

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BinA e BinB DE *Bacillus sphaericus* EM DIFERENTES CEPAS DE *Escherichia coli* E ATIVIDADE MOSQUITOCIDA

KNABAH, Paula F¹.; GONÇALES, Relber A.^{1*}; BRUM, Fernanda A.²; ZIMMER, Cristine R.³, LEITE, Fabio P. L.⁴, PINTO, Luciano da S.⁵
Universidade Federal de Pelotas

PINTO, Luciano da S.⁵
Universidade Federal de Pelotas

1. Acadêmica de Ciências Biológicas. E-mail: paulaknabah@gmail.com
- 1*. Acadêmico de Ciências Biológicas BIC FAPERGS. E-mail: relberg.ib@ufpel.edu.br
2. Mestranda PPG – Parasitologia. E-mail: fernanda.-brum@hotmail.com
3. Bolsista PRODOC PPG- Parasitologia. E-mail: crzimmerbio@yahoo.com.br
4. Deptº de Microbiologia e Parasitologia, Prof. adjunto E-mail: fabio_leite@ufpel.tche.br
5. Centro de Biotecnologia, Prof. assistente. E-mail: ls_pinto@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os mosquitos da família *Culicidae* ocupam uma posição de destaque no que diz respeito a doenças parasitárias e virais (FUNASA, 2003). Observa-se que, um dos principais fatores para a grande disseminação desses insetos é a sua alta capacidade de procriação em ambientes urbanos (MELO, 2006). Apresentam flexibilidade genética, o que se manifesta através do desenvolvimento de resistência a inseticidas, levando a constante procura por novos produtos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Atualmente, cientistas de todo mundo trabalham com formas alternativas de controle de mosquitos com a finalidade de implementar um inseticida ambientalmente seguro (HOUGARD & BACK, 1992; FEDERICI, 1995; CHARLES & NIELSEN-LEROUX, 2000; MONNERAT *et al.*, 2004). Dessa forma, o controle biológico exercido por bactérias produtoras de endotoxina, como *Bacillus thuringiensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs) tem se mostrado eficaz no controle de insetos das Ordens Diptera, Lepidoptera e Coleoptera, atuando somente sobre a fase larval, nunca sobre os adultos (RABINOVITCH *et al.*, 1998).

Bacillus sphaericus (Bs) é uma bactéria aeróbica Gram-positiva que produz um esporo esférico na porção terminal da cápsula bacteriana, sendo que o efeito larvicida é produzido principalmente a partir de duas toxinas (BinA e BinB) que atuam em sinergia (MELO, 2006). As toxinas apresentam uma alta toxicidade às larvas de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, o que resulta no sucesso da utilização dos bioinseticidas de Bs para o controle dessa espécie de culicídeo (MELO, 2006).

Neste trabalho, objetivou-se identificar uma cepa de *Escherichia coli* capaz de expressar grandes quantidades de proteínas inseticidas de *B. sphaericus* em diferentes temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os genes das proteínas mosquitocidas de *B. sphaericus* (BinA e BinB), foram amplificados pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e posteriormente ligado ao vetor pAE. O produto da ligação foi transferido para *Escherichia coli* cepa TOP10F por choque térmico. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio Luria Bertani (LB) contendo antibiótico Ampicilina 100 µg.mL⁻¹. Após, foi realizada a extração de plasmídeo e PCR, a fim de confirmar a inserção do gene ao vetor. Assim, após confirmar os clones recombinantes, transformou-se por choque térmico as cepas de *E.coli*: Artic express, Plyss e Ril

As bactérias selecionadas ao acaso foram cultivadas em meio líquido contendo antibiótico específico para cada cepa até uma DO₆₀₀ 0,5/0,7 e induzidas com IPTG (0,5 M) por 24 horas em temperaturas de 4°C e 37°C. A expressão das proteínas recombinantes foi monitorada por eletroforese em gel de Poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e por atividade larvicida.

