

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

Expressão heteróloga da Toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. *israelensis* em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico.

Ana Paula de Souza Stori de Lara

Pelotas, 2013

ANA PAULA DE SOUZA STORI DE LARA

**Expressão heteróloga da Toxina Cry 11Aa de
Bacillus thuringiensis (Berliner, 1919) var.
israelensis em *Escherichia coli* (Escherich, 1885),
visando o controle biológico.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia (área do conhecimento: Ciências Biológicas).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Coorientador: Luciano da Silva Pinto

Pelotas, 2013

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

L318e Lara, Ana Paula de Souza Stori de
Expressão heteróloga da Toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. *israelensis* em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico. / Ana Paula de Souza Stori de Lara; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador; Luciano da Silva Pinto, co-orientador. - Pelotas, 2013.
51 f.; il.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia), Universidade Federal de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.*Bacillus thuringiensis*. 2.Western Blot. 3.*Culex quinquefasciatus*. 4.Delta-endotoxinas. 5.Proteína Cry 11Aa. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Pinto, Luciano da Silva, co-orient. III. Título.

CDD: 616.96

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)

Prof. Dra. Cristine Ramos Zimmer

Prof. Dra. Adriane Maria Delgado Menezes

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, que representa minha segurança em todos os aspectos, meu companheiro incondicional, o abraço espontâneo e tão necessário. Obrigada por me fazer sentir tão amada, também nos momentos tão difíceis da nossa vida.

Aos meus filhos que muitas vezes tiveram que suportar minha ausência.

Muito obrigada ao meu Orientador Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite por ter aberto esta porta, por sua confiança, compreensão, paciência e amizade e ao Professor Dr. Luciano Pinto pelo tempo que a mim dedicou com sua orientação, sempre pronto para dar sugestões e explicações sobre o projeto.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, Amanda, Ana Vianna, Jéssica, Nathanieli, Luciana, Régis, Rita e Rômulo; aos que não estão mais nesse laboratório, Lucas, Relber e Talita; o meu muito obrigado pelo auxílio, amizade e por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, Alceu, Luana, Itauá, Mateus, Lívia e Renan obrigado por sempre me atenderem e auxiliar.

Aos queridos mestres e funcionários dos Laboratórios de Parasitologia e a todos os colegas dos laboratórios da Biotecnologia, Microbiologia e Fisiologia que muito me auxiliaram nas mais diversas etapas do meu trabalho.

A todos os amigos que não citados, mas que sabem que de alguma forma são especiais na minha vida.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o meu Mestrado

Muito Obrigado!

“As dificuldades devem ser usadas para crescer,
não para desencorajar.
O espírito humano cresce mais forte no conflito.”
William Ellery Channing

RESUMO

LARA, Ana Paula de Souza Stori de. **Expressão heteróloga da toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. *israelensis* em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico.** 2013. 51f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva, de ocorrência ubíqua, anaeróbica facultativa, formadora de esporos. Produz cristais, como inclusões parasporal durante a esporulação. Estas inclusões contêm proteínas chamadas de δ -endotoxinas, que são bem conhecidas pelas suas propriedades inseticidas. Dentre elas as toxinas Cry (crystal) são largamente empregadas no controle biológico de pragas. As δ -endotoxinas têm a vantagem de serem mais específicos do que os inseticidas químicos sintéticos, portanto, são considerados como agentes de controles favoráveis ao meio ambiente. O objetivo deste estudo foi a obtenção da proteína Cry 11Aa recombinante de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em *Escherichia coli*, ativa, para utilização no controle biológico. Duas cepas de *E. coli* de expressão foram testadas: BL 21 (DE3) C41 e BL 21 (DE3) Ril. A proteína Cry 11Aa foi expressa e secretada na forma solúvel pelas duas cepas. A expressão foi demonstrada por *Western blot* utilizando-se anticorpo monoclonal anti-histidina. A cepa BL 21 (DE3) C41 expressou a proteína Cry 11Aa ~3.6 vezes mais que a cepa BL 21 (DE3) Ril, e apresentou, em teste biológico, uma eficácia de 95% de mortalidade sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. Com os dados obtidos neste trabalho podemos sugerir que a proteína recombinante Cry 11Aa expressa em *E. coli* é um potencial candidato para ser utilizado no controle biológico.

Palavras chave: *Bacillus thuringiensis*. *Culex quinquefasciatus*. Proteína Cry 11Aa. *Western Blot*. delta-endotoxinas.

ABSTRACT

LARA, Ana Paula de Souza Stori de. **Expressão heteróloga da toxina Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1919) var. *israelensis* em *Escherichia coli* (Escherich, 1885), visando o controle biológico.** 2013. 51f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a Gram-positive bacteria, ubiquitous, facultative anaerobic, and form spores. During sporulation produce a parasporal crystals inclusion. Within these inclusions there are δ -endotoxin proteins well known for its insecticides proprieties. Among them, the Cry (crystal) is wide employed for biological control of plagues. The δ -endotoxin has an advantage of been more specific than chemical insecticides, thus been consider more favorable for the environment. The aim of this study was to obtain the Cry 11Aa recombinant protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Escherichia coli*, active for use in biocontrol. Two expression *E. coli* strains were tested: BL 21 (DE3) C41 and BL 21 (DE3) Ril. The protein Cry 11Aa was expressed and secreted in a soluble form by the two strains. The expression was demonstrated by Western Blot using anti-histidin monoclonal antibody. The strain BL 21 (DE3) C41 express the protein Cry 11Aa ~3.6 times more than the strain Rill, and showed a biologic efficiency of 95% of mortality for *Culex quinquefasciatus* larvae. The data obtained in this study suggest that the protein recombinant Cry 11Aa expressed in *E. coli* has a potential to be used in biological control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. *Culex quinquefasciatus*. Protein Cry 11Aa. Western Blot. Delta-endotoxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão do <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Figura 2: Estruturas das toxinas Cry 1Aa e Cry 2Aa por cristalografia e difração de raio X. 23	23
Figura 3: Mecanismo de ação das proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
Figura 4: Eletroforese do produto de amplificação do gene <i>cry 11Aa</i>	33
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão do gene <i>cry 11Aa</i> e plasmídeo pAE.	34
Figura 6: Mapa do vetor de expressão pAE/ <i>cry 11Aa</i>	35
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de plasmídeo recombinante em <i>Escherichia coli</i> TOP 10.	35
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de plasmídeo recombinante em <i>Escherichia coli</i> TOP 10.	36
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do fragmento <i>cry 11Aa</i> por PCR de colônia.	36
Figura 10: <i>Western Blot</i> da proteína Cry 11Aa expressa em <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) Ril.	37
Figura 11: <i>Western Blot</i> da proteína Cry 11Aa expressa em <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) C41.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes clonados de <i>Bacillus thuringiensis</i> em plataforma <i>Escherichia coli</i>	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
Cry	Proteínas cristais
<i>cry</i>	Genes codificadores de proteínas cristal
Cyt	Proteínas citotóxicas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos
DO	Densidade Ótica
h	hora
His	Histidina
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Daltons
L	litro
LB	Luria Bertani
M	Molar
min	Minutos
mg	miligramas
mL	mililitro
mM	milimolar
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio- Gel para eletroforese de poliacrilamida

