et al., 2010; Santos et al., 2012). In the present study, the BtMA-690 isolate presented a gene profile and a toxicity similar to those of the standard strain; the same profile was detected in seven other strains, but for those, the insecticidal activity was lower than that of the standard.

However, despite the BtMA-679 and BtMA-687 strains not showing the same degree of toxicity as *Bti*, the genes present in the standard strain, as well as the *cry32* gene, were found in these strains. Thus, as with BtMA-1114, these strains are promising for preventing the emergence of resistance to the combination of *Bti* Cry/Cyt toxins, as the use of new strains

with gene profiles different from those of the strains already being used is a way to avoid selection of resistant mosquito populations (Peralta and Palma, 2017).

In addition to the combination of the *cry/cyt* genes found in the strains of this study, the presence of the chitinase gene was also observed in 35% of the strains. The presence of the insecticidal proteins Cry/Cyt combined with chitinase contributes to the overall toxicity of the strains because chitinases have the potential to destroy the peritrophic matrix of larvae, thus facilitating the contact between δ -endotoxins and their receptors in the intestinal epithelium (Sampson and Gooday, 1998; Juárez-Hernández et al., 2015). The presence of these toxins in strains active against mosquitos was also described in other Brazilian strains (Costa et al., 2010).

The present study provides evidence of the diversity the *Bt* with activity against larvae of *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, and *An. darlingi* isolated from soils and insects different biomes Brazilians. The Cerrado biome showed more promise for obtaining strains with higher toxicity for mosquitoes (BtMA-1114 and BtMA-690). The data are promising for control mosquitoes of medical importance, since *Bt* is an effective component in the control of these insects, which are currently considered a public health problem worldwide.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

To teachers Manoel Victor Franco Lemos and Janete Aparecida Desidério, Departamento de Biologia Aplicada á Agropecuária, UNESP/JABOTICABAL. To Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão) Financial support for conducting the research.

5. References

- Abulreesh, H.H., Osman, G.L.E.H., Assaeedi, A.S.A., 2012. Characterization of insecticidal genes of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from arid environments. *Indian. J. Microbiology.* 52, 500-503.
- Alves, S.B., Moraes, S. A., 1998. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.), *Controle microbiano de insetos.* FEALQ, Piracicaba, p.765-778.
- Armengol, G., Escobar, M.C., Maldonado, M.E., Orduz, S., 2006. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *J. of Applied. Microbiology.* 102, 77-88.
- Assaeedi, A.S.A., Osman, G.E.H., Abulreesh, H.H., 2011. The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments. *Australian J. of Crop. Sc.* 5, 1185-1190.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. *BioEstat versão 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil.
- Ben-Dov, E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins.* 6, 1222-1243.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS), 2017a. Boletim da febre amarela 2017. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/27663-ministerio-da-saude-atualiza-casos-notificados-de-febre-amarela-no-pais-20022017>.
- Bravo, A., Gill, S.S., Sobéron, M., 2007. Mode de action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49,423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Bioc. and Mol. Biology.* 41, 423-431.

- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Pena, G., Nuñez-Valdez, M.E., Soberón, M., Quintero, R., 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied. Envir. Microbiology.* 64, 4965-4972.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS), 2016. Situação Epidemiológica da filariose linfática no Brasil. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/11/2015-039---Filariose-vers--ofinal.pdf>;
- Berhnard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellia, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H.D., 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. *J. Inverteb. Pathol.* 70, 59-68.
- Campanini, E.B., Davolos, C.C., Alves, E.C.C., Lemos, M.V.F., 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific *cry* genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Braz. J. Biology.* 72, 243-247.
- Cánton, P.E., Cancino-Rodezno, A., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2015. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *BMC Genomics.* 16, 1042pp.
- Costa, J.R.V., Rossi, J.R., Marucci, S.C., Alves, E.C.C., Volpe, H.X.L., Ferraudó, A.S., Lemos, V.F.M., Desidério, J.A., 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). *Neotrop. Entomol.* 39,757-766.
- Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A., Ellar, D.J., 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Micro. Letters.* 131, 249-254.

- Crickmore, N., 2017. Full list of delta-endotoxins <http://www.btnomenclature.info/>.
- Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H., Ferré, J. 2017. Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria. *Toxins*, 9, 139-158.
- Dias, D.G.S., Silva, S.F., Martins, E.S., Soares, C.M.S., Falcão, M., Gomes, A.C.M.M., Praça, L.B., Dias, J.M.C.S., Monerrat, R.G., 2002. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. *Bol. Pesqui. Des.* 1676 – 1340.
- Ebi, K. L., Nealon, J., 2016. Dengue in a changing climate. *Envir. Research.* 151, 115–123.
- Elleuch, J., Tounsi, S., Hassen, N.B.B., Lacoix, M.N., Chandre, F., Jaoua, S., Zghal, R.Z., 2015a. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). *J. of Invert. Pathol.* 124, 90–97.
- Elleuch, J., Jaoua, S., Darriet, F., Chandre, F., Tounsi, S., Zghal, R. Z. 2015b. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 104, 83-90.
- El-kersh, T.A., Ahmed, A.M., Al-sheikh, Y.A., Tripet, F., Ibrahim, M.S., Metwalli, A.A.M., 2016. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). *Parasit Vectors.* 9, 647.
- Fatoreto, J.C., Sena, J.A. D., Barreto, M.R., Lemos, M.LV.F., Boiça Junior, A.L., 2007. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 36, 737-745.

- Ferreira-de-Brito, A., Ribeiro, I.P., Miranda, R.M., Fernandes, R.S., Campos, S.S., Silva, K.A.B., Castro, M.G., Bonaldo, M.C., Brasil, P., Lourenço-de-Oliveira, C., 2016. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 111, 655-658.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University, London.
- Forattini, O.P., 2002. Culicidologia Médica. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2002).
- Frankenhuyzen, K.V., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. J. of Invert. Pathol. 101, 1-16.
- Frankenhuyzen, K.V., 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. J. of Invert. Pathol. 114, 76–85.
- Gobatto, V., Giani, S.G., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Specht, A., Barros, N.M., 2010. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: 83 Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Braz. J. Biol. 70, 1039-1046.
- González, A., Díaz, R., Diaz, M., Borrero, Y., Bruzón, R.Y., Carreras, B., Gato, R., 2011. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. Rev. Biol. Trop. 59, 1007-1016.
- Hernandez, C.S., Andrew, R., Bel, Y., Ferré, J., 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato growing areas in Bolivia. J. of Invert. Pathol. 88, 8-16.
- Honório, N.A., Câmara, D.C.P., Calvet, G.A., Brasil, P., 2015. Chikungunya: Uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. Cad. Saúde. Pública. 31, 906-908.
- Ibarra, J.E., Del Rincón, C., Ordúz, S., Noiega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., Oliveira, C.M.F., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Sánchez, J., Pena, G., Bravo, A., 2003.

Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Envir. Microbiology*. 69, 5269-5274.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2017.
<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?coduf=21>.

Jouzani, G.S., Abad, A. P., Seifinejade, A., Marzban, R., Kariman, K., Maleki, B., 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J. of Ind. Microbiol. and Biotech*. 35, 83-94.

Juárez-Hernández, E. O., Casados-Vázquez, L. E., Rincón-Castro, M. C., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D. K., Barboza-Corona, J. E. 2015. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* producing endochitinase ChiA74 Δ sp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. *Journal of applied microbiology*, 119, 1692-1699.

Jung, Y.C., Kim, S.U., Côte, J.-C., Lecadet, M.-M., Chung, Y. S., Bok, S. H., 1998. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. *higo* strain isolated from rice bran in Korea. *J. of Invert. Pathol*. 71, 95-96.

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. of Invert. Pathol*. 132, 1-41.

Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Cordel, V., David, P., Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neg Trop. Diseases*, 11, 1-20.

Lin, Y., Xiong, G., 2004. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. *Biotechnol Lett*. 26, 635-639.

- LeOra Software Company (2003) PoloPlus: Probit and Logit Analysis. User's Guide, Version 2.0. LeOra Software Company, Petaluma, CA. 39 pp
- Ootani, M.A., Ramos, A.C.C., Azevedo, E.B., Garcia, B.O., Santos, S.F., Aguiar, R.W. S., 2011. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linnaeus, (Diptera: Culicidae). J. Biotec. Biodivers. 2, 37-43.
- Peralta, C., Palma, L., 2017. Is the Insect World Overcoming the Efficacy of *Bacillus thuringiensis*?. Toxins. 9, 1-5.
- Pereira, E., Teles, B., Martins, E., Praça, L., Santos, A., Ramos, F., Berry, C., Monnerat, R., 2013. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner strains to larvae of Simuliidae (Insecta: Diptera). Bt Research. 4, 8-13.
- Pérez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. Pnas, 102, 18303-18308.
- Pinto, L.M.N., Azambuja, A.O., Diehl, E., Fiuza, L.M., 2003. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). Braz. J. Biol. 63, 301-306.
- Polanczyk, R.A., Rogério, F.P., Fiuza, L.M., 2004. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Bras. Agrociência. 10, 209-214.
- Praça, L.B., Batista, A.C., Martins, E.S., Siqueira, C.B., Dias, D.G.S., Gomes, A.C.M.M., Falcão, R., Monnerat, R. G., 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesq. Agropec. Brasileira. 39, 11-16.
- Rebollo, M.P., Bockarie, M.J., 2017. Can Lymphatic Filariasis Be Eliminated by 2020?. Trends Parasitol. 33, 83-92.

- Reyaz, A. L., Gunapriya, L., Arulselvi, P. I. 2017. Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. *Biotech*, 7, 143-153.
- Sampson, M.N., Gooday, G.W., 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*. 144, 2189-2194.
- Santos, F.P., Lopes, J., Vilas-Bôas, G.T., Zequi, J.A.C., 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Trop*. 122, 64-70.
- Seixas, G., Grigoraki, L., Weetman, D., Vicente, J.L., Silva, A.C., Pinto, J., Vontas, J., Sousa, C.A. 2017. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Neg Trop. Diseases*. doi.org/10.1371/journal.pntd.0005799.
- Silva, S.F., Dias, J.M.C., Monnerat, R.G., 2002. Isolamento, Identificação e Caracterização Entomopatogênica de Bacilos de Diferentes Regiões do Brasil. 70, 1-4.
- Silva, M. C., Siqueira, H. A., Marques, E. J., Silva, L. M., Barros, R., Lima Filho, J. V., Silva, S. M. 2012. *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol science and technology*, 22, 583-599.
- Siqueira, A.M., Quique Bassat, Q., Rodovalho, S., Lacerda, M.V. G., 2017. Raising the red flag for malaria elimination and integrated fever surveillance in the Brazilian amazon. *Comment*, 5.
- Soares-da-Silva, J., Pinheiro, V.C.S., Litaiff-Abreu, E., Polanzyk, R.A., Tadei, W.P., 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. de Entomol*. 59.

- Stalinski, R., Laporte, F., Tetreau, G., Després, L. 2016. Receptors are affected by selection with each *Bacillus thuringiensis israelensis* Cry toxin but not with the full *Bti* mixture in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*.44, 218-227.
- Tadei, W. P., Rodrigues, I. B., Rafael, M. S. Sampaio, R. T. M., Mesquita, H. G., Pinheiro, V. C. S., Zequi, J. A. C., Roque, R. A., Santos, J. M. M. 2017. Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. *Hydrobiologia*. 789, 179–196.
- Vidal-Quist, J.C., P.; Castañera, J., González-Cabrera., 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitits capitata*. *J. Microb. and Biotech*. 19, 749–759.
- WHO - World Health Organization, 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- WHO - World Health Organization, 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. UNDP/World Bank/WHO. Special Programme For Research and Training in Tropical Diseases, Geneva.
- WHO - World Health Organization, 2017. Draft global vector control response 2017-2030.
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., Sun, M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6, 2732-2770.
- Yousten, A.A., 1984. *Bacillus sphaericus* microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide, New York. *Advances. Biotech. Proc*. 3, 315–343.
- Zhang, Q., Hua, G., & Adang, M. J. 2016. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect science*. doi:10.1111/1744-7917.12401.

CAPÍTULO II

Soares-da-Silva, J., Pinheiro, V.C.S., Polanczyk, R.A., Carvalho-Zilse, G.A., Tadei, W.P. 2017. Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner com patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae). Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*

Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner com patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae)

Joelma Soares-da-Silva ^{a,b*}; Mateus Nunes ^b; Thiago Ferreira de Lima ^b; Valéria C.S. Pinheiro ^c; Ricardo A. Polanczyk ^d; Gislene A. C. Zilse ^e; Wanderli P. Tadei ^b.

^a Curso Ciências Naturais, Campus VII, Universidade Federal do Maranhão, Avenida Dr. José Anselmo, 2008, São Sebastião, Codó, Maranhão, 65400-000, Brasil.

^b Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

^c Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Química e Biologia, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias, Maranhão, 65604-380, Brasil.

^d Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Paulo Donato Castellane s/n. Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brasil

^e Grupo de Pesquisas em Abelhas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

*autor correspondente: Joelma Soares-da-Silva, Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil. Email address: joelmasoares12@gmail.com

RESUMO

Bacillus thuringiensis Berliner 1911 é a bactéria mais utilizada como inseticida biológico em todo mundo, e possui elevada eficácia contra importantes mosquitos transmissores de agente patogênicos ao homem. No entanto, não há estudos sobre a seleção de linhagens de *B. thuringiensis* brasileiras com ação em larvas de *Anopheles darlingi* Root, 1926, o principal transmissor dos plasmódios da malária humana na região amazônica. O presente estudo buscou selecionar linhagens nativas de *B. thuringiensis* obtidas de amostras de solo de três biomas brasileiros, com patogenicidade para larvas de *An. darlingi* em condições de laboratório. Foram utilizadas 15 linhagens de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Bacilos Entomopatogênico do Maranhão, selecionadas por apresentarem elevada patogenicidade contra larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1962. Foi realizado bioensaio seletivo com as 15 linhagens, destas treze (88,2%) demonstraram atividade larvicida para *An. darlingi*, as quais foram utilizadas nos bioensaios quantitativos. Considerando as observações nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, verificou-se que as linhagens de maior toxicidade foram BtMA-689 e BtMA-690 para quais foram obtidos os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ nos três intervalos de leitura. Contudo, seis linhagens (BtMA-681, BtMA-1114, BtMA-687, BtMA-690, BtMA-703 e BtMA-750), apresentaram mortalidade semelhante a cepa padrão Bti T04 001 para as quais não foram verificadas diferenças estatísticas. As linhagens de *B. thuringiensis* obtidas no presente estudo apresentaram potencial para o controle de *An. darlingi* em condição de laboratório.

Palavras chaves: Malária, Controle Vetorial, Biolarvicida, Bacilos entomopatogênico.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis Berliner 1911 is the most used bacterium as a biological insecticide worldwide, and has a high efficacy against important mosquitoes transmitters pathogens to humans. However, there are no studies on the selection of Brazilian strains of *B. thuringiensis* with action on *Anopheles darlingi* Root, 1926, larvae, the main transmitter of human malaria plasmodia in the Amazon region. The present study aimed to select native strains of *B. thuringiensis* obtained from soil samples from three Brazilian biomes, with pathogenicity to *An. darlingi* larvae under laboratory conditions. Fifteen strains of *B. thuringiensis* belonging to the Entomopathogenic Bacillus Bank of Maranhão were selected, because they showed high pathogenicity against *Aedes aegypti* Linnaeus 1962 larvae. A selective bioassay was performed with the 15 strains, of which thirteen (88.2%) showed larvicidal activity for *An. darlingi*, which were used in quantitative bioassays. Considering the observations at the 24, 48 and 72 hour intervals, it was found that the most toxic strains were BtMA-689 and BtMA-690 for which the lowest values of CL₅₀ and CL₉₀ were obtained in the three reading ranges. However, six lines (BtMA-681, BtMA-1114, BtMA-687, BtMA-690, BtMA-703 and BtMA-750) showed similar mortality to Bti T04 001 standard strain for which no statistical differences were found. The *B. thuringiensis* strains obtained in the present study had potential for *An. darlingi* control in laboratory conditions.

Keywords: Malaria, Vector Control, Biolarvicide, Entomopathogenic bacilli,

1. INTRODUÇÃO

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 pertence à família Culicidae da subfamília Anophelinae com distribuição desde o México, e estendendo-se por praticamente toda a América do Sul (Hiwat e Bretas 2011; WRBU 2017). Este mosquito é considerado o principal vetor dos agentes etiológicos da malária na região neotropical (Hiwat e Bretas 2011; Altamiranda-Saavedra *et al.* 2017; WRBU 2017).

O Brasil é responsável por mais de 40% dos registros de Malária da América latina e do Caribe (Ferreira e Castro 2016; Brasil 2017; Siqueira *et al.* 2017). Nesse país, *An. darlingi*, é encontrado especialmente na região Amazônica, onde há maior incidência da doença, com registro de cerca de 99% dos casos (Deane *et al.* 1948; Brasil 2017; Tadei *et al.* 2017), e onde possui prevalência em relação aos demais anofelinos (Martins-Campos *et al.* 2012; Barbosa *et al.* 2016; Rufalco-Moutinho *et al.* 2016).

Anopheles darlingi é holometábolo, com estágios imaturos encontrados em coleções hídricas, geralmente próximo das habitações humanas (Rufalco-Mountinho *et al.* 2016). As fêmeas são hematófagas, têm preferência em realizar repasto sanguíneo no homem e são altamente antropófilas e endófagas, pois adentram nas residências para se alimentar (Tadei *et al.* 1998; Oliveira *et al.* 2012; Tadei *et al.* 2017).

A transmissão da malária ocorre pela picada de fêmeas de mosquitos infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que as espécies *Plasmodium vivax* (Grassi e Feletti, 1980) e *Plasmodium falciparum* Welch, 1987, são os principais agentes etiológicos da malária no Brasil. Há registro de transmissão também por *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, 1889, geralmente essa espécie é detectada em baixa frequência e por meio da utilização de técnicas moleculares que são mais sensíveis (Consoli e Oliveira 1994; Forattini 2002; Nussenzweig 2011; Wassmer e Grau, 2017).