Esta foi verificada a partir do bioensaio desenvolvido em placas de cultivo celular de 24 poços (diâmetro de 1,5 cm) contendo 1,8 mL de meio LB e 200 µL do cultivo celular a partir de diluições seriadas 1:10. Em cada poço foram colocadas 5 larvas de *C. quinquefasciatus* entre o segundo e terceiro estágios de desenvolvimento. Como controles foram usados cultivos bacterianos das mesmas cepas não transformadas, água destilada e meio. O ensaio foi realizado sob condições controladas de temperatura (26 ± 2°C), em umidade relativa (superior a 85%) e fotofase (12 horas), segundo o protocolo descrito por (MONNERAT et. al., 2001)

O teste foi realizado durante três dias alternados e em triplicata. A avaliação foi realizada em intervalos de 24, 48 e 72 horas verificando-se o número de larvas vivas e mortas em cada cavidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da metodologia empregada, verificou-se que as três cepas de *E.coli* expressaram as proteínas inseticidas independente da temperatura. Nota-se que a cepa Artic expressou maior quantidade de proteínas, não apresentando diferenças entre induzido e não induzido, diferentemente das cepas Plyss e Ril (Figura1).

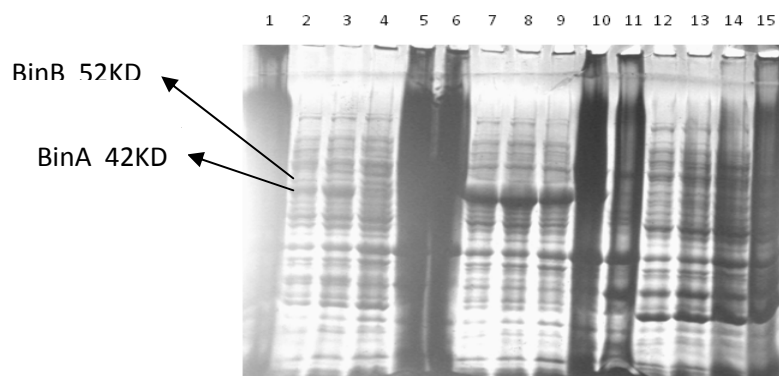


Figura1.: Expressão das diferentes cepas transformadas com ovotor pAE-*binAB*. 1- cepa plyss; 2- Plyss/pAE- *binAB* não ind. 4°C; 3- PLYss/pAE- *binAB* ind. 4°C; 4- PLYss/pAE- *binAB* não ind. 37°C; 5- PLYss/pAE- *binAB* ind. 37°C; 6- cepa Artic; 7- Artic/pAE- *binAB* não ind. 4°C; 8- Artic/pAE- *binAB* ind. 4°C; 9- Artic não ind. 37°C; 10- Artic/pAE- *binAB* ind. 37°C; 11- cepa Ril; 12- Ril/pAE- *binAB* não ind 4°C; 13- Ril/pAE- *binAB* ind 4°C; 14- Ril/pAE- *binAB* não ind 37°C; 15- Ril/pAE- *binAB* ind 37°C. **SDS-PAGE** 12%

Verificou-se neste experimento, que as cepas recombinantes apresentaram ação inseticida de 100% até uma diluição de 10⁴ para as cepas Plyss e Ril após 24h, enquanto que Artic apresentou ação inseticida para 100% das larvas até a mesma diluição pós 48h semelhante ao controle positivo Bs e diferente do controle negativo onde não houve mortalidade das larvas (Figura2). Em trabalhos anteriores observou-se que o clone isolado de *E. coli* Artic express apresentou letalidade semelhante ao encontrado para o controle positivo após 24h de contato (GONÇALES et al., 2009).

