

AVALIAÇÃO DE UMA COLÔNIA DE *Aedes Aegypti* SELECIONADA CONTINUAMENTE COM O BIOLARVICIDA *BACILLUS THURINGIENSIS* SVAR. *ISRAELENSIS*

Vitória Maciel^{1,*}, Karine Carvalho², Maria Helena Neves³

¹Depto. de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ, Recife-PE, Brasil

*vitoriamaciel@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O *B. thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti) é um importante agente de controle de larvas de *Aedes aegypti*. A sua atividade larvicida deve-se a cristais produzidos durante a esporulação que possuem quatro protoxinas denominadas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A (Fig. 1). O modo de ação do Bti consiste das seguintes etapas: ingestão dos cristais, processamento intestinal das protoxinas em toxinas e ligação a receptores específicos. O Bti tem sendo utilizado com sucesso desde 1980 sem registro de resistência e isso se deve, sobretudo, ao complexo modo de ação de suas múltiplas toxinas (Regis et al., 2000; Wirth, 2010). Apesar do baixo potencial de resistência associado ao uso do Bti, é necessário avaliar este risco devido à capacidade adaptativa das populações de *Aedes*, e pelo fato do tratamento com Bti ser contínuo em regiões tropicais que favorecem a proliferação do vetor durante todo o ano.

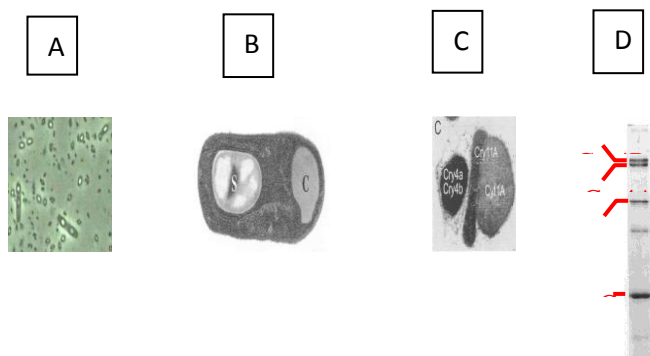


Fig.1. *Bacillus thuringiensis israelensis*. A. Cultura. B. Célula em esporulação com esporo (S) e cristal (C). C. Cristal e protoxinas. D. Perfil em SDS-PAGE das protoxinas do cristal.

Sendo assim, o principal objetivo do meu trabalho é avaliar a colônia de *Ae. aegypti* (RecBti) exposta continuamente ao Bti em laboratório, simulando a pressão de seleção de uma rotina de tratamentos em campo. Os seguintes aspectos foram avaliados: suscetibilidade ao Bti, às toxinas isoladas do Bti, ao temephos e padrão de atividade de enzimas detoxificadoras de inseticidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Colônias. Rockefeller (referência) e RecBti (teste) foram mantidas sob condições de insetário.

Inseticidas. Bti Vectobac WDG® foi usado na seleção, e pós técnicos de Bti (IPS82), de toxinas recombinantes Cry11A e Cry4B e de temephos (Sigma) nos bioensaios.

Seleção de larvas. A RecBti foi obtida a partir de ovos coletados em Recife. Amostras de no mínimo 5.000 larvas (3° instar) de cada geração foram tratadas com uma dose de VectoBac® capaz de causar uma mortalidade >50% após 24h. Os sobreviventes foram mantidos até a fase adulta para formar a geração seguinte (Fig. 2).

Bioensaio. As concentrações letais para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de larvas expostas aos compostos testados foram através da análise de próbites.

Atividade de enzimas detoxificadoras. A atividade de glutatona-S-transferases (GST), α-esterases, β-esterases, e oxidases de função mista (MFO) foram avaliadas a partir de protocolo adaptado (Brasil, 2006), para larvas.

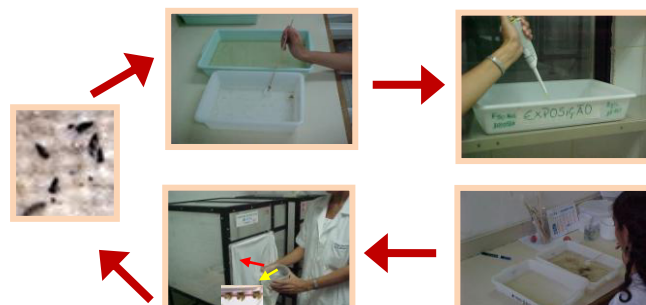


Fig.2. Principais etapas do procedimento de seleção de larvas colônia RecBti com Bti (Vetobac®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção da colônia RecBti com Bti

A colônia RecBti foi selecionada, até o momento, por 26 gerações. Em cada geração pelo menos 5.000 larvas do 3° estágio foram tratadas (Bti-VectoBac WG®), totalizando mais de 260.000 larvas expostas e a mortalidade média por geração foi de 75%.