O controle dos vetores tem sido uma das principais ações para o programa de eliminação da malária no mundo (WHO 2011). No Brasil, o combate ao mosquito teve início no ano de 1905, com histórico de aplicações de inseticidas no intradomicílio, ou pulverização residual interna, do inglês *Indoor Residual Spraying* (IRS), que foram realizadas em diferentes regiões do país onde havia registro da doença (Oliveira-Ferreira *et al.* 2010; Ferreira e Castro 2016). Essas medidas resultaram no sucesso da redução da malária no país e posteriormente, também foram implementadas em outros países (Pluess *et al.* 2010; Hamel *et al.* 2011; West *et al.* 2015; Tukei *et al.* 2017).

A utilização dos inseticidas químicos, como o DDT (diclorodifeniltricloroetano), teve um papel significativo para eliminação da malária nas demais regiões brasileiras (Ferreira e Castro 2017). Posteriormente foi incorporado medidas de controle das formas imaturas, com a utilização de inseticidas sintéticos como os piretróides, os quais não são seletivos (WHO 2017).

Ao longo de vários anos os produtos químicos selecionaram populações de mosquitos resistentes. Atualmente uma avaliação global do nível de suscetibilidade de populações de anofelinos a inseticidas químicos, indicou a ocorrência de dois principais mecanismos de resistências, a metabólica e resistência sítio local alvo (WHO 2011).

Em relação a *An. darlingi*, já foi detectada resistência a inseticidas químicos em populações de países como Colômbia e Venezuela (Silva *et al.* 2016). Em relação as populações brasileiras, foi constatado perda de suscetibilidade em algumas localidades do estado do Amazonas, para os inseticidas Deltametrina, Cipermetrina e Alfacipermetrina (Almeida, 2017), e alterações no canal de sódio e potássio em condição de laboratório (Silva *et al.* 2014; Galardo *et al.* 2015). Contudo, são necessários mais estudos para elucidar o nível de suscetibilidade dessa espécie aos inseticidas químicos empregados atualmente nesta região.

Levando-se em consideração ao que ocorreu em populações de anofelinos em outras regiões do mundo, para as quais já é comprovado mutações *Kdr* (*Knock-dawn*), que levam resistência a esses inseticidas (Cáceres *et al.* 2011; Brooke *et al.* 2015; Silva *et al.* 2016). É importante a utilização de diferentes princípios ativos em rotatividade, no sentido de evitar a resistência.

Além disso, há preocupação de expansão do *An. darlingi* para áreas consideradas controladas para a transmissão da doença, uma vez que, esse mosquito apresenta capacidade de se adaptar a locais modificados pelo homem dentro da floresta. Essa situação é realidade na Amazônia brasileira, devido as mudanças ambientais ocasionadas pelas atividades antrópicas (Rodrigues *et al.* 2017). Deve-se considerar ainda que apesar da taxa de infecção natural dessa espécie ser frequentemente baixa, *An. darlingi* é eficiente em transmitir os agentes etiológicos da malária, mesmo em locais onde encontra-se em baixa densidade e, isso devido as suas altas taxas de picadas e boa suscetibilidade para a infecção por *Plasmodium* (Tadei e Dutary-Thatcher 2000; Hiwat e Bretas 2011).

Diante desse contexto, e apesar dos avanços consideráveis no controle da malária no mundo nos últimos anos, com significativa redução dos casos da doença, é necessária a continuidade de medidas de controle vetoriais para garantir a sequência da redução de casos e uma possível eliminação da doença (Recht *et al.* 2017).

Estratégias de redução larval é parte das ferramentas do controle integrado dos vetores. Uma vez controlado as larvas, é possível reduzir a densidade dos adultos e circulação da doença (Tusting *et al.* 2015).

Considerando a dinâmica dos habitats larvais de anofelinos na Amazônia, como a presença de tanques de piscicultura, lagos naturais, e formação de lagos em decorrência de assentamento rural, entre outros (Reis *et al.* 2015), a aplicação de larvicidas torna-se uma importante ferramenta para garantir a sustentabilidade da redução da transmissão da doença. É recomendado a utilização de métodos ecologicamente viáveis para ser aplicado no controle de anofelinos, principalmente considerando que seus criadouros são naturais, e abrigam uma diversidade de organismos (Lacey *et al.* 2015; Benelli e Mehlhorn 2016).

Atualmente, alternativas como a utilização de agentes biológicos para o controle de vetores vem ganhando importância em diversos programas de combate de espécies de mosquitos transmissores de patógenos e outros insetos de importância econômica no mundo (Marina *et al.* 2014; Silva *et al.* 2016; Saldanã *et al.* 2017).

Bacillus thuringiensis Berliner 1911 (Eubacteriales: Bacillaceae) é a bactéria mais utilizada na fabricação de inseticidas biológicos para o controle de mosquitos. Sua eficácia é devido a produção de inclusões cristalinas durante a esporulação, que apresentam proteínas tóxicas a insetos de diferentes ordens, denominada toxinas Cry (crystal) e Cyt (cytolítica) (Höfte e Whiteley 1989; Alves 1998; Bradran *et al.* 2016).

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) é uma importante linhagem com ação específica para mosquitos. A toxicidade de Bti é devido a produção de duas famílias de proteínas inseticidas, principalmente (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa) (Bravo *et al.* 2011; Ben-Dov 2014).

Essa bactéria tornou-se um componente importante no controle integrado de mosquitos vetores, amplamente utilizadas para o controle de mosquitos e borrachudos (Habib e Andrade 1998). A utilização de *B. thuringiensis israelensis* têm sido um sucesso por mais de trinta anos no controle de mosquitos do gênero *Aedes* em diferentes regiões do mundo, o que tem estimulado a busca por novos isolados capazes de controlar outros insetos de importância para a saúde pública (Costa *et al.* 2010; Soares-da-Silva *et al.* 2015; El-Kersh *et al.* 2016).

Para o controle de mosquitos do gênero *Anopheles*, seleção de linhagens de *B. thuringiensis* foram realizadas em outros países e comprovaram toxicidade para importantes vetores da malária, como para *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (s.l.) (El-kersh *et al.* 2016), *Anopheles stephensis* (Patil *et al.* 2012) e *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824 (Abdullah *et*

al. 2006). Além disso, as toxinas Cry e Cyt de *B. thuringiensis* tem sido usada por técnicas de engenharia genética, para atuarem em combinação em diferentes formulações com objetivo de ampliar o espectro de ação no controle de mosquitos, principalmente para suprimir a resistências aos inseticidas químicos pelos anofelinos (Ibrahim *et al.* 2016).

No controle de *An. darlingi* foram utilizados com sucesso dois agentes microbianos, *Lysinibacillus sphaericus* Neide (1904) e formulações a base *B. thuringiensis israelensis*, para o qual foram realizadas aplicações na cidade de Manaus e em São Gabriel da Cachoeira; ambas demonstraram resultados satisfatórios, com boa eficácia e especificidade (Rodrigues *et al.* 2008; Litaiff-Abreu *et al.* 2011).

Porém, até o momento não há estudos de seleção de linhagens de *B. thuringiensis* brasileiras para o controle dessa espécie. Considerando o potencial tóxico de *B. thuringiensis* para mosquitos e a necessidade de implementar métodos alternativos que sejam ecologicamente seguros para o controle de anofelinos, o presente estudo buscou selecionar linhagens nativas com patogenicidade em *An. darlingi* em condição de laboratório. A seleção de isolados, com atividade patogênica para *Ae. aegypti* e já caracterizadas por meio de técnicas moleculares, facilitaram os bioensaios para mosquitos do gênero *Anopheles*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizadas 15 isolados de *B. thuringiensis* nos bioensaios com larvas de *An. darlingi*, selecionadas por apresentarem elevada toxicidade contra larvas de *Ae. aegypti*, para as quais foi registrado índice de mortalidade de 100% em 24 horas de exposição. Todos os isolados utilizados foram caracterizados em estudos prévios por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), quanto à presença dos genes *cyt* e *cry* mosquito específicos (Vieira Neta, 2016, Lobo, 2015, Soares-da-Silva *et al.* 2017).

As linhagens foram obtidas a partir do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA), Coleção de linhagens de *B. thuringiensis* e espécies correlatas, pertencente ao Laboratório de Entomologia Médica (LABEM), situada na Universidade Estadual do Maranhão, na cidade de Caxias, MA. Quanto aos dados de isolamento, dois isolados foram obtidos do solo da Amazônia, 11 do Cerrado, um do solo da Caatinga e um isolado de insetos mortos, todas coletadas no estado do Maranhão (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Bacillus thuringiensis* utilizados em teste de patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi*, conforme origem do substrato de isolamento.

Bioma	Substrato	Município/MA	Latitude (S)	Longitude (W)
Amazônia/Solo				
BtMA- 37	Solo	Viana	03°13'12.3"S	045°08'88.7"W
BtMA-750	Solo	São J. de Ribamar	02°27'56.5"S	044°11'43.2"W
Cerrado/Solo				
BtMA-401	Solo	Colinas	06°04'53.5"S	044°23'10.6"W
BtMA-679	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-681	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-684	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-685	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-687	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-688	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-689	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-690	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-691	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
BtMA-694	Solo	Duque Barcelar	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W
Cerrado/Insetos				
BtMA-1114	Coleoptera	Mirador	-	-
Caatinga/Solo				
BtMA -703	Solo	Santa Quitéria	03°48'34.6"S	042°55'59.8"W

Fonte: Banco de Bacilos entomopatogênicos do Maranhão

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o seletivo, para avaliar a patogenicidade das linhagens de *B. thuringiensis* contra as larvas de *An. darlingi*; e o bioensaio quantitativo com as linhagens que mostraram mortalidade acima de 90% até 48 horas, com objetivo de determinar as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀. Os bioensaios foram realizados conforme recomendação do *Guidelines For Laboratory And Field Testing of Mosquito Larvicides*, com modificações (WHO 2005).

2.2 Coleta e criação de *Anopheles darlingi*.

Para obtenção de larvas de *An. darlingi* foram realizadas coletas de fêmeas adultas na área periférica da cidade de Manaus, AM. As coletas foram realizadas no peridomicílio em residências da zona leste da cidade, no Ramal do Brasileirinho (Cristo Vive 03°01'33.1"S 59°51'07.7"W). A realização das coletas ocorreu no período de 18h à 21h, pelo método de atração humana com proteção, procedimento devidamente autorizado (SISBIO/21264-3).

As fêmeas adultas de *An. darlingi* coletadas, foram acondicionados em copos parafinados de 1000 mL, com a abertura protegida com o tecido do tipo filó preso com liga de borracha (Figura 1A). Os mosquitos coletados foram transportados para o insetário de *An. darlingi* do Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde receberam alimentação sanguínea, por meio de repasto em hamster *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) (CEUA-026/2016) (Figura 1B). As fêmeas ingurgitadas foram colocadas individualmente para ovipor em copos plásticos, nos quais continha no fundo, algodão e papel filtro umedecido com água destilada. Os copos com as fêmeas foram acondicionados em isopor por quatro dias, após esse período, foi retirado para verificação da presença de ovos (Figura 1C) (Santos *et al.* 1981).

Os ovos obtidos foram identificados com a utilização de chaves específicas (Faran e Linthicum 1981 e Linthicum 1988). Os ovos identificados como da espécie *An. darlingi* foram colocados em bandejas de plásticos, com água e papel filtro na lateral, o que é necessário para aderência dos ovos (Figura 1D).

As larvas foram mantidas no insetário até atingirem o terceiro instar, para isso, três vezes por dia, as larvas foram alimentadas com as rações para peixe do tipo Tetramim® e Goldfish®, proporção 1:1, e foi realizada a troca de água, seguindo o protocolo de criação do Laboratório de Malária e Dengue. O insetário foi mantido sob condições controladas de temperatura, em torno 27 °C, umidade relativa de 70- 80 % e fotoperíodo de 12 h (Santos *et al.* 1981, Scarpassa e Tadei 1990). As larvas de terceiro instar foram separadas para realização de bioensaios.

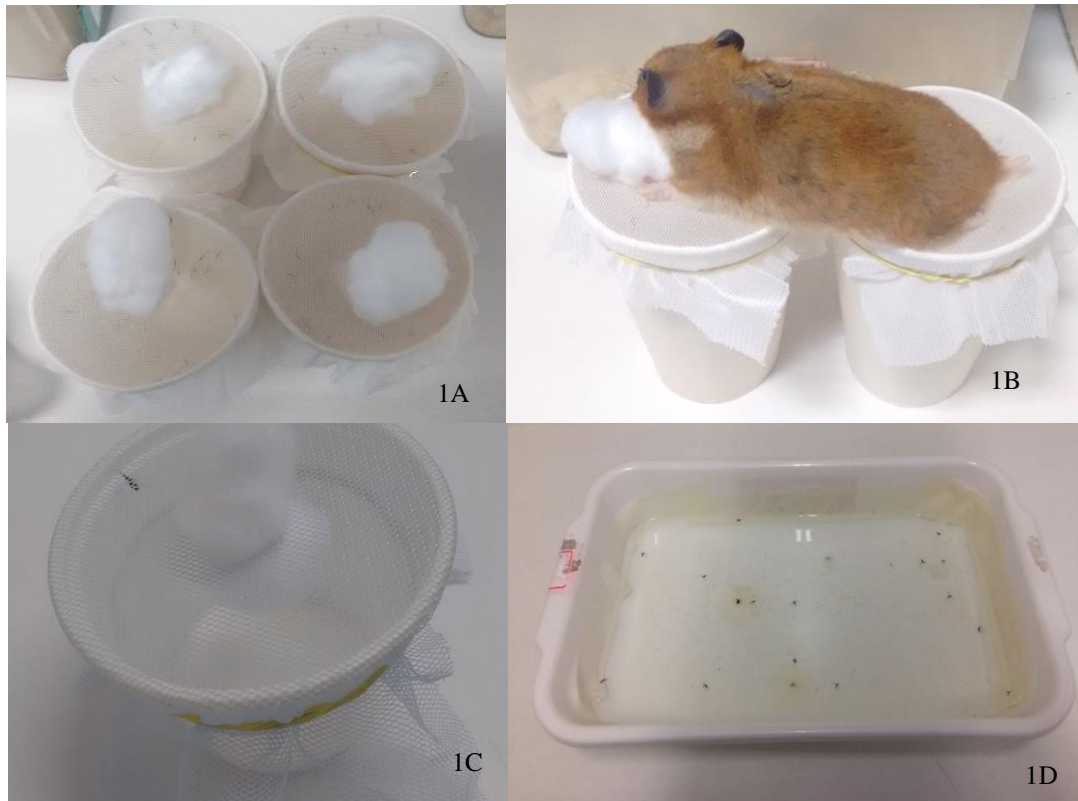


Figura 1. Criação de *Anopheles darlingi* em laboratório: 1A) fêmeas coletadas em campo acondicionadas em copos parafinados; 1B) repasto sanguíneo de fêmeas com utilização de hamster em laboratório; 1C) fêmea colocada individualmente em copo plástico para oviposição; 1D) Bandeja de plástico com água, contendo ovos para obtenção de larvas.

2.3 Bioensaios seletivo para larvas de *Anopheles darlingi*.

Os 15 isolados de *B. thuringiensis* foram testados contra larvas de *An. darlingi* por meio de bioensaios de patogenicidade. Os bioensaios foram realizados em triplicata, para isso, utilizou-se três copos plásticos com 10 mL de água destilada, 10 larvas de terceiro instar, e cada isolado foi testada na concentração final de 10 mg/L. Como controle negativo utilizou-se 10 larvas mantidas em copo plástico com água, mas, sem inoculação de bactéria e, para o controle positivo foi utilizada a linhagem padrão *B. thuringiensis israelensis* (Bti) cepa T04 001.

Os controles foram testados nas mesmas condições que o tratamento, e após a aplicação da bactéria foram realizadas leituras de mortalidade das larvas em intervalos de 24 e 48 horas.

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, em condições controladas, com temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de 80%, fotoperíodo de 12L:12D (WHO 2005). Os isolados para os quais o índice de mortalidade foi igual ou superior a 90% até 48 horas, foram selecionados para a realização de bioensaios quantitativos.

2.4 Bioensaios quantitativos

Nos bioensaios quantitativos, para cada linhagem foram inicialmente testadas oito concentrações 6,66; 3,33; 1,66; 0,83; 0,41; 0,20; 0,10 e 0,033 mg/L, a partir das quais foram estabelecidas mais concentrações de forma a obter mortalidade 90-100 e 5-15% para cada isolado estudado. Os bioensaios quantitativos foram realizados de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde, com modificações (WHO 2005).

Cada concentração foi testada em três repetições, em cada repetição foram utilizados cinco copos plásticos com 150 mL de volume final de água destilada, 10 larvas de 3º instar, quantidade correspondente de cada concentração dos isolados de *B. thuringiensis* e alimento para larvas, que consistiu de ração para peixe do tipo Tetramim® e Goldfish®, proporção 1:1. Para cada bioensaio foi acrescentado um grupo controle negativo, que consistiu em um copo com larvas, alimento, sem a inoculação da bactéria.

As leituras de mortalidade foram realizadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas após aplicação do bacilo, com contagem de larvas vivas e mortas.

Como controle positivo foi utilizado a cepa padrão de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* T04 001, cedida pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/ UNESP Jaboticabal. O bioensaio com essa cepa foi realizado nas mesmas condições citadas para os isolados, conduzidos em condições controladas, conforme descritas no bioensaio seletivo (WHO 2005).

2.5 Obtenção das Concentrações Letais (CL₅₀) e (CL₉₀) e Análises dos dados

Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios de toxicidade foram submetidos à análise de Probit $p < 0,05$ (Finney, 1971). Os cálculos das concentrações letais foram realizados com a utilização do programa estatístico POLO PLUS (LeOra Software 2003) para estimativas das CL₅₀ e CL₉₀.

A toxicidade dos isolados e da cepa padrão *B. thuringiensis israelensis* T04 001 foram comparadas pela Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), com a utilização do programa estatístico BioEstat versão 5.0 for Windows (Ayres *et al.* 2007).

3. RESULTADOS

3.1 Seleção de linhagens de *Bacillus thuringiensis* patogênicas para *Anopheles darlingi*.

Por meio dos bioensaios seletivos foi possível verificar que 13 (88,2%) isolados demonstraram atividade larvicida para *An. darlingi*. Destas, 10 (66,6%) mataram 100% das larvas em 24 horas de exposição, os demais isolados, apresentaram percentual de mortalidade maior que 60% em 24 horas, e 93,3% na leitura de 48 horas. Somente dois não apresentaram patogenicidade (Tabela 2).