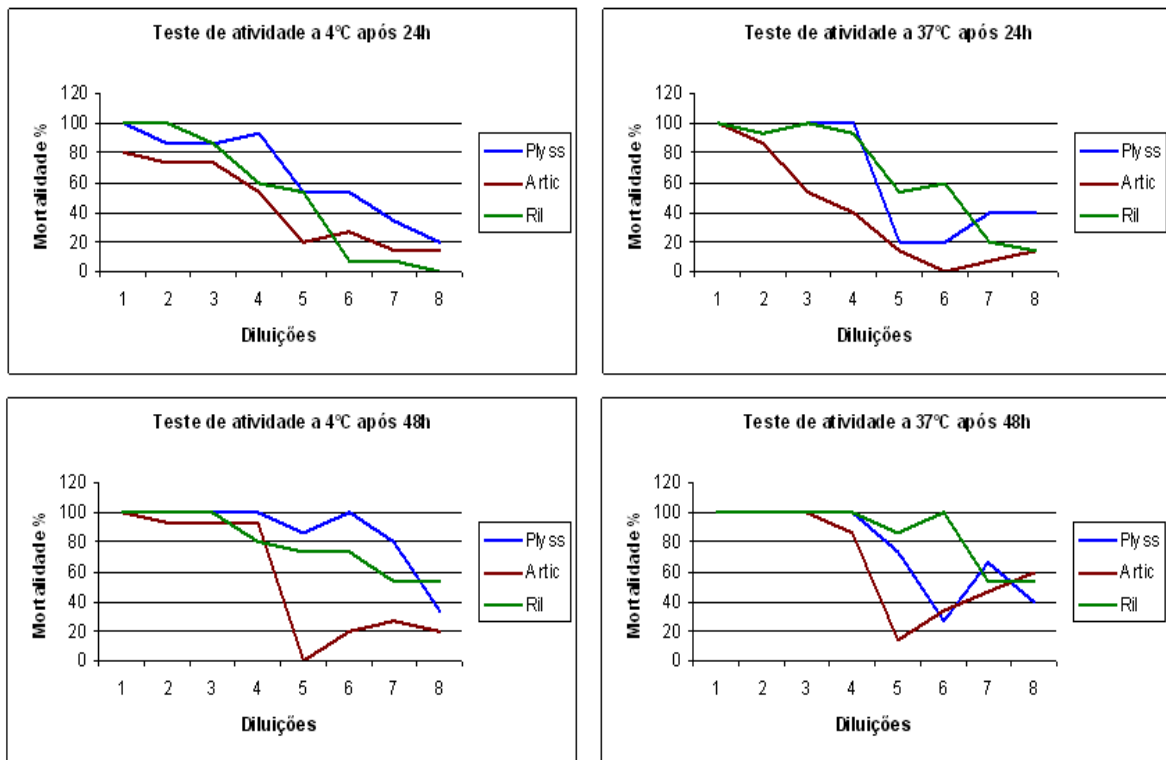


Figura2.: Teste de atividade larvicida avaliando a mortalidade/diluição a 4°C e 37°C após 24h e 48h

Contudo, constatou-se que a expressão das proteínas inseticidas a uma temperatura de 4°C e 37°C foi satisfatório para as três cepas pesquisadas.

4 CONCLUSÕES

Assim, com estes resultados podemos sugerir que o sistema de expressão desenvolvido utilizando *E.coli*, cepas Artic Express, Ril e Plyss recombinantes com o gene pAE-*binAB* foram satisfatórios em produzir o complexo binário recombinante (rBinAB) de forma semelhante ao *B. sphaericus*, uma vez que não houve diferença na ação da proteína a temperaturas de 4°C e 37°C. o teste indicou que todas as cepas utilizadas no experimento são capazes

de promover o correto dobramento da proteína, de forma similar ao que acontece no *B. sphaericus*.

5 REFERÊNCIAS

CHARLES, J.; NIELSEN – LeROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: Diversity, mode of action and resistance phenomena. *Bacteries et Champignons Entomopathogenes*. Institut Pasteur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 (Suppl. 1): p. 201-206, 2000.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 228p.

FEDERICI, B.A. The Future of Microbial Insecticides as Vector Control Agents. **Journal of the American of Mosquito Control Association**. 11(2):260-268, 1995.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, Vigilância Epidemiológica, Plano de Intensificação das Ações e Controle da Febre-Amarela; 2002. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengueO.htm> (acessado em 03 de abril de 2003)

GONÇALES, Relber Aguiar et. al., Produção de bioinseticida utilizando *Pichia pastoris* recombinante com ação mosquitocida às larvas de *Culex quinquefasciatus* a partir do gene que codifica para a proteína BinAB. In: **XVIII Congresso de Iniciação Científica, XI Encontro de Pós-Graduação e I Mostra Científica**. Pelotas – RS, 1-5, 2009.

HOUARD, J-M.; BACK, C. Perspectives on the bacteriological control of vectors in the tropics. **Parasitology Today**, v.8, p.364-366, 1992.

MELO, A. L. de A., ELABORAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE *Bacillus sphaericus* MEYER E NEIDE (1904) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Culex quinquefasciatus* SAY (1823). 2006. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre pelo programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

MONNERAT, R.; SILVA, S. F.; DIAS, D. S.; MARTINS, E. S.; PRACA, L.B.; JONES, G. W. ; SOARES, C. M. ; DIAS, J.M.C.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology**. 128(7): 469-473, 2004.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS C. F. C.; LIMA, M. M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.6, p.40-41, 1998.