U	Unidade
v	Volume
V	Volts
v/v	volume/volume
°C	Graus Celsius
μL	microlitro
μg	micrograma
μm	micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral:	17
2.2 Objetivos específicos:.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3.2 Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
3.2.1 α -exotoxina	20
3.2.2 β -exotoxina	20
3.2.3 Exoenzimas.....	21
3.2.4 Proteínas Vegetativas Inseticidas – Vips.....	21
3.2.5 Enterotoxinas	21
3.2.6 δ -endotoxina.....	22
3.3 Domínios Cry	23
3.4 Mecanismo de ação	23
3.5 Sistema bacteriano de expressão.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Linhagens, cultivo e extração de DNA.....	26
4.1.1 Amplificação da sequência que codifica para <i>cry 11Aa</i>	26
4.1.2 Purificação dos produtos de PCR	27
4.2 Clonagem do gene <i>cry 11Aa</i> no sistema <i>Escherichia coli</i>	27
4.2.1 Digestão do gene <i>cry 11Aa</i> e do vetor pAE.....	27
4.2.2 Ligação do gene <i>cry 11Aa</i> com o vetor pAE.....	27

4.2.3 Clonagem em células competentes de <i>Escherichia coli</i>	28
4.2.4 Seleção e confirmação dos clones recombinantes <i>Escherichia coli</i>	28
4.2.5 Extração de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i> TOP 10.....	28
4.2.6 Precipitação, quantificação e sequenciamento	28
4.3 Transformação em <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) Ril e BL 21 (DE3) C41	29
4.4 Obtenção da proteína Cry 11Aa.....	29
4.4.1 Purificação da proteína Cry 11Aa	30
4.4.2 <i>Western Blot</i>	30
4.4.3 Quantificação da proteína.....	30
4.5 Teste biológico larvicida em mosquito.....	31
4.5.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	31
4.5.2 <i>Escherichia coli</i> recombinante	31
4.5.3 <i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3) Ril.....	31
4.5.4 <i>Bacillus sphaericus</i>	31
4.5.5 Preparação das amostras	32
4.5.6 Teste Biológico	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Construção do vetor pAE/ <i>cry 11Aa</i>	33
5.1.1 Amplificação do Gene <i>cry 11Aa</i>	33
5.1.2 Digestão do Vetor pAE e do Gene <i>cry 11Aa</i>	34
5.1.3 Mapa do vetor de expressão pAE/ <i>cry 11Aa</i>	35
5.1.4 Extração do plasmídeo pAE/ <i>cry 11Aa</i>	35
5.1.5 PCR Colônia de <i>Escherichia coli</i> contendo o vetor pAE/ <i>cry 11Aa</i>	36
5.2 <i>Western Blot</i>	37
5.2.1 Quantificação da Proteína.....	38
5.3 Teste biológico larvicida em mosquito.....	38
6 DISCUSSÃO	39

7 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O controle de pragas na agricultura e de insetos vetores de importantes zoonoses é alcançada principalmente através do uso de inseticidas químicos. No entanto, a utilização destes pesticidas químicos conduziu a vários problemas, incluindo a poluição ambiental e aumento dos efeitos sobre a saúde humana. A seleção de populações resistentes do inseto também causou surtos significativos e um número maior de pragas secundárias (DEVINE; FURLONG, 2007). Apesar de todo avanço na área médica e no desenvolvimento de novos produtos químicos, as doenças transmitidas por mosquitos, incluindo a malária, filariose, dengue e encefalites virais, continuam vitimando pessoas ao redor do mundo. A cada ano, cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças graves causadas por organismos patogênicos veiculados por insetos vetores (PETRY et al., 2004). Os três principais gêneros que incluem a maioria dos patógenos humanos são: *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. O controle satisfatório destas populações de mosquitos é impedido pela sua enorme habilidade reprodutiva e flexibilidade genética, que se manifesta através do desenvolvimento de resistência a inseticidas, levando a constante procura por novos produtos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

A espécie *Culex quinquefasciatus* é cosmopolita e distribui-se por quase todas as regiões do mundo. No Brasil, esta espécie está disseminada em todos os centros urbanos, geralmente associados às condições precárias de saneamento, principalmente relacionadas a águas residuais (URNINATTI et al., 2002). No município de Pelotas, o clima permite o desenvolvimento de *C. quinquefasciatus* durante todo o ano, e ocorrem no mínimo 15 ciclos aquáticos anuais (RIBEIRO et al., 2004). Além de seu papel como vetor de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem, *C. quinquefasciatus* causa problemas secundários de saúde em inúmeras áreas urbanizadas do Brasil, gerando um forte incômodo, causado pelas picadas, sons emitidos e alergias, contribuindo para a diminuição da qualidade de vida da população (CHALEGRE, 2008).

O termo controle biológico foi empregado pela primeira vez em 1919 por H. S. Smith, para designar o uso de inimigos naturais para o controle de insetos-praga. Posteriormente, essa expressão foi usada para designar todas as formas de controle, alternativas aos produtos químicos, que envolvessem métodos biológicos (KAGIMURA et al., 2011). A utilização do controle biológico de insetos tem-se mostrado uma promissora alternativa ao controle químico pela segurança e eficiência que oferece e, principalmente, por ser alternativa economicamente viável e socialmente desejável (COOK, 1993).

O bioinseticida mais bem sucedido usado para controle de insetos é a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que atualmente representa 2% do total do mercado de inseticidas. Confere atividade inseticida contra os estágios larvais de diferentes ordens de insetos (RAYMOND et al., 2010). As toxinas Cry e Cyt (citotóxicas) são produzidas como protoxinas sendo solubilizadas no lúmen do intestino por proteases, tornando-se ativas e lesando as células alvo (BRAVO et al., 2005). A utilização de *Bt* em programas de controle biológico é uma alternativa eficaz e menos agressiva ao meio ambiente.

A família de δ -endotoxinas Cry 11 compreende proteínas de 66-72 KDa ativas principalmente para dípteros. A ativação proteolítica desta toxina remove 28 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da protoxina e promove uma clivagem intramolecular resultando em fragmentos de aproximadamente 38 e 32 KDa (YAMAHIWA et al., 2002). A toxina Cry 11Aa é a mais ativa encontrada no cristal de *Bti* contra larvas de *A. aegypti*. Essa toxina apresenta, ainda, atividade para larvas de *Culex* sp. e *Anopheles* sp. (FERNÁNDEZ et al., 2005).

No presente trabalho foi clonado e expresso o gene que codifica a proteína Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em *Escherichia coli*. A expressão da proteína recombinante foi confirmada através de *Western blot* e sua ação inseticida através de bioensaio contra larvas de *Culex quinquefasciatus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Obter a proteína Cry 11Aa recombinante de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em *Escherichia coli*, ativa, para utilização no controle biológico.