Os isolados que possuem maior número de genes *cry* e *cyt* com ação específica para mosquitos, apresentaram maior percentual de mortalidade nos bioensaios seletivos. Verificou-se que 10 isolados ocasionaram 100% de mortalidade das larvas em apenas 24 horas de exposição e todos tinham combinação de seis ou mais genes das duas classes (*cry* e *cyt*), dados semelhantes ao tratamento com a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Por outro lado, para os dois isolados que não causaram mortalidade, verificou-se que BtMA-401 não amplificou para nenhum dos genes analisados, e para BtMA-37, foi obtido amplificação somente para o gene *cy4Aa* (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *Bacillus thuringiensis* com atividade larvicida para *Anopheles darlingi* nos intervalos de leitura de 24 e 48 horas, e respectivos conteúdos gênicos.

Bioma	Mortalidade (%)		Genes <i>cry</i>	Genes <i>cyt</i>
	24 h	48 h		
Amazônia				
BtMA- 37	0	6,6	<i>cy4Aa</i>	-
BtMA-750 ¹	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa</i>
Cerrado /solo				
BtMA-401 ²	0	6,6	-	-
BtMA-679	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-681	100	-	<i>cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa</i>	<i>cyt1Aa; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-684	63,3	93,3	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-685	86,6	93,3	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-687	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-688	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-689	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-690	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-691	100	-	<i>cry4Ba; cry10Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
BtMA-694	86,6	93,3	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
Cerrado/Insetos				
BtMA-1114	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
Caatinga				
BtMA -703	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>
Bti T04 001	100	-	<i>cry4Aa; cry4Ba; cry10Aa; cry11Aa e cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa; cyt1Ab; cyt2Aa; cyt2Ba</i>

Fonte = ¹Vieira-Neta, 2016, ²Lobo, 2015, Soares-da-Silva *et al.* 2017.

3.2 Estimativa da concentração letal (CL₅₀) e (CL₉₀).

Os bioensaios de toxicidade foram realizados com as 13 linhagens de *B. thuringiensis* que apresentaram mortalidade maior a 90% após leitura de 48 horas.

Foi verificado maior mortalidade para as larvas a partir da leitura de 48 horas. Constatou-se que houve diferença estatística significativa na mortalidade entre a leitura de 24 horas com os outros dois tempos de observação (Tukey, $p = 0,0031$), contudo, não houve diferença na mortalidade entre as leituras de 48 e 72 horas (Tukey, $p > 0,05$).

Considerando os valores das CL_{50} nos três intervalos de observação, verificou-se que as linhagens de maior toxicidade foram BtMA-689 e BtMA-690 para quais foram obtidos os menores valores de CL_{50} e CL_{90} em dois intervalos de observação. As linhagens BtMA-681, BtMA-1114, BtMA-687, BtMA-690, BtMA-703 e BtMA-750, apresentaram mortalidade semelhante a cepa padrão Bti T04 001, porém foi verificada diferença estatística no tratamento das linhagens e da cepa padrão em pelo menos um intervalo (48 horas) (Tabela 3) (Tukey, $p = 0,0021$).

Na avaliação de 24 horas, BtMA-681, BtMA-687, BtMA-703, BtMA-750 e BtMA-1114 apresentaram resultados muito semelhantes ao obtido à linhagem padrão, com valores de CL_{50} de 0,017 mg/L, 0,021 mg/L, 0,126 mg/L, 0,049mg/L e 0,079 mg/L respectivamente, enquanto que para Bti foi 0,072 mg/L. Para CL_{90} foi verificado maior variação, contudo, não houve diferença estatística significativa entre essas linhagens para CL_{50} e CL_{90} nesse intervalo de observação (Tukey, $p > 0,05$).

Tomando como base os valores da leitura de 48 horas, verifica-se que BtMA-689 e BtMA-690 foram as linhagens mais tóxicas, para as quais obteve-se menores valores de CL_{50} (0,003 mg/L e 0,004 mg/L) e CL_{90} (0,030 mg/L e 0,014 mg/L), e baseado na estimativa da CL_{50} , verifica-se que essas linhagens foram cerca de 10 vezes mais tóxicas que Bti. Por outro lado, as linhagens BtMA-679, BtMA-681, BtMA-687, BtMA-703, BtMA-750 e BtMA-1114, mostraram resultados muito aproximados ao verificado para Bti (Tabela 3).

Após 72 horas, verifica-se que os resultados foram semelhantes, com BtMA-681, BtMA-689 e BtMA-690 como os menores valores de CL_{50} (0,006 mg/L, 0,002 mg/L e 0,003 mg/L, respectivamente) e CL_{90} (0,040mg/L, 0,009 mg/L e 0,012 mg/L, respectivamente), valores cerca de dez vezes menores que o obtido para a linhagem padrão, com CL_{50} (0,025 mg/L) e CL_{90} (0,195 mg/L) (Tabela 3).

Por outro lado, BtMA-685, BtMA-691 e BtMA-694 foram as linhagens com menor toxicidade, para as quais foram registrados os maiores valores de CL_{50} e CL_{90} , nos três intervalos de observação (Tabela 3). Para o controle negativo, o índice de mortalidade foi menor que 5% nos três períodos avaliados.

Tabela 3. CL₅₀ e CL₉₀ nos intervalos de 24, 48 e 72 horas para isolados de *Bacillus thuringiensis* com patogenicidade para larvas de *Anopheles darlingi*.

24 horas				
Isolados	CL ₅₀ (IC 95%) mg/L	CL ₉₀ (IC 95%) mg/L	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-679	0,206 (0,117-0,299)	2,083 (1,645-2,854)	1,276 (0,155)	2,9
BtMA-681	0,017 (0,014-0,020)	0,130 (0,094-0,208)	1,447 (0,145)	0,902
BtMA-684	-	-	-	-
BtMA-685	2,780 (2,083-3,920)	79,963 (40,553-206,466)	0,878 (0,079)	1,789
BtMA-687	0,211 (0,150-0,292)	1,289 (0,771-3,275)	1,630 (0,129)	5,024
BtMA-688	0,341 (0,179-0,594)	3,454 (1,724-11,383)	1,275 (0,083)	7,881
BtMA-689	1,039 (0,603-2,096)	12,541 (4,922-83,371)	1,185 (0,084)	8,104
BtMA-690	0,201 (0,094-0,372)	4,418 (1,754-29,269)	0,954 (0,078)	6,770
BtMA-691	0,246 (0,202-0,301)	0,931 (0,682-1,488)	2,219 (0,159)	3,210
BtMA-694	4,141 (1,518-18,023)	79,704 (18,212 - 51,443)	0,998 (0,091)	15,39
BtMA-703	0,126 (0,020-0,406)	1,519 (0,460-53,785)	1,187 (0,076)	27,383
BtMA -1114	0,079 (0,062-0,109)	0,665 (0,378- 1,593)	1,384 (0,157)	0,956
BtMA-750	0,049 (0,036-0,078)	0,363 (0,183- 1,362)	1,484 (0,144)	3,587
Bti	0,072 (0,020-0,254)	0,410 (0,145-24,631)	1,701 (0,092)	83,130
48 horas				
Isolados	CL ₅₀ (IC 95%) mg/L	CL ₉₀ (IC 95%) mg/L	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-679 ^b	0,068 (0,015-0,138)	0,528 (0,353-0,699)	1,443 (0,279)	1,466
BtMA-681 ^a	0,011 (0,008-0,013)	0,089 (0,066-0,139)	1,390 (0,152)	1,741
BtMA-684	-	-	-	-
BtMA-685	0,614 (0,288-1,549)	8,936 (2,770-418,713)	1,102 (0,100)	11,511
BtMA-687 ^{a,b}	0,071 (0,053-0,089)	0,730 (0,542 -1,108)	1,266 (0,127)	1,839
BtMA-688 ^{b,c}	0,113 (0,060-0,176)	0,508 (0,301-1,542)	1,966 (0,136)	12,837
BtMA-689	0,003 (0,006-0,012)	0,030 (0,009-3,759)	1,320 (0,084)	33,943
BtMA-690 ^{a,b}	0,004 (0,003-0,006)	0,014 (0,010-0,026)	2,494 (0,172)	7,835
BtMA-691 ^c	0,212 (0,168-0,265)	0,860 (0,608-1,494)	2,105 (0,155)	3,908
BtMA-694	0,890 (0,392- 1,563)	22,348 (9,865- 111,109)	0,916 (0,080)	5,449
BtMA-703 ^{a,b}	0,057 (0,023-0,110)	0,580 (0,275-2,192)	1,274 (0,084)	10,216
BtMA-1114 ^{a,b}	0,025 (0,019- 0,030)	0,338 (0,223-0,621)	1,128 (0,119)	1,961
BtMA-750 ^{a,b}	0,041 (0,0300-0,063)	0,320 (0,163-1,155)	1,442 (0,135)	3,748
Bti ^{a,b}	0,039 (0,029-0,054)	0,238 (0,140-0,602)	1,628 (0,144)	3,273
72 horas				
Isolado	CL ₅₀ (IC 95%) mg/L	CL ₉₀ (IC 95%) mg/L	Slope ±SE	χ ² (GL=3)
BtMA-679	0,030 (0,001- 0,096)	0,255 (0,063-0,413)	1,374 (0,394)	2,043

BtMA-681	0,006 (0,002-0,010)	0,040 (0,010-0,124)	1,605 (0,184)	6,4494
BtMA-684	-	-	-	-
BtMA-685	0,368 (0,141-0,795)	3,568 (1,363-96,215)	1,299 (0,106)	15,907
BtMA-687	0,048 (0,035-0,060)	0,345 (0,277-0,462)	1,490 (0,147)	0,860
BtMA-688	0,097 (0,019-0,249)	0,860 (0,412-3,054)	1,355 (0,092)	19,032
BtMA-689	0,002 (0,002-0,003)	0,009 (0,008-0,011)	2,380 (0,193)	2,480
BtMA-690	0,003 (0,002-0,005)	0,012 (0,0083-0,023)	2,251 (0,163)	7,7832
BtMA-691	0,188 (0,168-0,210)	0,665 (0,558-0,829)	2,338 (0,165)	1,070
BtMA-694	0,454 (0,323- 0,600)	7,597 (5,531- 11,370)	1,048 (0,086)	2,464
BtMA-703	0,035 (0,016-0,064)	0,412 (0,204-1,353)	1,199 (0,085)	7,0342
BtMA-1114	0,012 (0,005- 0,020)	1,415 (0,0807-0,4796)	1,207 (0,128)	4,8798
BtMA-750	0,030 (0,026-0,037)	0,227 (0,158-0,371)	0,148 (0,0131)	2,626
Bti	0,025 (0,016- 0,039)	0,195 (0,100-0,728)	1,427 (0,112)	6,5358

Legenda: CL₅₀ e CL₉₀= Concentração Letal; IC= Intervalo de confiança. GL=Graus de Liberdade, - =não estimada. *. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p>0,05).

4. DISCUSSÃO

O índice de linhagens de *B. thuringiensis* que causaram mortalidade nas larvas de *An. darlingi* por meio de bioensaios seletivos, evidenciam o potencial dos isolados obtidos nos três biomas estudados para o controle desse mosquito. É importante ressaltar que as linhagens que apresentaram 100% de mortalidade em 24 horas, exibiram atividade patogênica para ambas as espécies, *Ae. aegypti* (testes prévios) e *An. darlingi* demonstrando o potencial para o controle desses mosquitos.

A boa efetividade desses isolados nativos para o controle de mosquitos, é devido atuação em sinergismo das proteínas Cry e Cyt detectadas previamente por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase-PCR. Para os isolados ativos, foi verificada combinações distintas com três ou mais toxinas, sendo que juntas, já demonstraram serem efetivas para o controle de mosquitos do gênero *Anopheles* (El-Kersh *et al.* 2014; 2016), como também para outras espécies de mosquitos (Costa *et al.* 2010; Santos *et al.* 2012).

Analisando o perfil gênico das linhagens de *B. thuringiensis* obtidas no presente estudo que causaram mais de 90% de mortalidade até 48 horas de exposição, foi possível associar a presença de pelo menos seis genes entre *cry* e *cyt* em uma única linhagem. Oito linhagens apresentaram amplificação positiva para nove genes, dos quais cinco são *cry*

(*cry4Aa*; *cry4Ba*; *cry10Aa*; *cry11Aa* e *cry11Ba*) e quatro *cyt* (*cyt1Aa*; *cyt1Ab*; *cyt2Aa*; *cyt2Ba*), esse perfil é semelhante ao obtido para estirpe padrão, que também mostrou elevada patogenicidade para e *An. darlingi*, para qual foi obtido 100% de mortalidade em apenas 24 horas.

Isolados de *B. thuringiensis* obtidos de diferentes países da América Latina, também demonstraram resultado semelhantes ao verificado no presente trabalho, no qual, as linhagens que exibiram maior toxicidade para larvas *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *Ae. aegypti* e *An. albimanus*, apresentaram amplificação positiva para os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* (Ibarra *et al.* 2003).

Apesar de *B. thuringiensis* apresentar um amplo espectro de ação, em relação ao nível de patogenicidade para os três principais gêneros de mosquitos, até o momento, há maior número de toxinas Cry e Cyt com ação inseticida para larvas de *Ae. aegypti*. Em seguida para *Culex* spp, é em menor número, às toxinas com ação para mosquitos do gênero *Anopheles* spp. (Frankenhuyzen 2009; 2013).

Considerando a cepa *B. thuringiensis israelensis*, em termos gerais, a toxicidade de cada toxina isolada é bastante diferenciada para cada gênero de mosquito. Em relação as toxinas Cry, sabe-se que Cry4Aa é altamente tóxica para larvas de *Culex* spp. e pouco para *Anopheles* spp. e *Aedes* spp. Por outro lado, a toxina Cry4Ba, tem maior atividade contra *Anopheles* e *Aedes*, menos tóxica para *Culex*, enquanto que Cry11Aa exibe atividade larvicida elevada contra as larvas de *Aedes* e *Culex*, mas inferior contra *Anopheles* (Delécluse *et al.* 1995; Ben-Dov 2014; Zhang *et al.* 2016).

Em relação as toxinas Cyt, sabe-se que a patogenicidade dessas toxinas para mosquitos é baixa, contudo, Cyt2Ba atua em sinergismo com Cry4Aa, Cry4Ba ou Cry11Aa e, toxina Cyt1Aa tem o potencial de interagir principalmente com Cry11Aa. Essas interações sinérgicas contribuem para a toxicidade geral do isolado, o sinergismo das toxinas Cyt com as Cry, proporciona elevada patogenicidade para larvas de mosquitos (Ben-Dov 2014). Essas diferentes combinações (Cry e Cyt) foram verificadas nos isolados obtidos no presente estudo com atividade larvicida para *An. darlingi*.

Por outro lado, a ausência de atividade larvicida das linhagens BtMA-37 e BtMA-401 para *An. darlingi*, apesar dessas linhagens ter apresentado atividade larvicida para *Ae. aegypti*, pode ser explicada devido à ausência dos genes *cry* e *cyt* com ação específica para esse mosquito. A linhagem BtMA-37 apresentou um único gene, *cy4Aa*, que embora tenha ação díptero-específico, o produto desse gene é pouco tóxico para anofelinos (Ben-Dov 2014). Outro fator importante, e que a detecção do gene *cry* e *cyt* em uma linhagem de *B.*

thuringiensis, é uma forma de predizer atividade larvicida, porém, o gene pode não ser expresso pela linhagem (Bravo *et al.* 1998; Costa *et al.* 2010).

Há poucos estudos de seleção de isolados *B. thuringiensis* com ação para mosquitos do gênero *Anopheles* (Ibarra *et al.* 2003; El-Kersh *et al.* 2016). Para algumas espécies foram feitos ensaios com diferentes toxinas Cry e Cyt isoladas, é foi verificado variação em relação a susceptibilidade de cada espécie a essas toxinas de forma específica. Para *An. stephensi* há maior número de toxinas Cry e Cyt com atividade inseticida (2Aa, 4Aa, 4Ba, 11Aa, 11Ba, 16Aa, 19Aa, 27Aa, 39Aa, 44Aa), seguido da espécie *An. gambiae* (1Ca, 2Ab; 4Aa, 4Ba, cyt1Aa e cyt2Aa), *An. albimanus* (11Aa, 11Ba e 11Bb) e para *An. quadrimaculatus* somente a toxina Cry2Aa e Cry11Ba (Abdullah *et al.* 2006; Otieno-Ayayo *et al.* 2008; Ben-Dov 2014).

Quanto a ação de *B. thuringiensis* para *An. darlingi*, até o presente momento não existem na literatura estudos que relatem a presença de isolados nativos com ação larvicida para essa espécie, o que torna esses dados inéditos.

Entretanto, para outras espécies do gênero *Anopheles* foi relatado a presença de isolados com atividade larvicida. Para *An. gambiae*, importante vetor da malária africana, foi verificada isolados de *B. thuringiensis* obtidos em diferentes substratos da Arábia Saudita, sendo que, de 68 isolados testado, 23 (33,8%) exibiram atividade larvicida, os autores verificaram ainda, que para esses isolados foram obtidos amplicons do tamanho esperado para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10*, *cry11*, *cyt1Aa* e *cyt2Aa* (El-kersh *et al.* 2016). Para *An. quadrimaculatus* também foi verificado isolados obtidos da América Latina com ação para esse vetor, também como o perfil gênico semelhante ao verificado nesse estudo (Ibarra *et al.* 2003).

Esses dados corroboram com o obtido no presente estudo, pois com a caracterização molecular das linhagens com atividade larvicida, foi possível associar a presença desses genes a toxicidade de *B. thuringiensis* para *An. darlingi*.

Levando-se em consideração *An. darlingi*, não há dados sobre a toxicidade de toxinas Cry e Cyt de forma isoladas para essa espécie, contudo, sabe-se que *An. darlingi* é suscetível ao complexo de toxinas presentes em Bti. Formulações à base da cepa *B. thuringiensis israelensis*, foram empregadas em criadouros naturais de anofelinos na região leste de Manaus. Essa bactéria foi capaz de reduzir a população dessa espécie no intervalo de apenas 24 horas após a aplicação. Foi verificado ainda que, houve redução tanto de *An. darlingi*, como também em criadouros com outros anofelinos (Cavados *et al.* 2017).