Suscetibilidade de RecBti ao Bti, às toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e temephos

A suscetibilidade das larvas RecBti ao Bti e à toxina Cry4Ba não apresentou alterações significativas, pois, as razões de toxicidade ($RT = CL \text{ colônia teste} / CL \text{ colônia referência}$) mostraram aumentos inferiores a cinco vezes (Fig. 3) nas gerações analisadas. A suscetibilidade ao temephos, analisada na F_{19} e F_{25} foi similar à colônia de referência e a razão RT entre as concentrações letais foi inferior a 2 (Tabela 1).

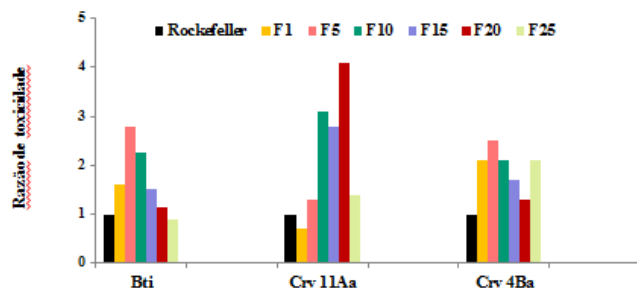


Fig. 3. Razão de toxicidade entre as LC_{50} do Bti, Cry11Aa e Cry4Ba, para larvas da colônia RecBti, e as respectivas LC_{50} para larvas da colônia Rockefeller.

Tabela 1. Toxicidade do temephos para larvas do 3º instar de *Aedes aegypti* da colônia RecBti (F_{19} e F_{25}) em relação à Rockefeller. $RT = CL \text{ RecBti} / CL \text{ Rockefeller}$.

Colônia	CL_{50} (IC 95%)	RT ^b	CL_{20} (IC 95%)	RT
Rockefeller	0,007 (0,007-0,008)	1,0	0,010 (0,010-0,011)	1,0
RecBti F_{19}	0,007 (0,007-0,008)	1,0	0,016 (0,012-0,018)	1,6
RecBti F_{25}	0,008 (0,007-0,008)	1,0	0,014 (0,012-0,016)	1,3

Atividade de enzimas detoxificadoras

Os dados mostram que larvas RecBti da F_{15} não possuem alterações na atividade das α -esterases e MFO porém apresentaram aumento de β -esterases e GSTs na F_{15} e de β -esterases na F_{25} , em relação à referência Rockefeller. As alterações não estão correlacionadas com a suscetibilidade de larvas Rec-Bti ao temephos, que foi similar.

Tabela 2. Atividade de enzimas detoxificadoras em larvas de *Aedes aegypti* da colônia Rec_Bti nas F_{15} e F_{25} . Classificação (Cl) em relação à colônia Rockefeller : A= alterada, I= inalterada.

Enzimas	GST				α -ester				β -ester				MFO	
	Ge	Nº	>99	Cl	Nº	>99	Cl	Nº	>99	Cl	Nº	>99	Cl	Nº
F_{15}	160	28	A	209	3	I	122	37	A	126	5	I		
F_{25}	113	1	I	160	0	I	159	27	A	82	0	I		

CONCLUSÕES

Larvas RecBti expostas ao Bti por 26 gerações contínuas não apresentam alterações de suscetibilidade a este agente ou às suas toxinas.

As larvas são suscetíveis ao temephos, apesar do aumento da atividade de GSTs e β -esterases, não tendo sido observada uma correlação entre estes parâmetros.

REFERÊNCIAS

Amorim, L.B., Oliveira, C.M.F., Rios, E.M., Regis, L., Sililha, M.H.N.L., 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. Biological Control 42, 155-160.
Brasil, 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes*

aegypti. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília (Brazil).

Brogdon, W.G., McAllister, J.C., 1998. Insecticide resistance and vector control. Emerg. Infect. Dis. 4, 605-613.

Burt, F.J., Rolph, M.S., Rulli, N.E., Mahalingam, S., Heise, M.T., 2012. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet 379, 662-671.

Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A., Ellar, D.J., 1995. Contribution of the individual components of the delta-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. FEMS Microbiol Lett 131, 249-254.

de Barros Moreira Beltrão, H., Silva-Filha, M.H., 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. FEMS microbiology letters 266, 163-169.

Guidi, V., Patocchi, N., Luthy, P., Tonolla, M., 2011. Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3663-3668.

Hertlein, M.B., Mavrotas, C., Jousseau, C., Lysandrou, M., Thompson, G.D., Jany, W., Ritchie, S.A., 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. J. Am. Mosq Control. Assoc. 26, 67-87.

Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23, 133-163.

Regis, L., da Silva, S.B., Melo-Santos, M.A., 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95 Suppl 1, 207-210.

Soberón, M., Fernández, L.E., Pérez, C., Gill, S.S., Bravo, A., 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. Toxicon 49, 597-600.

Teixeira, M.G., Barreto, M.L., 2009. Diagnosis and management of dengue. BMJ 339, b4338.

WHO, 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide, World Health Organization, pp. TDR/BCV/SPHAERICUS/85.83.81-24.

Wirth, M.C., 2010. Mosquito resistance to bacterial larvicidal proteins. Open J Toxicol 3, 101-115.

Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A., 2010. Inheritance patterns, dominance, stability, and allelism of insecticide resistance and cross-resistance in two colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J Med Entomol 47, 814-822.