2.2 Objetivos específicos:

- Transformar cepas de *E. coli* com o gene que expressa a proteína Cry 11Aa de *B. thuringiensis*;
- Expressar e purificar a proteína;
- Verificar a ação da proteína recombinante Cry 11Aa sob imaturos de *Culex quinquefasciatus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis pertence a família Bacillaceae e ao complexo taxonômico *Bacillus cereus* (GLARE; O'CALLAGHAN, 1998). É uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou anaeróbica facultativa naturalmente encontrada no solo. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais (PEFERÖEN, 1997). Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de δ -endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs).

As δ -endotoxinas são sintetizadas por diferentes variedades de *Bt* e a mesma cepa pode fornecer mais de um tipo de Cry (FERRÉ; VAN RIE, 2002). As proteínas Cry têm mostrado atividade inseticida altamente específica entre as diversas ordens de insetos, como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera (Zhong et al., 2000); Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Isoptera e Malophaga (DE MAAGD et al., 2001), além de nematódeos (MARROQUIN et al., 2000), Ácaros, Protozoários (SCHNEPF et al., 1998).

B. thuringiensis tornou-se o agente microbiano mais utilizado mundialmente. O que contribuiu para esta ampla aceitação é a seletividade das toxinas de *Bt* que possuem pouco efeito sobre insetos não alvos e vertebrados como aves e mamíferos (SIEGEL, 2001). Há décadas são empregados como importantes biopesticidas de agregado valor econômico no controle biológico de pragas agrícolas e determinados vetores de doenças humanas (DE MAAGD et al., 2003).

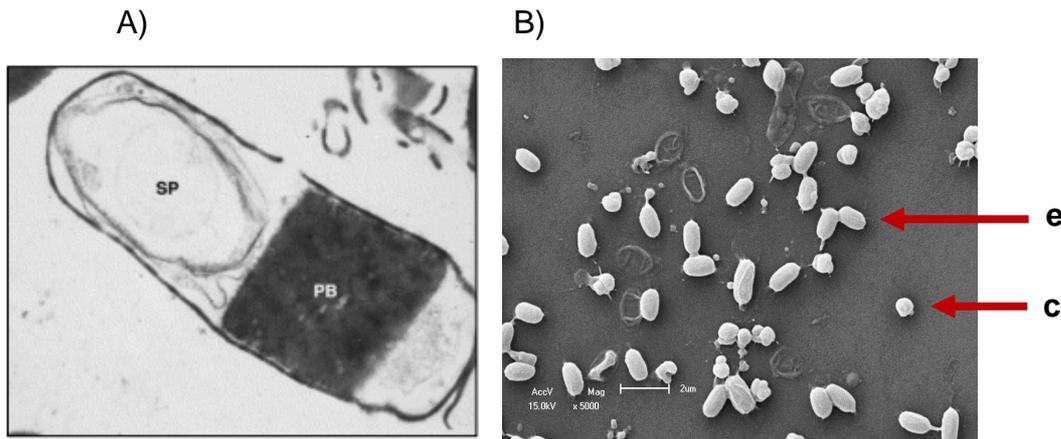


Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão do *Bacillus thuringiensis*. A) (*Bt*) (2 μ m) em fase de esporulação. SP – esporo; PB (corpo proteico; δ -endotoxina); B) Micrografia eletrônica de varredura de *Bti*, mostrando (e) esporos, (c) cristais redondos.

Bacillus thuringiensis foi descrito pela primeira vez por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou um bacilo de larvas mortas da traça da farinha, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), onde ele reportou a presença de cristais, porém sem ainda relacioná-los com atividade tóxica a insetos. No ano de 1915 ele intitulou-a de *Bacillus thuringiensis* em homenagem a província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; OECD, 2007). Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome *B. thuringiensis*, não foi o primeiro isolado deste patógeno. Em 1901, o biólogo Sotō Ischiwata, isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease” a partir de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho da seda) (Lepidoptera: Bombycidae). Esta bactéria foi denominada *B. sotto Ischiwata*, mas este nome não foi mantido, sendo substituído pelo nome *B. thuringiensis* (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000).

Em 1920, fazendeiros começaram a utilizar o *B. thuringiensis* como estratégia para controle de insetos na agricultura e a primeira formulação a base de *B. thuringiensis* foi produzido na França em 1938 (POLANCZYK; ALVES, 2003). Na década de 1950, inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* passaram a ser fabricados na Rússia, Checoslováquia, Alemanha e Estados Unidos da América (MARTINS, 2005). Inicialmente, o produto foi utilizado somente para o controle de Lepidopteros, pois a maioria das subespécies descritas eram tóxicas somente para larvas de insetos desta ordem (MONNERAT; BRAVO, 2000). A partir de 1970, novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes contra insetos das ordens Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera e Orthoptera. Também foi relatada toxicidade

para algumas espécies de nematódeos, protozoários e ácaros (FEITELSON, 1994; EDWARDS et al., 1998). Nos anos de 1980, a utilização de *B. thuringiensis* aumentou sensivelmente, sobretudo quando começaram a surgir populações de insetos apresentando alta resistência aos inseticidas químicos convencionais. Além disso, estudos de cientistas e ambientalistas começaram a relatar os problemas causados pelos produtos químicos ao meio ambiente. Estima-se que existam mais de 50.000 cepas de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (MONNERAT et al., 2001).

3.2 Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Além das δ -endotoxinas Cry e Cyt, *B. thuringiensis* podem sintetizar outros fatores de virulência dentre elas a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas, enterotoxinas e proteínas inseticidas vegetativas, VIPs (do inglês – “vegetative insecticidal proteins”) (OECD, 2007).

3.2.1 α -exotoxina

É uma enzima com atividade citolítica que age sobre os fosfolipídios presentes nas membranas celulares. Caracterizam-se por serem termolábeis, solúveis em água, sendo altamente tóxica para algumas espécies de insetos, seja por administração oral ou intra-hemocélica, e também para ratos, causando degeneração e lise das células. Essa toxina também é conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

3.2.2 β -exotoxina

Esta toxina, também chamada de thuringiensina, é produzida durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. É termolábil, com baixa massa molecular. Existem dois tipos de β -exotoxinas: a toxina tipo I que é um análogo de ATP, composto por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico (FARKAS et al., 1969). Sua atividade tóxica está relacionada com a inibição da RNA polimerase através da competição com ATP, apresentando um amplo espectro de toxicidade para várias ordens de insetos, ácaros, nematoides e também vertebrados, provocando efeitos teratogênicos e mutagênicos. A toxina do tipo II é um análogo de UTP e é mais tóxica que a do tipo I, principalmente para insetos da ordem Coleoptera (LEVINSON

et al., 1990). Devido a sua alta toxicidade há restrições à produção comercial de bioinseticidas que empregam essas toxinas nas suas formulações (HANSEN; SALAMITOU, 2002; OECD, 2007).

3.2.3 Exoenzimas

São responsáveis por favorecerem a inserção das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal do hospedeiro por meio da ruptura da membrana peritrófica. Neste grupo destacam-se as quitinases e as proteases (REDDY et al., 1998).