No presente estudo, verificou-se que oito linhagens apresentaram toxicidade para larvas de *An. darlingi* semelhante ao tratamento com a cepa padrão Bti-T04 001, com

destaque para os isolados BtMA-681, BtMA-689, BtMA-690 e BtMA-1114, que exibiram valor de CL_{50} menor que Bti em pelo menos um dos intervalos de observação.

Vários estudos evidenciaram isolados com melhor atividade larvicida para o controle de mosquitos do que cepa padrão *B. thuringiensis israelensis* (Costa *et al.* 2010; El-Kersh, 2014; 2016). Para *An. gambiae* (s.l), dos 23 isolados nativos da Arábia Saudita, oito foram mais tóxicas que Bti, com valores de CL_{50} (3,90-7,40 mg/L) cerca de 3,5 vezes menor que a estirpe padrão (El-Kersh *et al.* 2016). Esses autores verificaram ainda que dos oito isolados mais tóxicos que Bti, seis linhagens apresentavam perfis de genes *cry* e *cyt* semelhantes a estirpe padrão, semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Essa combinação gênica até o momento, e que apresenta maior potencial para controle de mosquitos, apesar dos esforços em encontrar diferentes combinações dessas toxinas em isolados de *B. thuringiensis* obtidos dos mais distintos tipos de ecossistemas em todo mundo (Zhang *et al.* 2010; 2016).

Essa diversidade de isolados também foi observada nesse estudo, pois as linhagens que mostraram atividade larvicida para *An. darlingi*, têm origem distinta: BtMA-681, BtMA-687, BtMA-688, BtMA-690 foram isolados de amostras de solo do Cerrado, BtMA-750 obtido do solo da Amazônia, enquanto que BtMA-1114 foi obtido de inseto Coleoptera. Esses dados são importantes do ponto de vista para obtenção da diversidade de linhagens tóxicas com ação para mosquitos e evidencia que a presença das toxinas da família Cry4, Cry11 e Cyt1 e Cyt2 são as mais eficientes no controle desse vetor.

Bioensaios com proteínas Cry purificados evidenciaram a patogenicidade distinta e seletivas dessas toxinas, pois foi verificado que Cry2 que apresenta ação para insetos da ordem Lepidoptera, quando testada contra larvas de *Ae. aegypti*, *Cx quinquefasciatus* e *Anopheles stephensi*, não causou nenhum efeito tóxico (Reyaz *et al.* 2017).

As diferenças relevantes na fisiologia do intestino médio e variação na atividade proteolítica entre diferentes ordens de insetos, são fatores determinantes para a especificidade de cada toxina (Côrrea *et al.* 2012).

Essas variações podem ocorrer até mesmo dentro de um grupo específico, como verificado por meio dos bioensaios quantitativos com isolados obtidos nesse estudo, em relação as duas espécies de mosquito testadas, para as quais foram obtidos resultados distintos. Tomando como base os valores CL_{50} no intervalo de 48 horas, verifica-se que o potencial de toxicidade desses isolados foi menor para *An. darlingi* em comparação com *Ae. aegypti* (dados apresentados no capítulo anterior). No geral, para *An. darlingi*, os valores de

CL₅₀ foram de cinco a dez vezes maior, com exceção da linhagem BtMA-681, que foi cerca de quatro vezes mais tóxico para *An. darlingi* do que *Ae. aegypti*.

A diferença na toxicidade pode ser ainda em relação a capacidade de interação das proteínas Cry com receptores específicos presentes no epitélio intestinal dos mosquitos (Pigott e Ellar 2007). A presença desses receptores é o que torna um inseto susceptível a ação de uma determinada toxina. Mesmo dentro de um mesmo grupo, pode haver variação quanto ao número desses receptores, o que define a especificidade e o espectro de ação de cada proteína inseticida (Chen *et al.* 2017; Qiu *et al.* 2017).

Considerando os anofelinos, a espécie *An. albimanus*, principal vetor da malária no México, é altamente suscetível a *B. thuringiensis israelensis*, entretanto, verifica-se que somente Cry4Ba e Cry11Aa são as proteínas que interagem diretamente com a membrana do epitélio intestinal desse vetor (Fernandez-Luna *et al.* 2010). Para *An. quadrimaculatus* foi identificada receptores com afinidade para ligação com a toxina Cry11Ba, porém não para as toxinas Cry4Ba ou Cry11Aa (Abdullah *et al.* 2006). Resultado similar ao encontrado para *An. gambiae*, que também é mais susceptível à Cry11Ba (Zhang *et al.* 2013; 2016).

Por outro lado, foi caracterizado maior número desses receptores das toxinas Cry em *Ae. aegypti*; aminopeptidases como receptor para Cry11Aa (Chen *et al.* 2009), alkaline phosphatase é outro receptor envolvido na interação das toxinas Cry11Aa e Cry11Ba de Bti e *B. thuringiensis jegathesan* em larvas de *Ae. aegypti* (Likitvivatanavong *et al.* 2011; Chen *et al.* 2009).

É importante ressaltar que os resultados obtidos nos bioensaios com larvas de *An. darlingi*, mostraram que essas linhagens são promissoras para o controle larvário dessa espécie. Considerando a problemática da extensiva utilização de larvicidas químicos em criadouros naturais de mosquitos, é necessário buscar medidas para minimizar os danos ambientais ocasionado pelo emprego desses inseticidas. Uma vez que, com o problema de resistência, há uma tendência do aumento de aplicações dos inseticidas para assegurar o controle desse mosquito.

Levando-se em conta o controle de *An. darlingi*, que compartilha os criadouros com outros invertebrados, é importante o emprego de entomopatógeno que tenham ação específicas, como a utilização de novas linhagens de *B. thuringiensis* que já se mostraram promissoras para o controle dessa espécie e em campo, não causam danos ao ambiente onde são aplicados (Cavados *et al.* 2017)

O emprego de *B. thuringiensis* no controle de insetos é viável, pois a potência molecular destas toxinas Cry e Cyt juntas, é 80 mil vezes melhor que os organofosforados e

300 vezes maior do que os piretróides sintéticos, inseticidas amplamente utilizados no controle de mosquitos vetores, incluindo anofelinos em todo o mundo (Feitelson *et al.* 1992; Reyas *et al.* 2017).

Os bioensaios para seleção de entomopatógenos em laboratório é uma etapa essencial, pois é possível selecionar as linhagens de maior patogenicidade para o controle de mosquitos vetores. A utilização de linhagens previamente caracterizadas por meio de técnicas moleculares, permite compreender o potencial de cada linhagem. Diante dos resultados demonstrado em condição de laboratório, ressalta-se que os isolados obtidos no presente estudo tem potencial a ser utilizados na produção de larvicida para o controle de ambas as espécies, *Ae. aegypti* e *An. darlingi*, vetores primários das mais importantes doenças do mundo, dengue, febre amarela, zika, chikungunya e malária.

5.REFERÊNCIAS

- Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC biochemistry*, 7: 16.
- Altamiranda-Saavedra, M.; Arboleda, S.; Parra, J. L.; Peterson, A. T.; Correa, M. M. 2017. Potential distribution of mosquito vector species in a primary malaria endemic region of Colombia. *PloS one*, 12: e0179093.
- Almeida, S.P. 2017. Estudos químicos e biológicos do óleo essencial e extratos de *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae), procedente da serra do tepequém - Amajari / Roraima. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas/Manaus, Amazonas. 151p.
- Alves, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2da ed. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 1163p.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. BioEstat versão 5.3: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, Belém, Pará, Brasil.
- Barbosa, L.M.C.; Souto, R.N.P.; Dos Anjos Ferreira, R.M.; Scarpassa, V.M. 2016. Behavioral patterns, parity rate and natural infection analysis in anopheline species involved in the transmission of malaria in the northeastern Brazilian Amazon region. *Acta tropica*, 164: 216-225.

- Ben-Dov, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*, 6: 1222-1243.
- Benelli, G.; Mehlhorn, H. 2016. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*, 115: 1747-1754.
- Badran, A.H.; Guzov, V.M.; Huai, Q.; Kemp, M.M.; Vishwanath, P.; Kain, W.; *et al.* 2016. Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533: 58-63.
- Brasil, 2017, Ministério da Saúde. Descrição da Doença (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>). Acesso em 01/02/2017.
- Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; *et al.* 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4965-4972.
- Brooke, B.D.; Robertson, L.; Kaiser, M.L.; Raswiswi, E.; Munhenga, G.; Venter, N.; Wood, O.R.; Koekemoer, L.L. 2015. Insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Mamfene, KwaZulu-Natal. *South African Journal of Science*, 111: 1-3.
- Cáceres, L.; Rovira, J.; García, A.; Torres, R. 2011. Determinación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en tres poblaciones de *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) de Panamá. *Biomédica*, 31: 419-427.
- Cavados, C.F.G.; Tadei, W.P.; Roque, R. A.; Regis, L.N.; Oliveira, C.M.F.; Gil, H.B. Araújo-Coutinho, C.J. P. C. 2017. *Bacillus* Entomopathogenic Based Biopesticides. in Vector Control Programs in Brazil. In: Fiuza, L.M., Polanczyk, R. A., Crickmore, N. (Eds). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. v. 1. Springer. 280 p.
- Chen, J.; Aimanova, K.G.; Pan, S.; Gill, S.S. 2009. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 688-696.
- Chen, J.; Aimanova, K.; Gill, S.S. 2017. Functional characterization of *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 involved in the toxicity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *jegathesan*. *Peptides*.98:78-85.
- Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 1da ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 228p.

- Corrêa, R.F.T.; Ardisson-Araújo, D.M.P.; Monnerat, R.G.; Ribeiro, B.M. 2012. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PloS One*, 7: e46121.
- Costa, J.R.V.; Rossi, J.R.; Marucci, S.C.; Alves, E.C.C.; Volpe, H.X.L.; Ferraudo, A.S.; Lemos, V.F.M.; Desidério, J.A. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (l.) (Diptera: culicidae). *Neotropical Entomology*, 39: 757-766.
- Deane, L.M.; Causey, O.R.; Deane, M.P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Revista Serviço Especial de Saúde Pública*, 1: 827-965.
- Delecluse, C.; Van Coppenolle, H.; Willems, E.; Van Leemputte, M.; Diels, R.; Goris, M. 1995. Influence of high-resistance and high-velocity training on sprint performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 27: 1203-1209.
- El-Kersh, T.A.; Al-Akeel, R.A.; Al-Sheikh, Y.A.; Alharbi, S.A. 2014. Isolation and distribution of mosquito-larvicidal Cry genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*, 31: 616-632.
- El-kersh, T.A.; Ahmed, A.M.; Al-sheikh, Y.A.; Tripet, F.; Ibrahim, M.S.; Metwalli, A.A.M. 2016. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). *Parasites & Vectors*, 9: 647.
- Faran, M.E.; Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 13: 1-81.
- Fernandez-Luna, M.T.; Lanz-Mendoza, H.; Gill, S.S.; Bravo, A.; Soberon, M.; Miranda-Rios, J. 2010. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Microbiology*, 12: 746-757
- Feitelson, J.S.; Payne, J.; Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nature Biotechnology*, 10: 271-275.
- Ferreira, M.U.; Castro, M.C. 2016. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, 15: 284.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. 2da ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 860p.
- Frankenhuyzen, K.V. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1-16.

- Frankenhuyzen, K.V. 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 76–85
- Galardo, A.K.R.; Póvoa, M.M.; Sucupira, I.M.C.; Galardo, C.D.; Santos, R.L.C.D. 2015. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48: 765-769.
- Habib, M.E.M.; Andrade, C.F.S., 1998. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. v. 2. Piracicaba, FEALQ, São Paulo, p. 383-446.
- Hamel, M.J.; Otieno, P.; Bayoh, N.; Kariuki, S.; Were, V.; Marwanga, D.; Laserson, K.F.; Williamson, J.; Slutsker, L.; Gimnig, J. 2011. The Combination of Indoor Residual Spraying and Insecticide-Treated nets Provides added protection against Malaria compared with Insecticide-treated nets alone. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 1080-1086.
- Hiwat, H.; Bretas, G. 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasites & Vectors*, 4: 177.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53: 242-255.
- Ibarra, J.E.; Del Rincón, M.C.; Ordúz, S.; Noiega, D.; Benintende, G.; Monnerat, R.; *et al.* 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5269-5274.
- Ibrahim, S.S.; Riveron, J.M.; Stott, R. Irving, H.; Wondji, C.S. 2016. The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 68: 23-32.
- Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1-41.
- LeOra, S. 2003. Poloplus, a user's guide to probit or logit analysis. *LeOra Software, Berkeley, CA*.
- Linthicum, K.J. 1988. A revision of the Argyritarsis Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 20: 101–271.
- Likitvivatanavong, S.; Chen, J.; Bravo, A.; Soberón, M.; Gill, S.S. 2011. Cadherin, Alkaline Phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus*

- thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 24-31.
- Litaiff-Abreu, E.; Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B. 2011. Effectiveness of *Bacillus sphaericus* on *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) in Amazonia. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(2).
- Martins-Campos, K.M.; Pinheiro, W.D.; Vitor-Silva, S.; Siqueira, A.M.; Melo, G.C.; Rodrigues, Í.C.; *et al.* 2012. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, 11: 351.
- Marina, C.F.; Bond, J.G.; Muñoz, J.; Valle, J.; Novelo-Gutiérrez, R.; Williams, T. 2014. Efficacy and non-target impact of spinosad, Bti and temephos larvicides for control of *Anopheles* spp. in an endemic malaria region of southern Mexico. *Parasites & Vectors*, 7: 55.
- Nussenzweig, R.S. 2011. Breakthroughs towards a malaria vaccine. *História, Ciências, Saúde- Manguinhos*, 18: 559-564
- Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.G; Brasil, P.; Ladislau, J.L.B.; Tauil, P.L.; Daniel-Ribeiro, C. T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, 9(1): 115.
- Oliveira, C.D.; Tadei, W.P.; Abdalla, F.C.; Paolucci Pimenta, P.F.; Marinotti, O. 2012. Multiple blood meals in *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 37: 351-358.
- Otieno-Ayayo, Z.N.; Zaritsky, A.; Wirth, M.C.; Manasherob, R.; Khasdan, V.; Cahan, R.; Ben-Dov, E. 2008. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental Microbiology*, 10: 2191-2199.
- Patil, C.D.; Patil, S.V.; Salunke, B.K.; Salunkhe, R.B. 2012. Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research*, 110: 1841-1847.
- Pigott, C.R.; Ellar, D.J. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 255-281.
- Pluess, B.; Tanser, F.C.; Lengeler, C.; Sharp, B.L. 2010. Indoor residual spraying for preventing malaria. *The Cochrane Library*, 1-46.
- Qiu, L.; Cui, S.; Liu, L.; Zhang, B.; Ma, W.; Wang, X.; Lei, C.; Chen, L. 2017. Aminopeptidase N1 is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports*, 7: 45007.

- Recht, J.; Siqueira, A.M.; Monteiro, W.M.; Herrera, S.M.; Herrera, S.; Lacerda, M.V. 2017. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, 16: 273.
- Reis, I.C.; Honório, N.A.; Barros, F.S.M.; Barcellos, C.; Kitron, U.; Camara, D.C.P.; Pereira, G.R.; Keppeler, E.C.; Silva-Nunes, M.; Codeço, C.T. 2015. Epidemic and endemic malaria transmission related to fish farming ponds in the Amazon frontier. *PLoS One*, 10: e0137521.
- Reyaz, A.L.; Gunapriya, L.; Arulselvi, P.I. 2017. Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. *3 Biotech*, 7: 143.
- Rodrigues, I.B.; Tadei, W.P.; Dos Santos, R.L.C.; Dos Santos, S.; Baggio, J.B. 2008. Controle da malária: eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de olaria. *Revista de Patologia Tropical*, 37: 161-176.
- Rodrigues, M.S.; Batista, E.P.; Silva, A.A.; Costa, F.M.; Neto, V.A.; Gil, L.H.S. 2017. Change in *Anopheles* richness and composition in response to artificial flooding during the creation of the Jirau hydroelectric dam in Porto Velho, Brazil. *Malaria Journal*, 16: 87.
- Rufalco-Moutinho, P.; Schweigmann, N.; Bergamaschi, D.P.; Sallum, M.A.M. 2016. Larval habitats of *Anopheles* species in a rural settlement on the malaria frontier of southwest Amazon, Brazil. *Acta Tropica*, 164: 243-258.
- Saldaña, M.A.; Hegde, S.; Hughes, G.L. 2017. Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112: 81-93.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Ker, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos. I. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DipteraCulicidae) da Rodovia Manaus - Boa vista. *Acta Amazonia*, 11: 789 - 797.
- Santos, F.P.; Lopes, J.; Vilas-Bôas, G. T.; Zequi, J. A. 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 122: 64-70.
- Santos-Lobo, K.D.2015. *Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de Bacillus thuringiensis Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense em larvas de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão. 109p.

- Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P. 1990. Biologia de anofelinos amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* Gabaldon 1940 (Diptera Culicidae). *Acta Amazonia*, 20: 95-117.
- Silva, A.P.B.; Santos J.M.M.; Martins A.J. 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasit & Vectors*, 7:450.
- Silva, G.L.D.; Pereira, T.N.; Ferla, N.J.; Silva, O.S.D. 2016. The impact of insecticides management linked with resistance expression in *Anopheles* spp. populations. *Ciência & Saúde Coletiva*, 21: 2179-2188.
- Siqueira, A.M.; Quique Bassat, Q.; Rodovalho, S.; Lacerda, M.V. G. 2017. Raising the red flag for malaria elimination and integrated fever surveillance in the Brazilian amazon. *The Lancet Global Health*, 5: e257-e258.
- Soares-da-Silva, J.; Pinheiro, V.C.S.; Litaiff-Abreu, E.; Polanczyk, R.A.; Tadei, W.P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 59: 1-6.
- Tadei, W.P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M. S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 325-335.
- Tadei, W. P.; Dutary Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42: 87-94.
- Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S.; Sampaio, R.T.M.; Mesquita, H.G.; Pinheiro, V.C.S.; Zequi, J.A.C.; Roque, R.A.; Santos, J.M.M. 2017. Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. *Hydrobiologia*. 789: 179–196
- Tusting, L.S.; Thwing, J.; Sinclair, D.; Fillinger, U.; Gimnig, J.; Bonner, K.E.; Lindsay, S.W. 2015. Mosquito larval source management for controlling malaria. *The Cochrane Library*, 8: CD008923.
- Tukei, B.B.; Beke, A.; Lamadrid-Figueroa, H. 2017. Assessing the effect of indoor residual spraying (IRS) on malaria morbidity in Northern Uganda: a before and after study. *Malaria Journal*, 16: 4.
- Vieira-Neta, M.R. A. 2016. *Seleção e caracterização molecular de Bacillus thuringiensis Berliner (1911) da restinga e mangue para o controle de Aedes aegypti (Diptera,*

- Culicidae*). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, Maranhão. 53p.
- Wassmer, S.C.; Grau, G.E.R. 2017. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?. *International Journal for Parasitology*, 47: 145-152.
- West, P.A.; Protopopoff, N.; Wright, A.; Kivaju, Z.; Tigererwa, R.; Mosha, F.W.; Kisinza, W.; Rowland, M.; Kleinschmidt, I. 2015. Enhanced protection against malaria by indoor residual spraying in addition to insecticide treated nets: is it dependent on transmission intensity or net usage?. *PLoS One*, 10: e0115661.
- WHO - World Health Organization. 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- WHO - World Health Organization. 2011. Global Malaria Programme: World Malaria Report. Geneva.
- WHO - World Health Organization, 2017. Draft global vector control response 2017-2030.
- WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit, 2017. Mosquito identification resources. http://www.wrbu.org/VecID_MQ.html
- Zhang, L.; Huang, E.; Lin, J.; Gelbič, I.; Zhang, Q.; Guan, Y.; Guan, X. 2010. A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*. *Microbiological Research*, 165: 133-141.
- Zhang, Q.; Hua, G.; Adang, M.J. 2016. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24: 714-729.

CAPÍTULO III

Soares-da-Silva, J. Silva, M.C., Pinheiro, V.C.S., Carvalho-Zilse, G.A., Tadei, W.P. A importância da toxina Cyt1Aa para a patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner em mosquitos. Manuscrito formatado para Acta Amazonica

A importância da toxina Cyt1Aa para a patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner em mosquitos

Joelma Soares-da-Silva ^{a,b*}; Maria C. da Silva ^c; Valéria C.S. Pinheiro ^c; Gislene A. C. Zilse ^e; Wanderli P. Tadei ^b.

^a Curso Ciências Naturais, Campus VII, Universidade Federal do Maranhão, Avenida Dr. José Anselmo, 2008, São Sebastião, Codó, Maranhão, 65400-000, Brasil.

^b Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

^c Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Química e Biologia, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias, Maranhão, 65604-380, Brasil.

^e Grupo de Pesquisas em Abelhas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil.

*autor correspondente: Joelma Soares-da-Silva, Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brasil. Email address: joelmasoares12@gmail.com

RESUMO

Bacillus thuringiensis produz diversos fatores de virulência, sendo os principais as toxinas Cry e Cyt, presentes no cristal de proteínas produzido durante a esporulação. As toxinas Cry apresentam amplo espectro de ação, por outro lado, as Cyt são específicas para mosquitos. Cyt1Aa é a toxina citolítica mais eficiente ao agir em sinergismo com as Cry para o controle de mosquitos. Neste trabalho objetivou-se estudar a frequência do gene codificador para a toxina Cyt1Aa em isolados de *B. thuringiensis* nativos obtidos de amostras de solo, inseto e água, bem como verificar possível polimorfismo genético. Foram utilizadas 1.448 linhagens de *B. thuringiensis* e realizada extração de DNA e PCR de todas com a utilização de primer que amplifica um fragmento de 300 pares de bases desenhado a partir de região conservada do gene *cyt1Aa*. As linhagens que apresentaram amplificação positiva foram sequenciadas, as de boa qualidade foram comparadas entre si e com as sequências disponíveis no Genbank. 33 (2,3 %) linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*. A maior frequência de isolados com a presença do gene *cyt1Aa* foi obtida de amostras do bioma Cerrado, tanto isolados de solo, quanto de insetos, ambos com 3,4 %. O sequenciamento do gene *cyt1Aa* evidenciou que para essa região de 300 pares de bases o gene é conservado, pois não houve qualquer variação de bases para nenhum dos isolados em estudo. Não foi observado nenhum polimorfismo do gene analisado, que resultou em 100% de similaridade com as sequências depositadas no GenBank.

Palavras chave: Genes *cyt*, Polimorfismo, Controle de mosquitos, vetores.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis produces several virulence factors, being the main ones the Cry and Cyt toxins, present in the crystal of proteins produced during sporulation. Cry toxins have a broad spectrum of action; on the other hand, Cyt are specific for mosquitoes. Cyt1Aa is the most efficacy acting in synergism with Cry for mosquito control. The aim of this work was to study the frequency of the gene coding for the Cyt1Aa toxin in native *B. thuringiensis* isolates obtained from soil, insect and water samples, as well as to verify possible genetic polymorphism. A total of 1,448 *B. thuringiensis* strains were used and DNA extraction and PCR were performed using primer that amplifies a fragment of 300 base pairs drawn from the conserved region of the *cyt1Aa* gene. The strains that showed positive amplification were sequenced later. The good quality ones were compared with each other and with the sequences available in Genbank. 33 (2.3%) *B. thuringiensis* strains showed positive amplification for the *cyt1Aa* gene. The highest frequency of isolates with the *cyt1Aa* gene presence was obtained from samples of the Cerrado biome, both soil isolates and insects, with 3.4% (both). Sequencing of the *cyt1Aa* gene showed that for this region of 300 base pairs, the gene is conserved, because there was no variation of bases for any of the isolates in this study. No polymorphism was observed of the analyzed gene, which resulted in 100% similarity with the sequences deposited in GenBank.

Key words: *Cyt* genes, Polymorphism, Mosquitoes control, vectors.

1.INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva encontrada em todos os tipos de ambientes incluindo solo, água, insetos e plantas (Bernhard *et al.* 1997; Damgaard 2000; Pinto *et al.* 2003; Baig e Menhaz 2010). São bactérias formadoras de esporos que sintetizam uma extraordinária diversidade de proteínas inseticidas, consideradas os principais ingredientes utilizados na fabricação de inseticidas biológicos no mundo, pois demonstrou potencial e segurança em diferentes regiões onde foram utilizados (Bravo *et al.* 2011; Palma *et al.* 2014; 2017).

Bacillus thuringiensis produz diversos fatores de toxicidade, tanto na fase vegetativa, toxinas Vips (*vegetative insecticidal protein*), como também durante o processo de esporulação conhecidas α -endotoxinas, Crystal (Cry) e Citolíticas (Cyt). O sucesso da sua utilização está na presença das α -endotoxinas, que se acumulam no interior da célula bacteriana, formando inclusões cristalinas paraesporal, denominadas de cristal (Bravo *et al.* 2007).

As toxinas Cry são descritas em maior número. Atualmente são conhecidas cerca de 400 proteínas as quais estão presentes em *B. thuringiensis* e apresentam capacidade tóxica para um amplo grupo de insetos alvo (Glare e O'Callaghan 2000; Frankenhuyzen 2009; Crickmore 2017). As toxinas Cyt, por outro lado, são descritas em menor número, e são relatadas principalmente em linhagens *B. thuringiensis* com ação para insetos da ordem Diptera, sobretudo, específicas para mosquitos (Bravo *et al.* 1998; Ibarra *et al.* 2003; Jouzani *et al.* 2008; Costa *et al.* 2010; El-kersh *et al.* 2016).

As toxinas Cry e Cyt não apresentam similaridade estrutural tampouco relação filogenética (Bravo *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2016). Quanto ao mecanismo de ação, as toxinas Cry são mediadas por receptores específicos presentes na membrana do intestino médio dos insetos e as toxinas Cyt apresentam ação hemolítica e citolítica *in vitro* para vários tipos de células e *in vivo* especificamente para insetos dipteros (Hofte e Whiteley 1989; Corrêa *et al.* 2012). Ambas as toxinas interagem diretamente com a membrana lipídica do intestino médio desses insetos, ocasionando a sua morte (Gill e Hornung 1987; Schnepf *et al.* 1998; Butko 2003).

Apesar das diferenças estruturais, os mecanismos bioquímicos necessários para ativação das proteínas são comuns. Após a ingestão do cristal protéico por insetos, as proteínas são clivadas por ação de enzimas presentes no lúmen do intestino médio do inseto

alvo, nesse processo são removidas as regiões C e N terminal, que tornam as toxinas ativas (Gómez *et al.* 2007; Cohen *et al.* 2011).

Duas hipóteses foram propostas para explicar a inserção da membrana das toxinas Cyt1Aa em células do intestino médio de insetos da ordem Diptera, sendo a primeira por um modelo de formação de poros, em que a toxina Cyt1Aa se liga à membrana celular induzindo a formação de canais seletivos nas vesículas da membrana levando a lise coloidal-osmótica da célula. O outro mecanismo é por meio de efeito detergente, no qual ocorre uma agregação inespecífica da toxina na superfície da bicamada lipídica, levando à desintegração da membrana e consequente morte celular, ambos ainda estão em discussão (Butko 2003; Soberón *et al.* 2010)

As toxinas Cry e Cyt atuam em sinergismo, o que ocorre pela ligação inespecífica das toxinas Cyt na membrana intestinal do inseto alvo, essas toxinas apresentam afinidade pelos fosfolípidos presentes nas células do intestino médio do mosquito, e interagem com a membrana, e propicia a inserção das toxinas Cry nas células intestinais dos insetos, e consequentemente a sua morte (Crickmore *et al.* 1995; Otieno-Ayayo *et al.* 2008; Fernández-Luna *et al.* 2010; Cantón *et al.* 2011; Côrrea *et al.* 2012).

O sinergismo entre as toxinas Cry e Cyt parece uma estratégia para melhorar o potencial tóxico das linhagens de *B.thuringiensis* nas quais estão presentes (Pardo-López *et al.* 2009). A presença das toxinas citolíticas mais frequente em linhagens com ação para mosquitos, pode ser devido a uma relação co-evolutiva. A presença das toxinas Cyt pode aumentar a eficiência de um isolado no controle de mosquitos, mostrando-se importante componente para o controle desses insetos (Crickmore *et al.* 1995; Pérez *et al.* 2005; Wirth *et al.* 2005; Park *et al.* 2013).

Diferentes linhagens de *B. thuringiensis* que possuem ação comprovadas para mosquitos apresentam pelo menos uma toxina Cyt. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* apresenta Cyt1Aa e Cyt 2Ba, a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* Cyt2Aa1, *B. thuringiensis* subsp. *medellin* Cyt1Ab e *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* Cyt2Bb (Thiery *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2016; Crickmore 2017).

As toxinas pertencentes à família Cyt são, portanto, o principal componente que não pode ser excluído quando se objetiva melhorar a potência de isolados de *B. thuringiensis* para serem utilizados como larvicidas para o controle de mosquito (Promdonkoy *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011).

Atualmente existem 10 toxinas Cyt descritas: Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba, Cyt1Ca, Cyt1Da, Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Ca e Cyt3Aa, que são classificadas de acordo com o

grau de similaridade entre os aminoácidos (Crickmore 2017). A toxina Cyt1Aa é a mais estudada, é codificada pelo gene do mesmo nome, com uma sequência de 744 pares de base (Ben-Dov 2014). A proteína no seu estado inativo apresenta peso molecular de 28 kDa, após ativada gera um fragmento tóxico de 25 kDa (Chow *et al.* 1989; Frankenhuyze 2009; Crickmore 2017).

A toxina Cyt1Aa ocupa cerca de (45-50%) do cristal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, linhagem amplamente utilizada no controle de mosquitos no mundo (Bercker e Margalit 1993). Essa linhagem mostra boa efetividade contra vários gêneros de mosquitos, incluído para *Anopheles* Meigen, 1818, *Aedes* Meigen, 1818 e *Culex* Linnaeus, 1758. A elevada especificidade desta linhagem é devido ao sinergismo com as toxinas Cry: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa e Cry11Ba, com massa molecular de 125, 130, 58, 70 e 72 kDa respectivamente. Todos esses genes foram mapeados em um plasmídeo de 128 kb conhecido como pBtoxis (Berry *et al.* 2002; Ben-Dov 2014).

Cyt1Aa apresenta baixa ação inseticida quando utilizada de forma isolada, contudo, é importante mencionar que a ação conjunta com as toxinas Cry, por meio de interações específicas entre elas, é importante para a atividade inseticida (Hofte e Whiteley 1989; Crickmore *et al.* 1998; Beltrão e Silva-Filha 2007; Tokcaer *et al.* 2006; Bravo *et al.* 2007). A toxina Cyt1Aa é um componente importante do arsenal entomopatogênico de *B. thuringiensis israelensis* (Vilas-Bôas *et al.* 2012).

Vários bioensaios com diferentes combinações de proteínas Cry e Cyt1Aa têm sido realizados para mostrar o sinergismo entre elas (Pérez *et al.* 2005; Promdonkoy *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011). Em testes realizados com as toxinas de *B. thuringiensis israelensis* observou-se que a proteína Cyt1Aa aumentou a toxicidade das proteínas Cry4Ba e Cry11Aa (Pérez *et al.* 2005; Cantón *et al.* 2011; Elleuch *et al.* 2015). Também já foi verificado que quando há mutação na Cyt1Aa, o sinergismo não acontece (Pérez *et al.* 2005).

O mecanismo proposto de sinergismo é que Cyt1Aa funciona como um receptor para toxinas Cry em mosquitos. Cyt1Aa insere-se na membrana do epitélio do intestino médio e expõe as regiões de proteínas reconhecidas pelas toxinas Cry, o que facilita a oligomerização de Cry e a formação de poros, em outras palavras, Cyt1Aa é um receptor funcional para toxicidade de toxinas Cry para larvas de mosquitos (Soberón *et al.* 2010).

Outro fator relevante no mecanismo de ação de Cyt1Aa é que a sua presença em *B. thuringiensis israelensis* tem sido apontada como responsável pela supressão de resistência às toxinas Cry em populações de mosquitos (Park *et al.* 2016). Ao contrário do que ocorre com as linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas para o controle de pragas agrícolas, para as quais há

registro de resistência em condição de campo, até o momento não foi registrada resistência em campo para *B. thuringiensis israelensis*, apesar da ampla utilização dessa linhagem para o controle de diferentes espécies de mosquitos em diferentes regiões do mundo (Sayyed *et al.* 2001; Bravo *et al.* 2011). Com isso, verifica-se que a presença de Cyt1Aa é uma excelente estratégia para superar a resistência Cry4Aa, Cry4Ba ou Cry11Aa em mosquitos.

Diante da potencialidade de utilização das toxinas Cyt1Aa para o controle de mosquitos, há o interesse da comunidade científica em dar prosseguimento nas pesquisas sobre as proteínas inseticidas Cyt1Aa e, conseqüentemente, obter dados como sua frequência em isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões do mundo. Esses dados são importantes para compreendermos as relações dessas toxinas com linhagens de *B. thuringiensis* nativas que apresentam ações inseticidas para larvas de mosquitos. Nesse sentido, é necessário ampliar a investigação, verificar a presença dessas toxinas e o seu perfil molecular (Soberón *et al.* 2013).

É importante também determinar o modo de ação das toxinas Cyt em mosquitos em nível molecular (Soberón *et al.* 2013). Pois, essas informações podem contribuir no acompanhamento de resistência, uma vez que, identificação das mutações é um primeiro passo útil para verificar o comprometimento da interação das toxinas e a membrana do epitélio intestinal dos mosquitos (Park *et al.* 2016).

Com o avanço de técnicas moleculares, é possível realizar estudos mais aprofundados sobre as toxinas, o que é feito através da utilização de técnicas como PCR (Reação da Cadeia da Polimerase) e sequenciamento dos fragmentos gerados pela técnica. Contudo, estudos sobre diversidade gênica são realizados principalmente com as toxinas Cry, no sentido de identificar novas toxinas inseticidas (Sauka *et al.* 2006; Alves *et al.* 2011; Liang *et al.* 2011).

Na caracterização de isolados com atividade para mosquitos, é essencial investigar a presenças das toxinas Cry mosquitocidas. Contudo, também é importante compreender mais sobre as toxinas Cyt com o objetivo de elucidar seu papel no ambiente, sua distribuição, assim como obter maiores esclarecimentos sobre o sinergismo de ambas as toxinas (Pérez *et al.* 2005; Promdonkoy *et al.* 2005; Cohen *et al.* 2011).

Considerando que Cyt1Aa tem implicações importantes para a patogenicidade de *B. thuringiensis* para mosquitos, é importante buscar linhagens com a presença dessas toxinas e caracterizá-las molecularmente a fim de identificar variação genética (Mera *et al.* 2012), uma vez que a especificidade da Cyt1Aa demonstrada, até agora, sugere uma segurança na sua utilização, e potencializa a aplicação dessa proteína para expandir o espectro de ação e uso de novas linhagens de *B. thuringiensis* no controle de insetos vetores de doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizados 1.448 isolados de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA), situada no Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC), localizada no município de Caxias, MA. Quanto a origem dos isolados, as linhagens de *B. thuringiensis* foram obtidas de diferentes fontes, compreendendo 267 e 296 isoladas de insetos mortos e água respectivamente, coletados de área do Cerrado, 885 obtidas a partir de isolamento de solo, das quais, 71 isoladas da Caatinga, 497 do Cerrado e 317 da Amazônia, todas as amostras foram coletadas no Estado do Maranhão (Figura 1). Como controle positivo foi utilizada a linhagem *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) cepa T04 001, cedida pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/ UNESP Jaboticabal.