3.2.4 Proteínas Vegetativas Inseticidas – Vips

Enquanto as δ -endotoxinas são sintetizadas especialmente na fase esporulante (BRATTACHARYA, 1993) determinadas estirpes de *Bt* produzem durante a fase vegetativa proteínas inseticida chamada *Vip* (Vegetative Insecticidal Protein). As Vips não formam cristais parasporal e são aparentemente secretadas das células para o sobrenadante no meio de cultivo (SCHNEPF et al., 1998; PINTO; FIÚZA, 2008; WERNECK et al., 2008). Podem ser encontradas em cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus* (MONNERAT; BRAVO, 2000) e os seus genes codificadores (genes Vips) parecem estar localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com as proteínas Cry (ESTRUCH et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998). As Vips são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, além de serem analisadas proteínas formadas na fase de esporulação da bactéria, podemos observar outras proteínas formadas no estado vegetativo.

3.2.5 Enterotoxinas

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização. O número de enterotoxinas tem se expandido pela detecção de novos genes e, até o momento, já foram identificados 18 tipos distintos, mas com similaridade na estrutura e sequência. As clássicas SEA, SEB,

SEC1, 2, 3, SED e SEE são as de maior ocorrência. Outras treze enterotoxinas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) foram identificadas e seus genes (seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu) correspondentes foram descritos (BLAIOTTA et al., 2004; OMOE et al., 2005).

3.2.6 δ -endotoxina

O *Bacillus thuringiensis* produz, a partir do estágio II da esporulação, durante a fase estacionária, corpos de inclusões proteicas compostos pelas δ -endotoxinas. Estas acumulam-se no compartimento da célula-mãe e, no final da esporulação, são liberados juntamente com os esporos (SCHNEPF et al., 1998). As δ -endotoxinas são compostas por dois tipos de proteínas, Cry e Cyt. A maioria das cepas de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais são formados por diferentes proteínas Cry e Cyt, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas, como, por exemplo, no *B. thuringiensis* var. *israelensis*. A massa molecular das toxinas Cry está compreendida entre 30 a 140 KDa (SERAFINI et al., 2002). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxina presentes, podendo ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico, ou ainda, sem forma definida (HABID; ANDRADE, 1998). Monnerat e Bravo (2000) relatam que o processo de formação do cristal está ligado à esporulação. Proteínas Cry são especificamente tóxicas para insetos das ordens Lepidóptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera e também a alguns nematódeos. Em contraste, as proteínas Cyt são produzidas por estirpes de *B. thuringiensis* ativas principalmente contra os insetos da ordem Diptera (BRAVO et al., 2007).

Tanto as Cry quanto as Cyt estão agrupadas em quatro níveis hierárquicos e suas respectivas nomenclaturas são representadas pelo nome da toxina seguido de números arábicos, por uma letra maiúscula, uma minúscula e números (ex: Cry 23Aa1), conforme a sua posição filogenética (DE MAAGD et al., 1999b). Quando as proteínas apresentam menos de 45% de sua identidade na sequência de aminoácidos, diferem-se na primeira categoria (ex: Cry 23), a segunda com até 78% de identidade apresentam-se com números e uma letra maiúscula (ex: Cry 23A), a terceira com 95% são descritas por números e letras (ex: Cry 23Aa) e, com identidade superior a 95% são caracterizadas por todos os quesitos (ex: Cry 23Aa1) (BRAVO et al., 2007).

3.3 Domínios Cry

As moléculas da parte ativa das Cry são constituídas de três domínios, todas as estruturas com um alto grau de similaridade (BRAVO et al., 2007). As estruturas terciárias de Cry 1Aa e Cry 2Aa foram observadas por cristalografia de raio X (PIGGOT; ELLAR, 2007). O domínio C-terminal esta relacionado com a forma e estrutura do cristal, enquanto que a toxicidade está atrelada a sua porção N-terminal.

O domínio I (domínio N-terminal) é constituído por sete α -hélices, sendo que a hélice- α 5 central é hidrofóbica e é circundada pelas outras seis hélices anfipáticas. Esse domínio é responsável pela inserção e formação do poro na membrana (HOWLADER et al., 2009). O domínio II consiste de três folhas β -antiparalelas conectadas por regiões de alças expostas, com alto grau de variação entre proteínas Cry, ao redor de um centro hidrofóbico (BOONSERM et al., 2006). O domínio III C-terminal, também chamado de β -prisma, é um sanduiche de folhas- β . As regiões expostas nos domínios II e III estão envolvidas nas ligações ao receptor (BRAVO et al., 2005), e o domínio III também atua na proteção da molécula da digestão por proteinases.

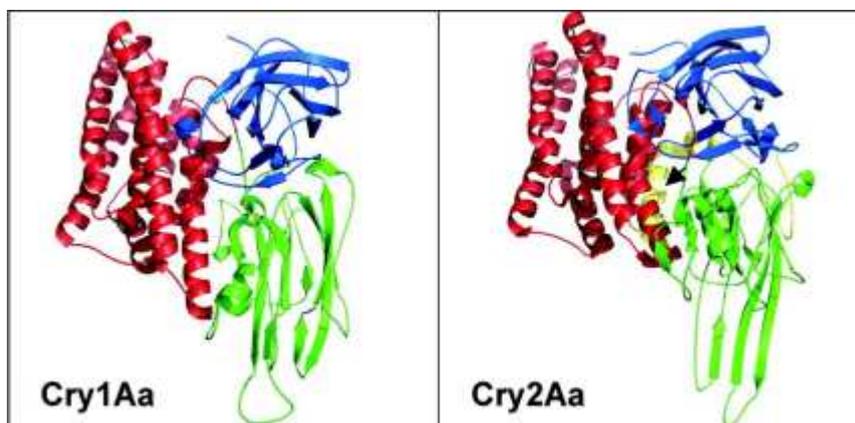


Figura 2: Estruturas das toxinas Cry 1Aa e Cry 2Aa por cristalografia e difração de raio X. O domínio I, em vermelho; o domínio II em azul; o domínio III em verde.

Fonte: Adaptado de Piggot e Ellar, 2007.

3.4 Mecanismo de ação

As análises do modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* visam esclarecer os mecanismos pelos quais estas proteínas exercem seu efeito entomopatogênico e elucidar a especificidade das diferentes toxinas (SCHNEPF et

al., 1998; FIUZA, 2004). Considerando o conjunto de informações atualmente disponíveis sobre as fases entre a ingestão dos cristais e a morte das larvas dos insetos suscetíveis às proteínas Cry, descreve-se como fases do mecanismo de ação:

1 - Inicia pela solubilização dos cristais em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando as protoxinas. Essa etapa é determinante à especificidade do isolado de *B. thuringiensis* à espécie alvo, tanto pela alcalinidade do sistema digestivo quanto pela composição dos cristais de *B. thuringiensis*.

2 - Protoxinas são ativadas pelas enzimas digestivas, formando fragmentos tóxicos de 60-65 kDa. Nessa etapa tanto a composição proteolítica quanto a estrutura proteica do cristal são importantes.

3 - Toxinas reconhecem receptores específicos às microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas suscetíveis às quais elas se ligam.

4 - Após o reconhecimento do receptor, a toxina induz a formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal. A formação dos poros na membrana celular provoca o desequilíbrio iônico entre o citoplasma e a o meio externo à célula. As análises histopatológicas realizadas após a intoxicação dos insetos mostram a destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e lise celular, levando o inseto a paralisia e morte (FIUZA, 2010).

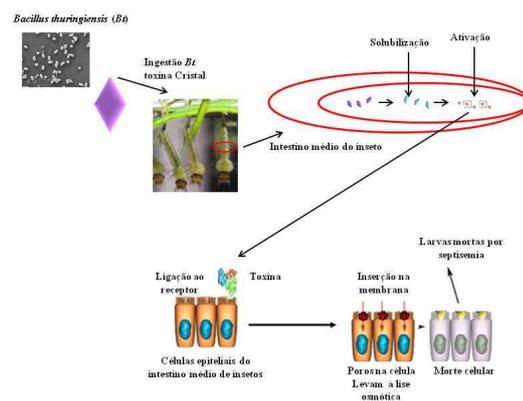


Figura 3: Mecanismo de ação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Ao ser ingerido pela larva, o cristal é dissolvido no ambiente alcalino do intestino médio do inseto. As toxinas ativas ligam-se ao receptor presente na membrana das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio. A toxina induz a formação de poros na membrana celular epitelial, formando poros, culminando na morte celular.

3.5 Sistema bacteriano de expressão

A produção de proteínas recombinantes é hoje uma técnica dominada. Importantes aplicações desta tecnologia englobam sua utilização em imunização, estudos bioquímicos, análise tridimensionais de proteínas, uso biotecnológico e terapêutico (PAVLOU; REICHERT, 2004). Atualmente, o uso de proteínas recombinantes é rotina tanto na pesquisa quanto na indústria farmacêutica.

As proteínas recombinantes podem ser obtidas em diferentes plataformas. A bactéria *Escherichia coli* é, ainda, o veículo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes, devido ao seu genoma ser bem caracterizado e ao intenso aperfeiçoamento das inúmeras ferramentas disponíveis para a sua manipulação genética (CHOU, 2007), um organismo bastante conhecido geneticamente, seu cultivo é rápido e pode produzir altas quantidades de proteína recombinante a baixo custo (MAKRIDES, 1996). O sistema de expressão utilizados nessa bactéria apresentam muitas características atrativas, como controle da expressão gênica e estratégias que facilitam a purificação de proteínas (TERPE, 2006). Porém para a expressão da proteína de forma bem sucedida, a escolha do sistema de expressão é de fundamental importância e deve levar em consideração a estrutura da proteína, sua funcionalidade e complexidade, e também a produtividade desejada (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens, cultivo e extração de DNA

Para realização do experimento foi utilizado *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pertencente a coleção de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. As bactérias *E. coli* TOP 10 e *E. coli* BL 21 (DE3) Ril pertencentes à Bacterioteca do CDTec, UFPel, *E. coli* BL 21 (DE3) C41 foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o vetor pAE pertencente ao Centro de Biotecnologia Instituto Butantan, São Paulo (RAMOS et al., 2004).

Para extração de DNA de *Bti* este foi recuperado em meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração) e incubado a 28 °C, subcultivado em *Erlenmeyer* de 1000mL de capacidade volumétrica contendo 200mL de meio NYSM (caldo nutritivo com extrato de levedura e sais), (YOUSTEN, 1940), incubada em agitador orbital a 28 °C a 150rpm por 24h. Após foi centrifugado uma alíquota de 3mL contendo 10^8 UFC mL⁻¹ de *Bti* e extraído o DNA por Kit Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit (GE – Healthcare) conforme fabricante.

4.1.1 Amplificação da sequência que codifica para *cry 11Aa*

Os oligos iniciadores para *cry 11Aa* foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI (Invitrogen) a partir das sequências depositadas no GenBank acesso:AL731825.1.

A sequência do gene que codifica para *cry 11Aa* foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como descrito: A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 0,3µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 2,0µL 10X PCR buffer, 1,0µL 50mM MgCl₂, 0,5µL dNTPs, 1,0µL 10pmol µL⁻¹ anterógrado (5` - GGG GAT CCA TGG AAG ATA GTT CTT TAG – 3`) e

retrógrado (5` - CCG GTA CCC TAC TTT AGT AAC GG – 3`), 2µL de DNA (solução) obtido como descrito acima e água estéril para completar o volume da reação.

A amplificação foi feita nas seguintes condições: 95 °C por 5min (1 ciclo), 94 °C por 50s, 59 °C por 50s, 72 °C por 2min (32 ciclo s) e 72 °C por 3min (1 ciclo). A reação foi realizada em um termociclador (Mastercycle Eppendorf).

4.1.2 Purificação dos produtos de PCR

O amplicon gerado pela reação de PCR foi purificado utilizando-se o Kit PCR Clean-up, Gel extraction – NucleoSpinR[®]. Seguiu-se o protocolo descrito no Kit com algumas modificações: as eluições foram feitas com água ultra pura estéril a 37 °C.

4.2 Clonagem do gene *cry 11Aa* no sistema *Escherichia coli*

4.2.1 Digestão do gene *cry 11Aa* e do vetor pAE

Foi feita a digestão do vetor pAE e do gene *cry 11Aa* com as enzimas de restrição *KpnI* (New England Biolabs – 20.000 U/mL) e *BamHI* (New England Biolabs – 20.000 U/mL). Para um volume final de 30µL da reação foram utilizadas 20µL do vetor pAE, 1,5µL da enzima *KpnI*, 3µL tampão da reação 10X e 5,5µL de água ultra pura estéril. As reações ficaram em temperatura ambiente por 18h. As enzimas foram inativadas por 2h a 60 °C. Após a inativação, as amostras foram purificadas usando-se o Kit PCR clean-up, Gel extraction – NucleoSpinR[®] Gel and PCR Clean-up. Para análise dos produtos digeridos, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.2 Ligação do gene *cry 11Aa* com o vetor pAE

A proporção 1/3 de cada fragmento (1 parte do vetor pAE para 3 partes do gene *cry 11Aa*) foram utilizadas para fazer a ligação dos mesmos e gerar o vetor pAE/*cry 11Aa*. A enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) foi utilizada para realizar esta reação, conforme protocolo do fabricante.

4.2.3 Clonagem em células competentes de *Escherichia coli*

O produto da ligação foi inserido em células competentes de *E.coli* TOP 10, através de choque térmico, (SAMBROOK et al., 1989). O processo de transformação foi feito da seguinte forma: 10 μ L do produto de ligação foi misturado gentilmente a 100 μ L de CaCl₂ (concentração 100mM) e uma colônia de *E. coli* TOP 10. Do sobrenadante foram removidos 0,5mL e o restante do volume foi suspenso e semeado em uma placa de meio ágar LB (Luria-Bertani) acrescido de ampicilina (100 μ g mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 18h.

4.2.4 Seleção e confirmação dos clones recombinantes *Escherichia coli*

Das colônias crescidas selecionadas em meio seletivo (ampicilina 100 μ g mL⁻¹), 22 foram escolhidas ao acaso e submetidas a uma triagem rápida com fenol:clorofórmio pelo método Microprep (JOUGLARD et al., 2002). As colônias bacterianas foram suspensas em um tubo de microcentrífuga contendo 15 μ L tampão de amostra (glicerol, TE e azul de bromofenol) e 15 μ L de fenol:clorofórmio.