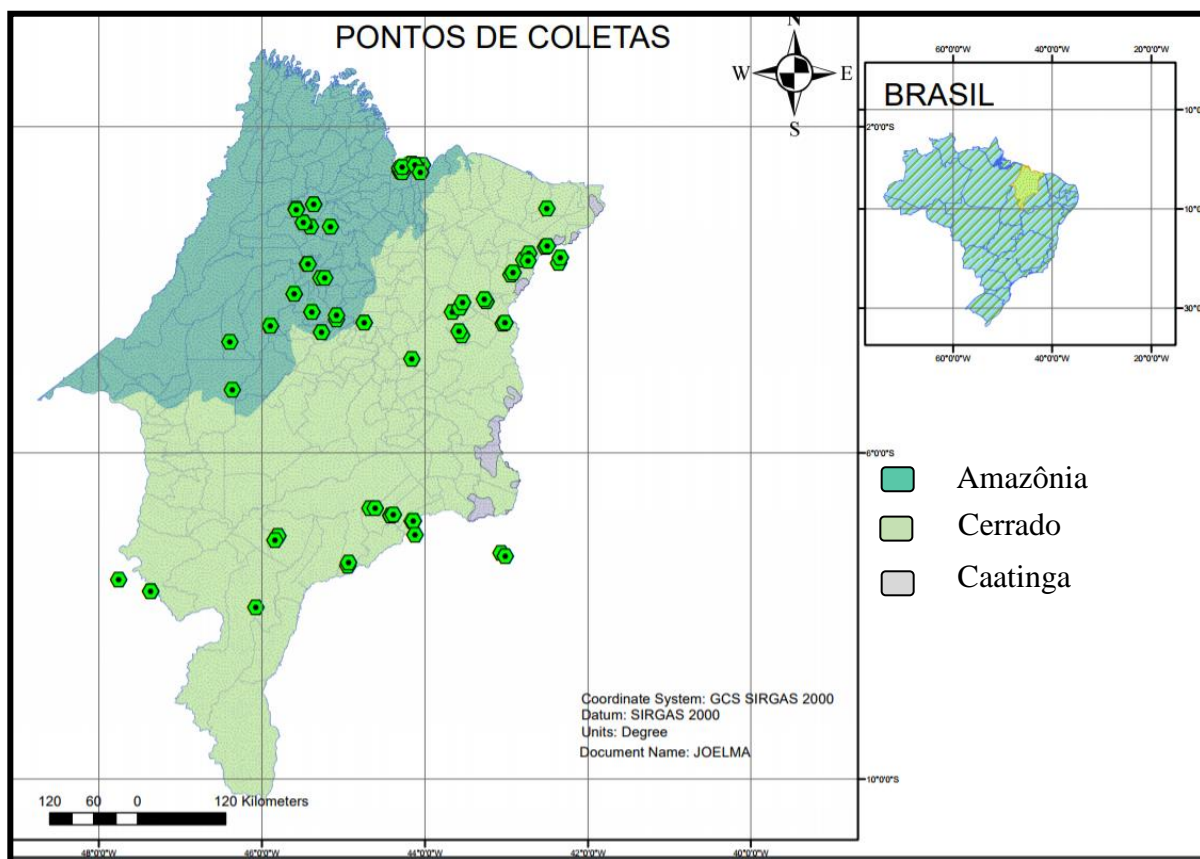


Figura 1. Mapa do estado do Maranhão destacando os biomas amazônia, cerrado e caatinga, e pontos de coleta de amostras de solo, água e insetos utilizadas para isolamento de *Bacillus thuringiensis*.

2.2 Extração de DNA genômico

Foi realizada a extração do DNA genômico dos 1.448 isolados *B. thuringiensis* seguindo os protocolos de extração de fervura e congelamento consecutivo (Bravo *et al.* 1998; Starnbach *et al.* 1989). Os isolados foram plaqueados em meio Ágar Nutrinte (NA), crescidos por 18 h. Após este período, com auxílio de uma alça de platina, a amostra bacteriana foi transferida para microtubos de 2 mL contendo 1,5 mL de caldo nutriente (Extrato de Carne 1,0, Extrato de Levedura 2,0, Peptona 5,0 e Cloreto de Sódio 5,0 g/L) deixados por 18 h a 30 °C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga 5418 R–Eppendorf) a 13.000 rpm por 15 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 400 µL de água de Miliq. Posteriormente, a solução foi homogeneizada em vórtex, fervida por 15 min e resfriada em temperatura ambiente por 10 min. A solução foi centrifugada novamente a 13.000 rpm por 15 min a 25 °C e 200 µL do sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL. Em seguida o DNA foi quantificado em aparelho L-QUANNT (Loccus Biotecnologia) e conservado em freezer à -20 °C.

Para todas as amostras foi realizada a quantificação em espectrofotômetro, os isolados só foram analisados quanto à presença do gene *cyt1Aa* quando positivo na extração de DNA em concentrações satisfatórias ± 50 ng/ μ L.

2.3 Reação de amplificação do gene *cyt1Aa* por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 12,5 μ L, contendo 1 X do tampão GoTaq® Flexi DNA Polymerase; 2,0 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs (*Promega*); 0,2 pMol/ μ L de cada oligonucleotídeo (*Invitrogen*) AACTCAAACGAATAACCAAG (f) e TGTTCCCTTACTGCTGATAC (r), 1U/ μ L da enzima GoTaq® DNA Polymerase (*Promega*) e ± 50 ng de DNA e H₂O grau MilliQ. A reação foi realizada em termociclador Gencycler-G96G (*Biosystems*). As condições gerais para a amplificação foi desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento 53 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min, e extensão final de 72 °C por 5 min conforme protocolo de Costa *et al.* (2010).

Após a reação de amplificação foi retirado 5 μ L de cada produto de PCR e adicionado 3 μ L de tampão de carregamento *Loading Dye* (*Promega*) contendo o corante Gel Red *Nucleic Acid Gel Stain* (*Biotium*). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose na concentração de 1,5 %, que foi submetido a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1 X (Tris/Borato/EDTA). Como padrão de peso molecular em cada reação de eletroforese foi incluído 3 μ L de DNA *Ladder* 1Kb (*Promega*) misturado a 3 μ L do tampão de carregamento. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em transiluminador e fotografados no aparelho L-PIX (*Loccus Biotecnologia*). Foram consideradas amplificações positivas para o gene *cyt1Aa*, fragmentos de 300 pares de bases. Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados a partir de regiões conservadas do gene *cyt1Aa*, obtidos a partir do alinhamento das sequências desse gene disponíveis no GenBank (Costa *et al.* 2010).

2.4 Extração de DNA e amplificação do gene *cyt1Aa* para sequenciamento

As linhagens que apresentaram o gene *cyt1Aa* foram submetidas a uma nova extração de DNA, o que foi realizada utilizando-se o kit de extração de DNA InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA), conforme as recomendações do fabricante.

Cada isolado foi cultivado por cerca de 12 horas em Agar Nutriente. Aleatoriamente, uma colônia de cada amostra foi escolhida e transferida para microtubo contendo 1 mL de água grau MiliQ, centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm a 20 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, posteriormente foi adicionado 200 µL da InstaGene Matrix (Bio-Rad), em seguida o material foi incubado em banho-maria a 56 °C por 25min. Após esse período o material foi agitado rigorosamente em vórtex por 10 s e logo incubado a 100 °C por 8 min. A amostra foi novamente agitada em velocidade moderada em vórtex por 10 s e centrifugada a 20 °C por 2 min e 30 s. Por fim, 200 µL do sobrenadante foram colhidos, transferidos para microtubos estéreis os quais foram estocados em freezer -20 °C até o momento do uso. A reação de PCR para o gene *cyt1Aa* foi realizada nas mesmas condições citadas na seção anterior (3.3), no entanto, o volume utilizado foi de 25 µL.

2.5 Purificação do produto da PCR

A purificação dos fragmentos da reação de PCR foi realizada com a utilização do Kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen) conforme recomendação dos fabricantes.

Para cada 25 µL de uma amostra de PCR foi adicionado 100 µL do reagente *Binding Buffer* B2 com isopropanol. A amostra foi misturada e pipetada em uma coluna de rotação PureLink®, centrifugada a $10.000 \times g$ por 1 minuto e, posteriormente, o *pellet* foi descartado. As colunas foram novamente inseridas nos respectivos tubos coletores, foi adicionada em cada uma 650 µL do tampão de lavagem W1 contendo etanol e, novamente, centrifugadas a $10.000 \times g$ por 1 minuto. Posteriormente, o *pellet* foi descartado e centrifugado na velocidade máxima $14.000 \times g$ por 3 minutos com a tampa aberta, para a completa remoção do etanol. Como passo final o DNA foi eluído, para isso as colunas foram colocadas em tubos de eluição limpos de 1,7 mL e, em cada coluna, foi adicionado 50 µL de tampão de eluição. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida foram centrifugadas em

velocidade $14.000 \times g$ por 2 minutos. Os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20°C até o momento de uso.

2.6 Reação de Sequenciamento para confirmação dos fragmentos

O método de sequenciamento utilizando foi Sanger *et al.* (1977) com o uso do Kit ABI Prism™ Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Reading Reaction (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento foram utilizados: 5,7 μL de H_2O ; 2,0 μL de Buffer; 1 μL de primer *cyt1Aa Forward* (3,3 pmol/ μL); 1,0 μL de DNA e 0,3 μL de *Big Dye*.

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços, com a utilização de termociclador, programado de acordo com as seguintes condições: 96°C por 60 seg, seguidos de 35 ciclos 96°C por 10 seg, 50°C por 3º seg, 60°C por 4 min e por fim 60°C por 10 seg. Após a reação, as amostras foram precipitadas para a retirada do excesso de reagentes não incorporados. O protocolo para precipitação consistiu das seguintes etapas: submeteu-se a placa a um *spin* (centrífuga de placa), posteriormente adicionou-se 30 μL da mix contendo 2,5 μL de EDTA (125 mM) e 27,5 μL de etanol 100% marca Merck; a placa foi vedada, as amostras foram misturadas no vórtex até ser observada homogeneidade. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2.500 rcf por 30 minutos, na temperatura de 4°C , a placa foi imediatamente invertida em papel toalha e centrifugada por 1 minuto a 100 rcf.

Posteriormente, foram adicionados 30 μL de etanol 70 % a cada amostra, em seguida centrifugada a 1.450 rcf por 15 minutos, na temperatura de 4°C . A placa foi invertida imediatamente em papel toalha e centrifugada por 1 minuto a 100 rcf. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C , por aproximadamente 40 minutos para o etanol evaporar completamente e, as amostras foram ressuspensas em 10 μL de formamida Hi Di™, e submetidas ao vórtex.

Após a precipitação, o produto da reação foi submetido ao sequenciador automático de DNA (ABI 3130/Life Technologies) para obtenção das sequências. A qualidade das sequências foi analisada pelo programa Genious versão 10.2.3 (Drummond *et al.* 2011).

2.7 Alinhamento, edição e comparação das sequências do gene *cytIAa*

As sequências do gene *cytIAa* foram conferidas e editadas no programa BioEdit Version 7.2.6.1 (Hall 1999). O alinhamento das sequências foi feito com o auxílio da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1996). Após a edição manual das sequências aos sítios que apresentaram deleções ou inserções (*indels*) foram acrescentados *gaps* com a finalidade de manter a homologia entre os sítios. Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3. RESULTADOS

3.1 Frequência dos genes *cyt1Aa* isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Por meio da utilização da técnica de reação de PCR foi possível obter fragmentos de DNA do tamanho esperado para o gene *cyt1Aa* nos isolados de *B. thuringiensis* obtidos do solo dos três biomas, além das linhagens de insetos e de água. Do total de 1.448 isolados de *B. thuringiensis* analisados, 33 (2,3 %) apresentaram amplificação positiva, para os quais foram obtidos fragmentos de cerca de 300 pares de base (Figuras 2 e 3).

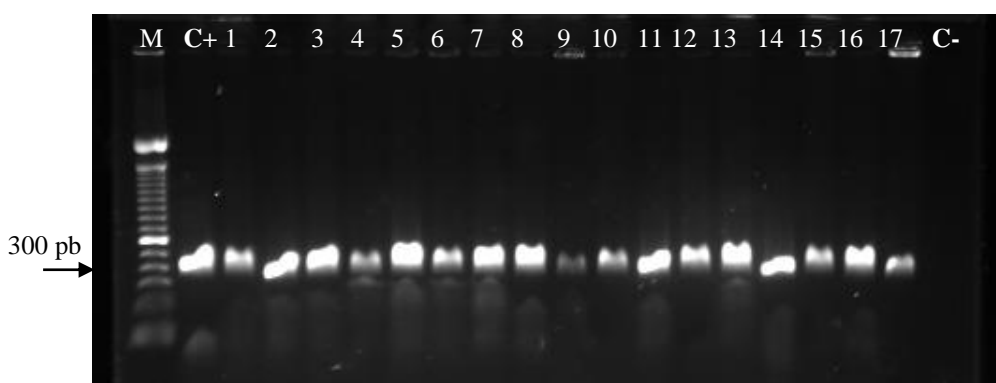


Figura 2. Perfil de amplificação do gene *cyt1Aa* em 17 isolados de *Bacillus thuringiensis*, obtidos de amostras de solo do bioma Cerrado (1-17), em gel de agarose 1,5% submetido a eletroforese. M = marcador Ladder 1Kb (promega), C+ = controle positivo, C- = controle negativo.

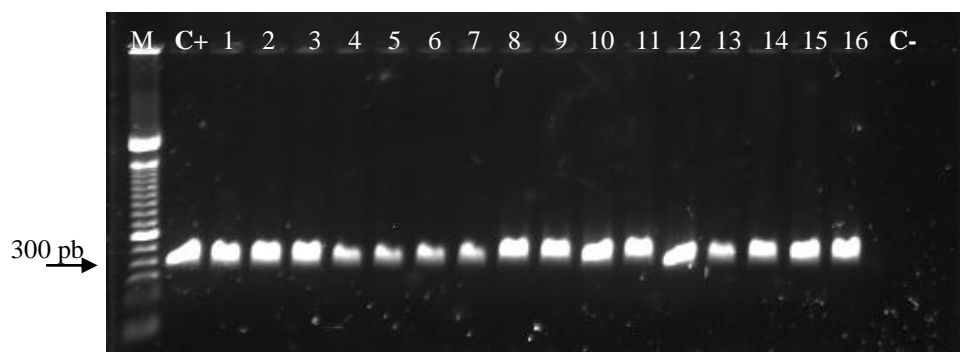


Figura 3. Perfil de amplificação do gene *cyt1Aa* em isolados de *Bacillus thuringiensis*: solo da Amazônia (1-4); solo da caatinga (5); insetos (6-14); água (15 e 16) coletados no bioma cerrado, em gel de agarose 1,5% submetido a eletroforese. M = marcador Ladder 1Kb (promega), C+ = controle positivo, C- = controle negativo.

A maior frequência de isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa* foi obtida em isolados para o Bioma Cerrado: solo e de insetos, ambos com 3,4% (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de isolados *Bacillus thuringiensis*, por substrato de isolamento, que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*.

Bioma	Nº isolados	Positivas para gene <i>cyt1Aa</i> (%)
Amazônia/solo	317	4 (1,2)
Caatinga/solo	71	1 (1,4)
Cerrado/solo	497	17 (3,4)
Cerrado/insetos	267	9 (3,4)
Cerrado/água	296	2 (0,67)
Total	1.448	33 (2,3 %)

Dentre os isolados de *B. thuringiensis* com amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*, 20 foram selecionados para o sequenciamento, com base na atividade larvicida para *Ae. aegypti*, conforme ensaios prévios e, substratos de isolamento (Soares-da-Silva *et al.*, 2017). Foram selecionados isolados com características extremas, ou seja, com baixa e/ou nenhuma

atividade larvívica para *Ae. aegypti* e com elevada atividade larvívica, a fim de verificar se essas diferenças poderiam estar associadas a polimorfismos nas sequências do gene *cyt1Aa*.

Quanto ao Bioma Amazônia foram utilizadas as linhagens BtMA-36 e BtMA-750, com baixa e elevada toxicidade, respectivamente. Em relação aos isolados do Cerrado, foram utilizados os isolados BtMA-527, BtMA-566, BtMA-578, BtMA-618 e BtMA-634, como as linhagens de baixa atividade e também os isolados BtMA-679, BtMA-680, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-688, BtMA-690 e 694 com elevada toxicidade. Quanto aos isolados da água, os dois obtidos foram analisados e, para Caatinga somente um isolado BtMA-703 amplificou fragmento compatível com *cyt1Aa*, o qual foi utilizado para sequenciar. Em relação às amostras de insetos, foram sequenciados três isolados BtMA-154, BtMA-1024 e BtMA-1061 que apresentaram baixa atividade larvívica e BtMA-1114, BtMA-1118 e BtMA-1120 que apresentaram atividade larvívica (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *Bacillus thuringiensis* que apresentaram amplificação positiva para o gene *cytIAa*, por bioma e substrato de isolamento, dados da localização de origem e atividade larvicida para *Aedes aegypti*.

Bioma/substrato de Isolamento	Linhagem	Coordenadas geográfica (GPS)		Cidade (MA)	Atividade larvicida	
AMAZÔNIA/solo	BtMA-36	03°13'12.3"S	045°08'88.7"W	Viana	+	
	BtMA-237	03°85'73.3"S	045°53'49.2"W	Santa Inês	++	
	BtMA-241	03°85'73.3"S	045°53'49.2"W	Santa Inês	++	
	BtMA-750	02°27'56.5"S	044°11'43.2"W	S.J.de Ribamar	++++	
CERRADO/solo	BtMA-527	07°22'55.5"S	044°55'97.2"W	Benedito Leite	++	
	BtMA-566	07°53'53.3"S	046°03'91.1"W	Balsas	+	
	BtMA-578	07°34'90.0"S	046°60'46.4"W	Riachão	+	
	BtMA-618	03°89'88.8"S	042°94'34.5"W	Buriti	+	
	BtMA-634	04°23'37.7"S	043°01'40.6"W	Coelho Neto	-	
	BtMA-676	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-679	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-680	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	-	
	BtMA-681	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-682	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	+++	
	BtMA-684	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-685	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-687	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-688	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-689	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-690	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	++++	
	BtMA-694	04°13'72.5"S	042°94'91.8"W	Duque Bacelar	+++	
	CERRADO/água	BtMAq-56	-	-	Caxias	?
		BtMAq-128	-	-	Caxias	?
CERRADO/insetos	BtMA-154	Inseto/Coleoptera 1		Mirador	-	
	BtMA-1024	Inseto/Hymenoptera 1		Mirador	++	
	BtMA-1061	Inseto/Hymenoptera 2		Mirador	+++	
	BtMA-1114	Inseto/Coleoptera 2		Mirador	++++	
	BtMA-1115	Inseto/Coleoptera 2			+++	
	BtMA-1116	Inseto/Coleoptera 2		Mirador	+++	
	BtMA-1118	Inseto/Coleoptera 2		Mirador	+++	
	BtMA-1119	Inseto/Coleoptera 2		Mirador	+++	
	BtMA-1120	Inseto/Coleoptera 2		Mirador	+++	
CAATINGA/solo	BtMA-703	03°48'34.6"S	042°55'59.8"W	Santa Quitéria	++++	

Fonte: Banco de Bacillus entomopatogênico do Maranhão. **Legenda:** ++++ Mortalidade > 80%; +++ = Mortalidade 50% ≤ 80%; ++ = mortalidade 30 ≤ 50%; + = mortalidade ≥ 30%; - = sem mortalidade; ? = sem informações de toxicidade (Dados de Soares-da-Silva *et al.* 2017; Vieira-Neta *et al.* 2016; Lobo 2015). Os isolados em negritos foram utilizados para o sequenciamento.