O tubo de microcentrífuga foi levado ao vortex para homogeneização, centrifugado por 2min a 5000 X g. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com 15 μ L do sobrenadante desta reação. Fez-se a confirmação também por PCR, amplificando-se o gene *cry 11Aa* a partir do DNA dos supostos clones, como descrito anteriormente.

4.2.5 Extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli* TOP 10

Após a triagem em busca de clones recombinantes, duas colônias foram submetidas à extração de DNA plasmidial: uma das colônias transformadas foi semeada em 50mL de meio LB com 100 μ g mL⁻¹ de ampicilina por 18h em agitador orbital a 150rpm. O cultivo foi centrifugado a 5.000 X g por 5min. Prosseguiu-se a extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente corado com brometo de etídeo.

4.2.6 Precipitação, quantificação e sequenciamento

As amostras foram precipitadas e purificadas com isopropanol absoluto segundo protocolo de Sambrook e colaboradores (1989), para serem quantificadas

(aparelho Nanovue, versão 4282 V2.0.3). Após quantificação, as amostras foram sequenciadas por sistema capilar ABI3130xl (Life Technologies) no Laboratório de Identificação Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4.3 Transformação em *Escherichia coli* BL 21 (DE3) Ril e BL 21 (DE3) C41

Após a confirmação da clonagem (construção de pAE/cry 11Aa) por sequenciamento, o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar *E. coli* BL 21 (DE3) Ril e BL 21 (DE3) C41, por choque térmico. O choque térmico foi realizado conforme descrito no item 4.2.3. As colônias transformantes foram selecionadas em meio LB sólido contendo ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) para *E. coli* BL 21 (DE3) Ril e ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) para BL 21 (DE3) C41.

4.4 Obtenção da proteína Cry 11Aa

Uma das colônias transformantes selecionadas foi utilizada para inocular 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), e outro inóculo foi utilizada para incubar 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes ficaram sobre agitação em agitador orbital por 18h a 150rpm. Estes cultivos foram utilizados para inocular 500mL de meio LB contendo os antibióticos acima citados na mesma concentração. Quando o cultivo atingiu uma D.O = 0,7 (OD_{600}) foi adicionado o indutor IPTG na concentração 0,3mM, e as culturas permaneceram sobre agitação a 37 °C por mais 3h a fim de se obter a proteína recombinante Cry 11Aa.

Os cultivos foram centrifugados a 6.000 X g por 15min. As células foram suspendidas em Akta Wash com 8M ureia, obtendo um volume de 30mL. Foram adicionado PMSF 0,1N (Fenil-metil-sulfonil-fluoreto) e Lisosyme (10mg mL^{-1}). Estas soluções ficaram na câmara fria a 4 °C por 24h, sendo posteriormente sonicadas e novamente centrifugado a 6.000 X g por 1h. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o momento da purificação.

4.4.1 Purificação da proteína Cry 11Aa

Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 μ M (Membrana celulose – MILLIPORE). As células foram solubilizadas em 8M de ureia e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade no sistema automatizado de cromatografia líquida ÄKTAprime (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) utilizando coluna HisTrap™ (GE Healthcare). As amostras foram guardadas a -20 °C.

4.4.2 Western Blot

O *Western Blot* foi realizado segundo Sambrook & Russel (2001). Brevemente, após eletroforese de SDS-PAGE 10%, procedeu-se a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Amershan TM Hybond™ – ECL GE Healthcare). Foi utilizado marcador Precision Plus Protein™ Standards (Dual color) Bio-Rad; 20 μ L da proteína Cry 11Aa (3080ng μ l⁻¹); 20 μ L de BSA 10%; 20 μ L proteína GP 19. A membrana foi bloqueada com leite em pó 5% diluído em PBS-T durante 1h sobre agitação. Após a membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina (Anti-His C-terminal – HPR Ab – Invitrogen) 1: 6000 v/v em PBS-T. Posteriormente a membrana foi lavada com PBS-T por três vezes e incubada com anticorpo anti-camundongo conjugado à peroxidase (DAKOPATTS A/S, Dinamarca) 1: 6000 v/v em PBS-T, voltando para agitação por 1h. A membrana foi novamente lavada com PBS-T por cinco vezes e revelado com DABI (3,3 Tetrahidrocloreto`Diaminobenzidina - Sigma – Aldrich).

4.4.3 Quantificação da proteína

Para quantificar a proteína recombinante seguiu-se protocolo proposto por Bradford (1976). Uma amostra de 1mL de proteína foi diluída em 1mL de água destilada. O método foi padronizado usando-se uma curva de BSA 10%. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro TP-READER – Thermo Plate com onda de 630nm.

4.5 Teste biológico larvicida em mosquito

4.5.1 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Para obtenção de *Bti* (suspensão esporo/cristal) uma semente foi semeado em 10mL de meio BHI, ficando sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 28 °C por 18h sendo após transferido para um *Erlenmeyer* contendo 250mL de meio NYSM, onde este cultivo permaneceu sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 28 °C por 72h.

4.5.2 *Escherichia coli* recombinante

Para obtenção de *E. coli* recombinante uma das colônias transformantes foi utilizada para inocular 10mL de meio LB líquido contendo ampicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), estes ficaram sobre agitação em agitador orbital por 18h a 150rpm. Estes cultivos foram utilizados para inocular 250mL de meio LB contendo os antibióticos acima citados na mesma concentração. Quando o cultivo atingiu uma D.O = 0,7 (OD_{600}) foi adicionado o indutor IPTG na concentração 0,3mM, e as culturas permaneceram sobre agitação a 37 °C por mais 3h a fim de se obter a proteína recombinante Cry 11Aa.

4.5.3 *Escherichia coli* BL 21 (DE3) Ril

Para cultivo de *E. coli* BL 21 (DE3) Ril uma semente foi semeado em 10mL de meio LB contendo antibiótico cloranfenicol ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), ficando sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 37 °C por 18h sendo após transferido para um *Erlenmeyer* contendo 250mL de meio LB com antibiótico, onde este cultivo permaneceu sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 37 °C por 18h.

4.5.4 *Bacillus sphaericus*

Para cultivo de *B. sphaericus* uma semente foi semeado em 10mL de meio NYSM, ficando sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 30 °C por 18h sendo após transferido para um *Erlenmeyer* contendo 250mL de meio NYSM, onde este cultivo permaneceu sob agitação em agitador orbital a 150rpm a 30 °C por 18h.

4.5.5 Preparação das amostras

Todos os cultivos citados acima foram centrifugados a 6.000 X g por 15min. As células foram suspendidas em água destilada estéril, obtendo um volume final de 200mL de cada cultivos. Estes foram quantificados através de titulação.

4.5.6 Teste Biológico

Para testar a ação inseticida da proteína recombinante Cry 11Aa, foi realizado um ensaio em triplicata utilizando larvas de segundo instar de *Culex quinquefasciatus* gentilmente cedidas pelo Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia da UFPel, utilizando placas de microcultivo (NUNC®) de 24 cavidades. A metodologia utilizada foi a de tratamentos espaciais com inseticidas (REZENDE et al., 2004), seguindo padrões impostos pela OMS, com algumas modificações. Em cada um dos poços foi adicionado 200µL de suspensão de bactéria (10^7 UFC/mL) diluídas em 1800mL de água destilada. Foram feitas diluições logarítmicas de base 10 (até a diluição 10^{-8}) da suspensão bacteriana, sendo adicionada 5 larvas por cavidade. Como controle foi utilizado *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cepa original, *Bacillus sphaericus* e água destilada. O ambiente onde o teste foi realizado se manteve climatizado com temperatura de 25 °C durante todo o experimento. A mortalidade foi registrada durante o período de 24, 48 e 72 h após o tratamento, contando-se o número de larvas mortas e vivas, utilizando a fórmula de Abbott (REZENDE et al., 2004).

$$\text{Fórmula de Abbott} = \frac{\% \text{ de mort. de EXPOSTOS} - \% \text{ de mort. no CONTROLE} \times 100}{100 - \% \text{ de mortalidade no CONTROLE}}$$

5 RESULTADOS

5.1 Construção do vetor pAE/ *cry 11Aa*

5.1.1 Amplificação do Gene *cry 11Aa*

O gene *cry 11Aa* foi amplificado por PCR. O tamanho esperado deste produto é de aproximadamente 1932 pb o que foi evidenciado após a realização da eletroforese em gel a 1% agarose (Figura 3).

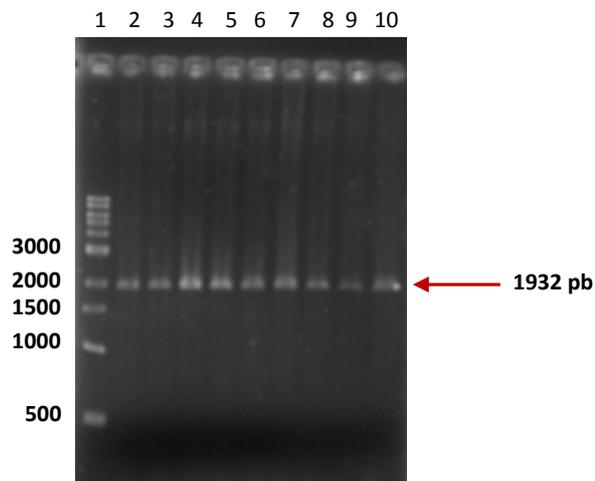


Figura 4: Eletroforese do produto de amplificação do gene *cry 11Aa*. Linha 1 Marcador Kb (Invitrogen); Linhas 2 a 10 Gene *cry 11Aa* amplificado.

5.1.2 Digestão do Vetor pAE e do Gene *cry 11Aa*

Após a amplificação do gene os produtos foram purificados e digeridos com as enzimas de restrição. Fez-se o mesmo com o vetor pAE e como mostrado na figura 5.

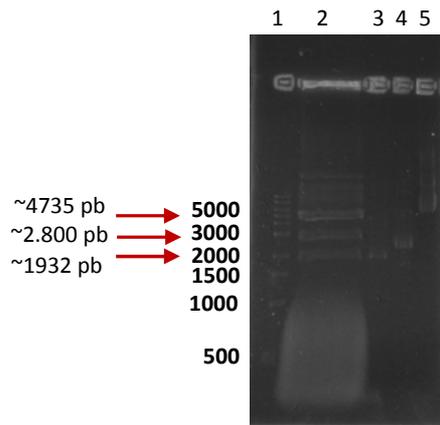


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão do gene *cry 11Aa* e plasmídeo pAE. Linha 1 Marcador 1 Kb (Biolabs); Linha 2, pAE/*cry 11Aa* digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *BamHI*, pAE digerido e *cry 11Aa* digerido; Linha 3 PCR *cry 11Aa* ~1932 pb ; Linha 4, vetor pAE não digerido ~2800 pb; Linha 5, pAE/*cry 11Aa* circular ~4735 pb.

O vetor de expressão pAE possui sítios de clonagem que permitiu a inserção do gene de interesse, possui também uma cauda com seis histidinas N-terminal ao transgene que possibilitou a detecção da proteína, um gene de resistência a ampicilina, o que facilitou a identificação das colônias transformadas e o promotor T7 que regulou a expressão do gene de interesse. As características deste vetor estão demonstradas na figura 7. A ligação do vetor pAE com o gene *cry 11Aa* resultou no plasmídeo pAE/*cry 11Aa*

5.1.3 Mapa do vetor de expressão pAE/cry 11Aa.

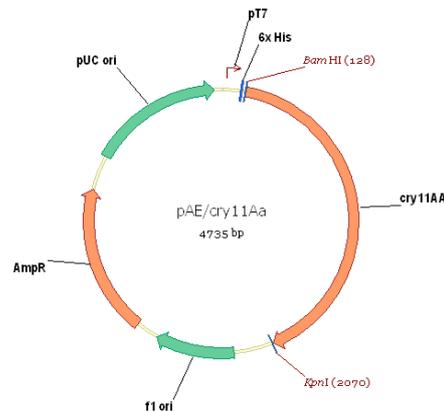


Figura 6: Mapa do vetor de expressão pAE/cry 11Aa. O mapa apresenta o sítio de inserção do *gene cry 11Aa* entre as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I; O promotor T7, que regula a expressão do gene; Cauda de 6 X Histidina para a detecção e purificação da proteína e o gene de resistência a ampicilina. Fonte: Vector.

5.1.4 Extração do plasmídeo pAE/cry 11Aa

Para confirmar as colônias transformadas com o vetor pAE/cry 11Aa procedeu-se a extração do plasmídeo. As colônias transformadas apresentaram bandas mais altas que o controle pAE não transformado como mostram as figuras 7 e 8.

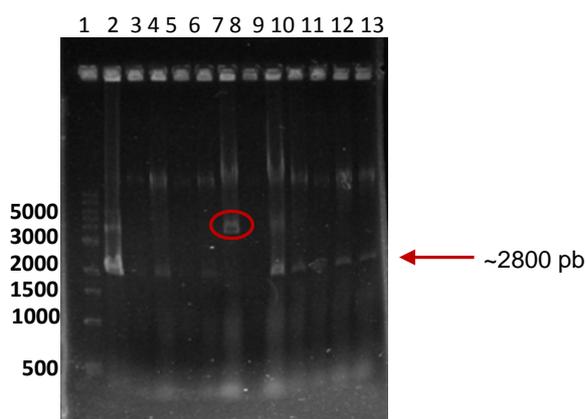


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de plasmídeo recombinante em *Escherichia coli* TOP 10. Linha 1 Marcador 1 Kb (Biolabs); Linha 2, plasmídeo pAE circular ~2800 pb; Linhas 3 a 6, Plasmídeos não transformados; Linha 7, Plasmídeo transformado pAE/cry 11Aa ~4735 pb; Linhas 8 a 13, Plasmídeos não transformados.