3.2 Diversidade e polimorfismo das sequências do gene *cytIAa*

O sequenciamento do gene *cytIAa* evidenciou que para essa região de 300 bp o gene é bastante conservado, não tendo sido encontrada qualquer variação de bases para nenhum dos isolados em estudo. Portanto, não foi registrado nenhum polimorfismo na sequência do gene

entre as diferentes origens das amostras analisadas, como atesta o alinhamento das sequências abaixo (Figura 4).

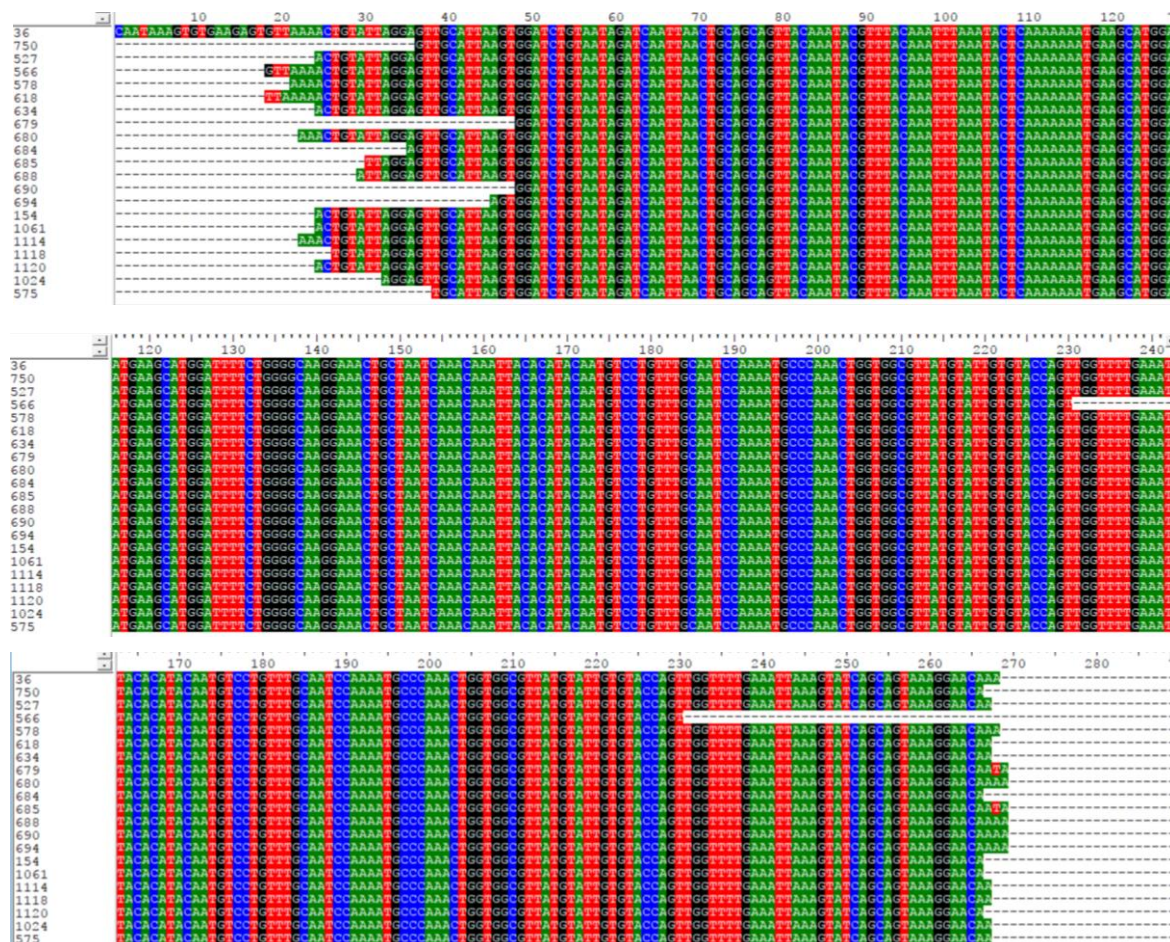


Figura 4. Alinhamento das sequências 300 pares de bases do gene *cyt1Aa* dos isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de diferentes substratos.

A sequência obtida para o gene *cyt1Aa* dos isolados de *B. thuringiensis* analisados no presente estudo apresentaram 100% de identidade com 19 sequências de *cyt1* depositadas no banco de dados GenBank, sendo 10 sequenciadas a partir de linhagens *B. thuringiensis israelensis*, as demais de isolados de *B. thuringiensis* de diferentes origens (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da sequência do gene *cyt1Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos de diferentes substratos do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blastn, no NCBI.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	Evalue	Ident	Acession
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis strain 1.24 plasmid pTO124-4, complete sequence	448	448	100%	4e-122	100%	KY352353.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis strain BRC-HQY1 cytolytic toxin Cyt1 (cyt1) gene, complete cds	448	448	100%	4e-122	100%	KF152888.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis plasmid pBTI-6 DNA, complete sequence, strain: HD522	448	448	100%	4e-122	100%	LC128536.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis strain AM65-52 plasmid pAM65-52-4-128K, complete sequence	448	448	100%	4e-122	100%	CP013279.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 plasmid pBTHD789-3, complete sequence	448	448	100%	4e-122	100%	CP003766.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis Cyt1A97 (cyt1A) gene, cyt1A97 allele, complete cds	448	448	100%	4e-122	100%	EF656359.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain LLP29 cytolytic toxin Cyt1 gene, complete cds	448	448	100%	4e-122	100%	DQ302752.2
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PBT602 megaplasmid Cyt gene, complete cds	448	448	100%	4e-122	100%	AY913951.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. israelenses plasmid pBtoxis	448	448	100%	4e-122	100%	AL731825.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelenses gene for delta endotoxin	448	448	100%	4e-122	100%	X04338.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> gene for crystal protein (Mr 28 000)	448	448	100%	4e-122	100%	X03182.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> gene for 27 kDa crystal protein	448	448	100%	4e-122	100%	Y00135.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> 27.3 kd cytolytic insecticidal protein gene, complete cds	448	448	100%	4e-122	100%	M35968.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelenses strain RJ98 cytolytic protein Cyt1Ar (cyt1Ar) gene, complete cds	442	442	100%	2e-120	99%	JF445289.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. israelensis pBtoxis plasmid, subclone pTOX11a	438	438	100%	3e-119	99%	AJ296639.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain FWO dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt) gene, partial cds	375	375	83%	2e-100	100%	EF649750.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain DDN dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt) gene, partial cds	353	353	78%	1e-93	100%	EF649748.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain DEP2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt) gene, partial cds	351	351	78%	4e-93	100%	EF649747.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BYW2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt) gene, partial cds	351	351	78%	4e-93	100%	EF649746.1

4. DISCUSSÃO

A frequência de linhagens de *B. thuringiensis* que possui o gene da *cyt* tem sido investigada em diversas coleções dessa bactéria, principalmente quando se objetiva encontrar isolados com ação específica para mosquitos. No presente estudo verificou-se que a ocorrência de linhagens que amplificaram fragmentos para o gene *cyt1Aa* é baixa, com percentual geral foi em torno de 2%.

Estudos realizados com isolados obtidos de diferentes regiões do mundo constataram a baixa ocorrência do gene *cyt1Aa* em *B. thuringiensis* o que evidencia a baixa frequência de genes da família *cyt* em isolados nativos obtidos de diferentes substratos e em diferentes localidades (Bravo *et al.* 1998; Ibarra *et al.* 2003; Costa *et al.* 2010; Costa *et al.* 2014).

A caracterização de isolados de *B. thuringiensis* obtidos de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil mostrou resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho. Costa *et al.* (2010) obtiveram amplificação positiva para os genes da família *cyt*, somente em torno de 1% das 1.073 linhagens de *B. thuringiensis* analisadas, as quais foram obtidas de diferentes regiões do país, verificou-se que entre os genes *cyt* investigados, *cyt1Aa* foi o mais frequente, com 1,7%, seguido de 1,1% *cyt2Aa* e 0,6% de *cyt1Ab*. Costa *et al.* (2014) também constataram que somente 1,2% (6) de 500 linhagens analisadas apresentaram amplificação positiva para os genes *cyt1Aa*.

A frequência de *B. thuringiensis* isolados de diferentes países que apresentaram o gene *cyt* é bastante variável. Na China, de 143 linhagens de *B. thuringiensis* pesquisadas foram encontradas nove que amplificaram para os genes *cyt*, três foram confirmadas como *cyt1Aa* (2,0%) (Wu *et al.* 2008), percentual igual ao verificado no presente estudo. No Irã, em isolados obtidos de diferentes áreas geográficas, constatou-se que os genes *cyt1* foram os menos abundantes nas três áreas ecológicas estudadas, com índice de 8 a 12%. Esses autores também buscaram relacionar a presença de isolados com gene *cyt1Aa* a um determinado ambiente, verificaram que os resultados foram semelhantes para as três zonas investigadas, entretanto, o menor índice foi obtido para a região seca e semi-seca (Jouzani *et al.* 2008).

O índice de *B. thuringiensis* isolados de diversas regiões do México no qual foi detectado o gene *cyt* foi de 7,9%, valor três vezes maior que o obtido no presente estudo. Contudo, não foi utilizado *primer* específico para o gene *cyt1Aa*. Destacou-se a maior ocorrência de linhagem com gene *cyt* em isolados obtidos em regiões tropicais, quando comparado à região de semi-árido (Bravo *et al.* 1998).

Para o presente trabalho, apesar das diferenças dos três biomas estudados, não houve diferença na frequência de isolados que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*, principalmente quando comparado o percentual obtido para a Caatinga, região mais seca, e Amazônia, região com alto índice de chuva (IBGE 2017). Contudo, foi observada que para as amostras de água foi obtido menor percentual de isolados que amplificaram para o gene estudado. No entanto, não foi realizada análise estatística para esses dados.

A baixa frequência do gene *cyt1Aa* em isolados *B. thuringiensis* pode estar relacionada ao baixo índice de linhagens nativas encontradas com ação inseticida para mosquitos, pois sabe-se que essa toxina é específica para esse grupo de inseto e age em sinergismo principalmente com toxinas Cry mosquito específicas (Costal *et al.* 2010; Campanini *et al.* 2012). Estudos de seleção de isolados ativos para larvas de mosquitos, evidenciaram que somente cerca de 1% dos isolados mostram efetividade para esse grupo de insetos e, quando caracterizados por meio de PCR, constatou-se a presença do gene *cyt1Aa* (Costa *et al.* 2010; Santos *et al.* 2012).

No presente estudo, entre os isolados nos quais foram detectados a presença do gene *cyt1Aa*, pelo menos 85% apresentam algum nível de toxicidade para larvas de *Ae. aegypti*, o que sugere a especificidade dessa toxina e seu papel na atividade inseticida de *B. thuringiensis* para mosquitos, corroborando com os estudos já realizados.

Em *B. thuringiensis* obtidos dos mais diversos ecossistemas, constatou-se a presença desse gene em isolados com toxicidade para diferentes espécies de mosquitos. Jouzani *et al.* (2008) também verificaram que para os isolados que demonstraram maior atividade larvicida para os mosquitos *Ae. aegypti*, *Cx. quiquefasciatus* e *Anopheles albimanus* Wiedemann 1820, todos apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa*. A presença do gene *cyt1* também foi constatada em isolados de *B. thuringiensis* obtidos do solo da Arábia Saudita, com atividade larvicida para *Anopheles gambiae* Patton, 1905 (El-Kersh *et al.* 2016).

A toxina Cyt1Aa em isolados de *B. thuringiensis* tóxicos para mosquitos tem sido investigada para entender o mecanismo de ação e sinergismo entre os diferentes fatores de virulência de *B. thuringiensis*, principalmente entre Cry e Cyt, pois ambas sendo expressas pela mesma bactéria durante a esporulação, podem agir em conjunto e aumentar a toxicidade geral de um isolado, o que é demonstrado pelas evidências de sinergismo entre elas, e pela descrição contínua de isolados nativos com a presença de ambas (Pérez *et al.* 2005; Bravo *et al.* 2007; Oestergaard *et al.* 2007; Frankenhuyzen 2009; 2013; Bravo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2016).

É importante ressaltar que a atividade larvicida de Cyt1Aa é baixa para os três gêneros de mosquito *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, entretanto pode aumentar o potencial de toxicidade de linhagens de *B. thuringiensis* para mosquitos. Essa toxina é altamente mosquito específica *in vivo*, o que favorece o uso em combinação com outras toxinas (Ben-Dov 2014). Outra característica interessante é que a presença da toxina Cyt1Aa pode retardar o aparecimento de populações resistentes mesmo sob constante pressão de seleção. Fato constatado em condição de laboratório para larvas de *Cx. quinquefasciatus*, após mais de 60 gerações em constante aplicação do biolarvicida (Wirth *et al.* 2015), o que também foi evidenciado para larvas de *Ae. aegypti* (Stalinski *et al.* 2016).

Geralmente os estudos de seleção de linhagens com ação para mosquitos são realizados por meio da caracterização molecular dos genes *cry*, com ênfase para *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cry10Aa* (Soares-da-Silva *et al.* 2015; Sun *et al.* 2013). Além disso, vários estudos são realizados para verificar variações nos genes *cry*, o que resultou na descrição de variedade de toxinas Cry, ativas para vários grupos de insetos. Atualmente, já foram descritas diversas subclasses dessas proteínas (Sauka *et al.* 2006; 2010; Alves *et al.* 2011; Crickmore *et al.* 2017).

Por outro lado, para as toxinas Cyt o número de genes descritos na literatura é baixo quando comparado com os genes *cry* (Crickmore *et al.* 2017). Poucos estudos foram realizados para verificar polimorfismo nos genes *cyt* em linhagens nativas (Wu *et al.* 2008; Costa *et al.* 2014). Considerando a toxina Cyt1Aa, apesar de ser a mais estudada, há poucas informações sobre a sua distribuição na natureza. Até o momento foram descritas sete sequências para esse gene, todas se mostraram bastante conservadas. Não foi verificada variação de bases nessas sequências (Crickmore 2017).

No presente estudo, no qual buscou-se sequenciar o gene *cyt1Aa* de isolados nativos, obtidos de diferentes fontes, foi constatada a característica conservada do gene que codifica para a toxina Cyt1Aa, apesar de ter sido investigada em 1.448 isolados.

Costa *et al.* (2014) investigou o polimorfismo de genes *cyt* em linhagens nativas de todas as regiões do Brasil, também não detectaram nenhuma variação para os genes *cyt1Aa*, mesmo utilizando oligonucleotídeos desenhados para regiões variáveis. Tais achados confirmam a característica conservada dos genes *cyt*, resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, mesmo sendo utilizado oligonucleotídeo de aproximadamente 300 pares de base desenhado para região conservada do gene.

Em isolados nativos da China também não foi encontrado polimorfismo para o gene *cyt1*, pois as linhagens que amplificaram para esse gene apresentaram 100% de identidade com *cyt1Aa* (Wu *et al.* 2008).

Em contraponto, para os outros fatores de virulência, como as toxinas Vip e Cry, tem sido verificado polimorfismo genético com a presença de diferentes haplótipos e, variações gênicas, detectados por meio das técnicas como PCR-RFLP e RAPD, como também por sequenciamento, o que foi verificado em coleções de *B. thuringiensis* em diferentes regiões do mundo (Sauka *et al.* 2010; Alves *et al.* 2011; Salama *et al.* 2015; Boukedi *et al.* 2016).

Há na literatura maior registro da diversidade e frequências para genes *cry* codificadores para proteínas inseticidas em comparação com os genes *cyt* (Sauka e Benintende 2017). Foi observada característica conservada das sequências do gene *cyt1Aa* obtidas para o presente trabalho, mesmo sequenciando linhagens isoladas de diferentes substratos, obtidos de biomas distintos, Amazônia, Cerrado (solo, água e insetos) e Caatinga. Esses dados evidenciam a sua ampla distribuição, considerando que foram encontrados em todos os tipos de ambientes pesquisados.

Os isolados de *B. thuringiensis* obtidos de insetos que apresentaram amplificação positiva para o gene *cyt1Aa* foram isoladas das ordens Hymenoptera e Coleoptera, e não há indícios de atividade de toxinas Cyt para a primeira. Esses achados apotam a necessidade de estudos de cunho ecológico para entender as relações entre o entomopatôgeno com os insetos de diferentes ordens.

A ecologia de *B. thuringiensis* é muito complexa e pouco estudada, o que dificulta a compreensão das relações entre a presença de uma determinada toxina com o tipo de ambiente de onde ocorreu o isolamento da linhagem, pois isolados de *B. thuringiensis* com patogenicidade para um determinado grupo de inseto são encontrados em grande número nos ambientes não habitados por seus alvos (Raymond *et al.* 2010).

Alguns estudos buscaram associar em laboratório a toxicidade de Cyt *in vivo* para larvas de outros grupos de insetos. Apesar de terem sido encontradas toxinas Cyt, entre elas Cyt1Aa, em linhagens com ação tóxica para outros insetos, há controvérsias na participação dessas toxinas na ação de *B. thuringiensis* na patogenicidade para esses indivíduos (Costa *et al.* 2014). Até o momento existem evidências de algumas toxinas Cyt com patogenicidade para as larvas da ordem Coleoptera, da família Chrysomelidae, por exemplo, Cyt1Aa é tóxica para *Chrysomela scripta* Fabricius e Cyt2Ca é tóxica para *Leptinotarsa decemlineata* (Say) e *Diabrotica* spp, Chevrolat in Dejean (Soberón *et al.* 2013).

A característica conservada das toxinas Cyt, é um forte indício de que essas toxinas desempenham um papel muito importante na natureza relacionada à toxicidade de *B. thuringiensis* e, a presença em maior abundância em linhagens para mosquitos, evidencia a especificidade dessas toxinas para esse grupo de insetos. A toxina Cyt1Aa atua como receptor de toxinas Cry nos mosquitos e, tem demonstrado alta afinidade de interação com a Cry11Aa, que por vez, é importante toxina Cry com ação para mosquitos (Perez *et al.* 2005; Stalinski *et al.* 2016).

Outro forte indício da especificidade da Cyt1Aa para mosquitos está no alto nível de síntese dessa toxina durante a esporulação de *Bacillus thuringiensis israelensis*, pois essa proteína ocupe mais de 50% do seu corpo parasporal, o que ocorre devido a vários fatores, incluindo três fortes promotores dependentes da esporulação. *B. thuringiensis israelensis* parece ter todas as condições para expressão de Cyt1Aa de forma eficiente para agir em sinergismos com as Cry (Ben-Dov 2014).

Segundo Soberón *et al.* (2013) as análises filogenéticas de toxinas Cyt de *B. thuringiensis* com proteínas encontradas em outras bactérias e fungos patogênicos indicam que essas toxinas possivelmente podem ter sido selecionadas por vários organismos patogênicos para exercer seu fenótipo de virulência, contudo mais análises precisam ser feitas para elucidar o papel dessas toxinas para esses outros organismos.

Em todos os isolados *B. thuringiensis* tóxicos para larvas de *Ae. aegypti* houve a presença do gene *cyt1Aa* o que demonstra a importância desse gene na patogenicidade dessa bactéria para mosquitos. Contudo, estudos sobre o mecanismo de ação das toxinas citolíticas no epitélio intestinal de mosquitos e o sinergismo dessas toxinas devem ser investigados para elucidar as interações entre ambas.

Considerando as linhagens de *B. thuringiensis* que apresentaram o gene *cyt1Aa* analisada no presente trabalho, em 13 linhagens verificou-se perfil gênico semelhante a *B. thuringiensis israelensis* (Soares-da-Silva *et al.* 2017).

Diante da seletividade de Cyt1Aa para mosquitos, da sua presença fortemente associada às toxinas Cry mosquitocida e da sua característica conservada no ambiente, sugere-se que o estudo de seleção de linhagens para mosquitos seja iniciado por testes moleculares para detectar a presença do gene *cyt1Aa*, pois é a partir da detecção do gene que é feita a caracterização das linhagens positivas para os demais genes *cry* mosquitocida. Desta forma, pode-se dispensar o exaustivo trabalho de laboratório com técnicas que geram custos elevados. Além disso, é importante associar os dados moleculares com os bioensaios para confirmar efetivamente a patogenicidade dos isolados.

Devido ao seu potencial de sinergismo com as toxinas Cry, o gene *cyt1Aa* tem sido empregado por técnicas de engenharia genética para produção de *B. thuringiensis* para o controle de importantes pragas agrícolas, para superar resistências às toxinas da família Cry1 (Sayyed *et al.* 2001). Contudo, ainda há controvérsia sobre o processamento da pró-toxina *in vitro*, pois dependendo dos métodos e enzimas utilizadas em laboratório, os fragmentos gerados podem apresentar respostas proteolíticas distintas (Wirth *et al.* 2005), o que justifica a necessidade de buscar linhagens nativas com a presença desse gene, no sentido de garantir o mecanismo de ação.

Mesmo considerando que até o momento os genes *cyt* apresentam caráter conservado é importante investigar mais sobre essas toxinas em linhagens nativas por meio de técnicas moleculares. No presente estudo, buscou-se sequenciar uma região de 300 pares de bases do gene *cyt1Aa*.

Portanto, verifica-se a baixa frequência de isolados com a presença do gene codificador para toxinas citolíticas Cyt1Aa, contudo, está presente em isolados de *B. thuringiensis* obtidos de diferentes fontes de isolamento, e por fim, confirma-se a característica conservada do gene e ausência de polimorfismo genético.

5. REFERÊNCIAS

- Alves, M.C.; Rossi, J.R.; Rodrigues, M.G.F.; Alves, E.C.C.; Ferraudo, A.S.; Lemos, M.V.F.; Desidério, J.A.; Fernandes, O.A. 2011. Identificação e caracterização de genes *vip* e *cry* coleóptero-específicos em isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1053-1060.
- Baig, D.N.; Mehnaz, S. 2010. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiological Research*, 165:376-383.
- Becker, N.; Margalit, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 147-170.
- Beltrão, H.B.M.; Silva-Filha, M.H.N. 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol Lett*, 266: 163-169.
- Ben-Dov, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*. 6: 1222-1243.
- Berhnaard, K.; Jarrett, P.; Meadows, M.; Butt, J.; Ellia, D.J.; Roberts, G.M.; Pauli, S.; Rodgers, P.; Burges, H.D. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 59-68.
- Berry, C.; O'Neil, S.; Ben-Dov, E.; Jones, A.F.; Murphy, L.; Quail, M.A.; Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5082-5095.
- Boukedi, H.; Sellami, S.; Ktari, S.; Hassan, N.B.B.; Sellami-Boudawara, T.; Tounsi, S.; Abdelkefi-Mesrati, L. 2016. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. *Microbiological Research*, 186: 9-15.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; et al. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4965-4972.

- Bravo, A.; Gill, S.S.; Sobéron, M. 2007. Mode de action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49:423-435.
- Bravo, A.; Likitvivatanavong, S.; Gill, S.S.; Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2415-2422.
- Campanini, E.B.; Davolos, C.C.; Alves, E.C.C.; Lemos, M.V.F. 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Brazilian Journal of Biology*, 72: 243-247.
- Cantón, P.E.; Reyes, E.Z.; De Escudero, I.R.; Bravo, A.; Soberón, M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32: 595-600.
- Chow, E.D.W.A.R.D.; Singh, G.J.; Gill, S.S. 1989. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2779-2788
- Cohen, S.; Albeck, S.; Ben-Dov, E.; Cahan, R.; Firer, M.; Zaritsky, A.; Dym, O. 2011. Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of Molecular Biology*, 413: 804-814.
- Corrêa, R.F.T.; Ardisson-Araújo, D.M.P.; Monnerat, R.G.; Ribeiro, B.M. 2012. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PloS one*, 7: e46121.
- Costa, J.R.V.; Rossi, J.R.; Marucci, S.C.; Alves, E.C.C.; Volpe, H.X.L.; Ferraudo, A.S.; Lemos, V.F.M.; Desidério, J.A. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). *Neotropical Entomology*, 39: 757-766.
- Costa, M.L.M.; Lana, U.G.P.; Barros, E.C.; Paiva, L.V.; Valicente, F.H. 2014. Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Agricultural Science*, 6: 128-137.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 807-813.

- Crickmore, N.; Bone, E.J.; Williams, J.A.; Ellar, D.J. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131: 249-254.
- Crickmore, N. 2017. Full list of delta-endotoxins (<http://www.btnomenclature.info/>). Acessado em 12 de Agosto de 2017.
- Damgaard, P.H. 2000. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: Charles, J.F; Delécluse, A.; Nielsen-LeRoux, C. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht, Kluwer Academic, Dordrecht, p. 23-40.
- El-kersh, T.A.; Ahmed, A.M.; Al-sheikh, Y.A.; Tripet, F.; Ibrahim, M.S.; Metwalli, A.A.M. 2016. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). *Parasites & Vectors*, 9: 647.
- Elleuch, J.; Jaoua, S.; Darriet, F.; Chandre, F.; Tounsi, S.; Zghal, R.Z. 2015. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 104: 83-90.
- Fernández-Luna, M.T.; Tabashnik, B.E.; Lanz-Mendoza, H.; Bravo, A.; Soberón, M.; Miranda-Ríos, J. 2010. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104: 231-233
- Frankenhuyzen, K.V. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1-16.
- Frankenhuyzen, K.V. 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 76–85
- Gill, S.S.; Hornung, J.M. 1987. Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50: 16-25.
- Glare, TR.; O'Callaghan, M. 2000 *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chicester: John Wiley. TR GlareM. O'Callaghan2000 *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. ChicesterJohn Wiley.
- Gómez, I.; Pardo-López, L.; Munoz-Garay, C.; Fernandez, L.E.; Pérez, C.; Sánchez, J.; Soberón, M.; Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28: 169-173.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*, 95: 95-98.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53: 242-255.
- IBGE, 2017. <https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>
Acesso em 10 de Agosto de 2017.
- Ibarra, J.E.; Del Rincón, M.C.; Ordúz, S.; Noiega, D.; Benintende, G.; Monnerat, R.; *et al.* 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:5269-5274.
- Jouzani, G.S.; Abad, A.P.; Seifinejade, A.; Marzban, R.; Kariman, K.; Maleki, B. 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 83-94.
- Liang, H.; Liu, Y.; Zhu, J.; Guan, P.; Li, S.; Wang, S.; Zheng, A.; Liu, H.; Li, P. 2011. Characterization of *cry2*-type genes of *Bacillus thuringiensis* strains from soil-isolated of Sichuan basin, China. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 140-146.
- Mera, M.I.O.; Villages, J.B.; Hernández-Fernández, J. 2012. LSSP-PCR to identify polymorphisms in the gene *cry1B* of *Bacillus thuringiensis* native strain. *Revista Colombiana Biotecnologia*, 19: 121-134.
- Oestergaard, J.; Ehlers, R.U.; Martínez-Ramírez, A.C.; Real, M.D. 2007. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3623-3629.
- Otieno-Ayayo, Z.N.; Zaritsky, A.; Wirth, M.C.; Manasherob, R.; Khasdan, V.; Cahan, R.; Ben-Dov, E. 2008. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental Microbiology*, 10: 2191-2199.
- Palma, L.; Muñoz, D.; Berry, C.; Murillo, J.; Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6: 3296-3325.
- Palma, L. 2017. *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides, are they as effective as they should be?. *Revista Argentina de Microbiologia*, 49:119-119.

- Pardo-López, L.; Muñoz-Garay, C.; Porta, H.; Rodríguez-Almazán, C.; Soberón, M.; Bravo, A. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 30: 589-595.
- Park, H.W.; Pino, B.C.; Kozervanich-Chong, S.; Hafkenscheid, E.A.; Oliverio, R.M.; Federici, B.A.; Bideshi, D.K. 2013. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* enhances mosquitocidal activity of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 against *Aedes aegypti* but not *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 88-91.
- Park, H.W.; Hice, R.H.; Federici, B. 2016. A. Effect of promoters and plasmid copy number on Cyt1A synthesis and crystal assembly in *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 72: 33-40.
- Pérez, C.; Fernandez, L.E.; Sun, J.; Folch, J.L.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18303-18308.
- Pinto, L.M.N.; Azambuja, A.O.; Diehl, E.; Fiuza, L.M. 2003. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63: 301-306.
- Promdonkoy, B.; Promdonkoy, P.; Panyim S. 2005. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 121–126.
- Raymond, B.; Johnston, P.R.; Nielsen-LeRoux, C.; Lereclus, D.; Crickmore, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. *Trends in microbiology*, 18(5): 189-194.
- Salama, H.S.; El-Ghany, N.M.A.; Saker, M.M. 2015. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13: 101-109.
- Sanger, F.; Nichlen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *National Academy of Sciences*, 74: 5463-5468.
- Santos, F.P.; Lopes, J.; Vilas-Bôas, G.T.; Zequi, J.A.C. 2012. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 122: 64-70.
- Sauka, D.H.; Monella, R.H.; Benintende, G.B. 2010. Detection of the mosquitocidal toxin genes encoding Cry11 proteins from *Bacillus thuringiensis* using a novel PCR-RFLP method. *Revista Argentina de Microbiologi*, 42: 23-26.

- Sauka, D.H.; Cozzi, J.G.; Benintende, G.B. 2006. Detection and identification of cryII genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Current microbiology*, 52: 60-63
- Sauka, D.H.; Benintende, G.B. 2017. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 273-281.
- Sayed, A.H.; Crickmore, N.; Wright, D.J. 2001. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Is Toxic to the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and Synergizes the Activity of Cry1Ac towards a Resistant Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5859-5861.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775-806.
- Soares-da-Silva, J.; Pinheiro, V.C.S.; Litaiff-Abreu, E.; Polanzyk, R.A.; Tadei, W.P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 59: 1-6.
- Soares-da-Silva, J.; Queirós, S.G.; Aguiar, J.S.; Viana, J.L.; Neta, M. R.A.V.; Silva, M. C.; Pinheiro, V.C.S.; Polanzyk, R.A.; Carvalho-Zilse, G.A.; Tadei, W.P. 2017. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. *Acta Tropica*, 176: 197-205.
- Soberón, M.; Pardo, L.; Muñoz-Garay, C.; Sánchez, J.; Gómez, I.; Porta, H.; Bravo, A. 2010. Pore formation by Cry toxins. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation*, Springer New York, 127-142.
- Soberón, M.; López-Díaz, J.A.; Bravo, A. 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41: 87-93.
- Stalinski, R.; Laporte, F.; Tetreau, G.; Després, L. 2016. Receptors are affected by selection with each *Bacillus thuringiensis israelensis* Cry toxin but not with the full *Bti* mixture in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*, 44: 218-227.
- Starnbach, M.N.; Falkow, S.; Tompkins, L.S. 1989. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 27:1257-1261.

- Sun, Y.; Zhao, Q.; Xia, L.; Ding, X.; Hu, Q.; Federici, B.A.; Park, H.W. 2013. Identification and characterization of three previously undescribed crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3364-3370.
- Thiery, I.; Delecluse, A.; Tamayo, M. C.; Orduz, S. 1997. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 468-473.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1996. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tokcaer, Z.; Bayraktar, E.; Mehmetoğlu, Ü.; Özcengiz, G.; Alaeddinoğlu, N.G. 2006. Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. *Process Biochemistry*, 41: 350-355.
- Vieira-Neta, M.R. A. 2016. *Seleção e caracterização molecular de Bacillus thuringiensis Berliner (1911) da restinga e mangue para o controle de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, Maranhão. 53p.
- Vilas-Bôas, G.T.; Alvarez, R.C.; dos Santos, C.A.; Vilas-Boas, L.A. 2012. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. *EntomoBrasilis*, 5: 1-10.
- Wirth, M.C.; Park, H.W.; Walton, W.E.; Federici, B.A. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 185-189.
- Wirth, M.C.; Walton, W.E.; Federici, B.A. 2015. Evolution of resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) selected with a recombinant *Bacillus thuringiensis* strain-producing Cyt1Aa and Cry11Ba, and the binary toxin, Bin, from *Lysinibacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*, 52: 1028-1035.
- Wu, Y.; Gao, M.; Dai, S.; Yi, D.; Fan, H. 2008. Investigation of the cyt gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of Bt isolates from the soil of China. *Biological Control*, 47: 335-339.
- Zhang, Q.; Hua, G.; Adang, M.J. 2016. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 24:714-729.

SÍNTESE

Com a realização do presente estudo foi possível contribuir com o conhecimento sobre a seleção de isolados de *B. thuringiensis* obtidos de biomas brasileiros com ação em larvas de mosquitos de importância para a saúde pública.

No capítulo I verificou-se que os índices de isolados de *B. thuringiensis* com patogenicidade para larvas de mosquitos no geral foi em torno 2%. Foram obtidas linhagens de *B. thuringiensis* isolados de solo e insetos mortos que apresentam potencial para o controle de *Ae. aegypti*, *Cx. quiquefasciatus* e *An. darlingi*. Os isolados BtMA-690 e BtMA-1114, obtidos de solo e insetos respectivamente, foram os que apresentaram maior toxicidade para larvas de *Ae. aegypti* em laboratório, com valores de CL₅₀ e CL₉₀ semelhante a cepa padrão *B. thuringiensis* subsp *israelensis*.

No capítulo II foi realizado a seleção de isolados de *B. thuringiensis* com patogenicidade larvas de *An. darlingi*, para o qual, verificou-se que os isolados BtMA-689 e BtMA-690 foram os mais tóxicos, com CL₅₀ e CL₉₀ menores que a cepa padrão. Esses dados são inéditos, pois não havia estudos de seleção de isolados de *B. thuringiensis* para larvas de *An. darlingi*.

No capítulo III foi verificado a baixa frequência de isolados de *B. thuringiensis* com a presença do gene *cytIAa*, nos três biomas estudados. Constatou-se que o gene *cytIAa* é conservado, pois para a região de 300 pares de bases não foi verificado polimorfismo.

O conhecimento adquirido com a presente tese contribuiu para obter novos isolados de *B. thuringiensis* promissores para o controle de três importantes mosquitos transmissores de agentes patogênicos ao homem: *Ae. aegypti*, *Cx. quiquefasciatus* e *An. darlingi*. A perspectiva é continuar os estudos com as linhagens tóxicas, com a realização de testes em condições simuladas de campo e, encapsulamento para melhorar a persistência da bactéria nas condições dos ambientes tropicais, onde há maiores registros dessas doenças, cujo os agentes etiológicos são transmitidos por vetores.

Anexo

Acta Tropica 176 (2017) 197–205



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance



Joelma Soares-da-Silva^{a,b,*}, Silmara Gomes Queirós^c, Jéssica S. de Aguiar^c, Juliete L. Viana^c, Maria dos R.A.V. Neta^c, Maria C. da Silva^c, Valéria C.S. Pinheiro^c, Ricardo A. Polanczyk^d, Gislene A. Carvalho-Zilse^e, Wanderli P. Tadei^b

^a Curso Ciências Naturais, Campus VII, Universidade Federal do Maranhão, Avenida Dr. José Anselmo, 2008, São Sebastião, Codó, Maranhão, 65400-000, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brazil

^c Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Química e Biologia, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, Caxias, Maranhão, 65604-380, Brazil

^d Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodos Praga, Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Paulo Donato Castellane s/n., Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brazil

^e Grupo de Pesquisas em Abelhas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Avenida André Araújo, 2936, Petrópolis, Manaus, Amazonas, 69067-375, Brazil

ARTICLE INFO

ABSTRACT