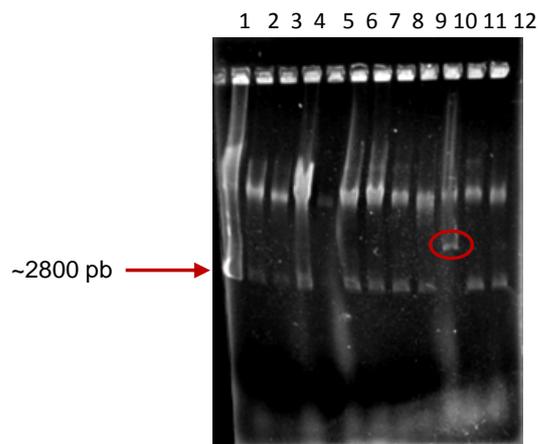


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% da extração de plasmídeo recombinante em *Escherichia coli* TOP 10. Linha 1, Vetor pAE; Linhas 2 a 9, 11 e 12, Plasmídeos não transformados; Linha 10, Plasmídeo transformado pAE/cry 11Aa ~4735 pb;

5.1.5 PCR Colônia de *Escherichia coli* contendo o vetor pAE/cry 11Aa

Para confirmação das colônias de *E. coli* transformadas realizou-se PCR com os oligoiniciadores usados para amplificação do gene *cry 11Aa*. A figura 9 mostra a amplificação do gene *cry 11Aa*, demonstrando que este gene está inserido no genoma da bactéria *E. coli*.

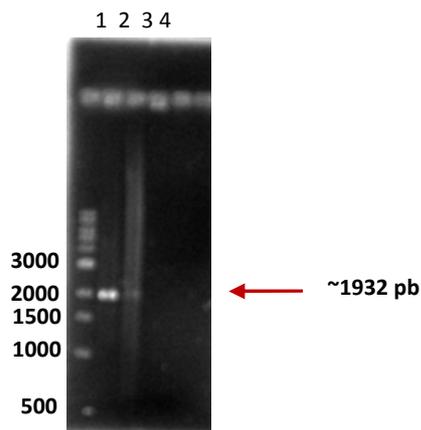


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% da amplificação do fragmento *cry 11Aa* por PCR de colônia. Linha 1, Marcador 1 Kb (Biolabs); Linha 2, amplifícon *cry 11Aa* a partir de DNA da colônia 7; Linha 3, amplifícon *cry 11Aa* a partir de DNA da colônia 10.

5.2 Western Blot

A expressão da proteína Cry 11Aa foi confirmada através de *Western blot* usando-se anticorpos anti-histidina. O tamanho esperado da proteína recombinante é de aproximadamente 72 Kda.

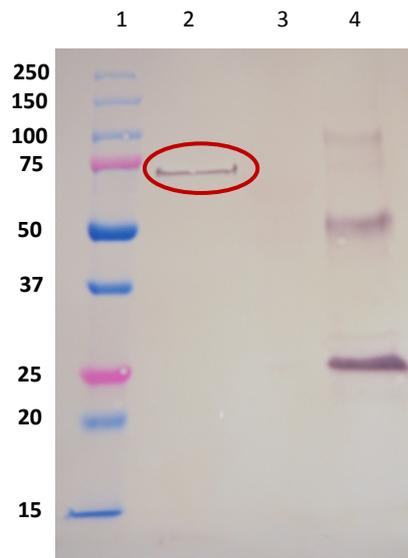


Figura 10: *Western Blot* da proteína Cry 11Aa expressa em *Escherichia coli* BL 21 (DE3) RIL. Linha 1, Marcador de proteínas Bio-Rad Dual color; Linha 2, Proteína Cry 11Aa de 72 Kda; Linha 3, controle negativo BSA 10%; Linha 4, Controle positivo GP19 purificada de ~25 Kda.

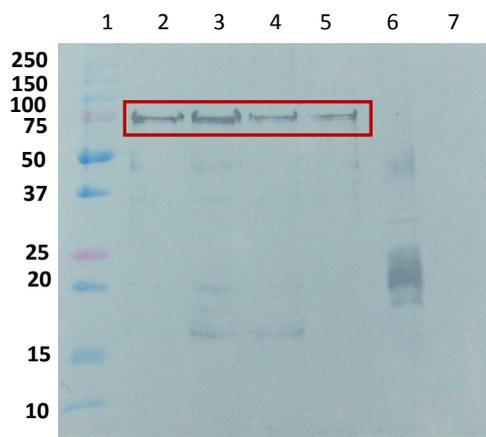


Figura 11: *Western Blot* da proteína Cry 11Aa expressa em *Escherichia coli* BL 21 (DE3) C41. Linha 1, Marcador de proteínas Bio-Rad Dual color; Linha 2, 3, 4 e 5 Proteína Cry 11Aa de 72 Kda; Linha 6, controle positivo GP19 purificada de ~25 Kda; Linha 7, controle negativo BSA 10%.

5.2.1 Quantificação da Proteína

A concentração da proteína expressa em *E. coli* BL 21 (DE3) Ril foi de 150ng/ μ L e a concentração da proteína expressa em *E. coli* BL21 (DE3) C41 foi de 550ng/ μ L, ou seja, \sim 3.6 x maior.

5.3 Teste biológico larvicida em mosquito

A *Escherichia coli* recombinante (Cry 11Aa) demonstrou atividade larvicida. A cepa original de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contendo o gene *cry 11Aa* também apresentou letalidade semelhante após 72h, chegando a um percentual de 95% na diluição 10^{-8} . A dose letal foi calculada utilizando a fórmula de Abbott.

6 DISCUSSÃO

Devido a sua atividade inseticida, as toxinas Cry são usadas no mundo inteiro como bioinseticidas para controlar pragas urbanas e agrícolas. Porém existem algumas limitações para esses preparados a base de *B. thuringiensis*, dentre eles podemos citar a sedimentação em água parada, que acaba removendo a bactéria da zona de alimentação das larvas (LUXANANIL et al., 2003). Além disso, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* podem ter seu efeito alterado de acordo com a radiação solar, temperatura e pH (ROSAS-GARCÍA et al., 2008).

Uma alternativa para suprir tais limitações é a utilização de organismos geneticamente modificados como é o caso da clonagem de proteínas Cry em plataforma *E. coli* uma vez que essas bactérias habitam em zonas de alimentação do mosquito servindo como alimento para fase larval do mesmo. Segundo trabalho realizado por Pinto et al., (2012) a *E. coli* recombinante serviu como um ótimo atrativo e estimulante para oviposição que foi aumentada em comparação com a cultura de *Bacillus*.

Há uma série de relatos em que a clonagem e expressão de genes de toxinas de *B. thuringiensis* foram realizadas buscando a caracterização dessas toxinas, conforme demonstrado na tabela 2. O uso de *E. coli* como sistema de expressão, permite a produção seletiva de proteínas Cry com especificidade bioinseticida para seu estudo, funcionalmente melhorada através da engenharia genética de proteínas (BOSCH et al., 1994; DE MAAGD et al., 1996; LIMA, 2010).

Tabela 1 – Genes clonados de *Bacillus thuringiensis* em plataforma *Escherichia coli*.

Plasmídeos	Gene clonado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Referência
pHE4-D	<i>cry 11Aa</i>	(BEN-DOV et al., 1995)
pHE4-AD	<i>cry 4Aa</i> e <i>cry 11Aa</i>	
pHE4-DR	<i>cry 11Aa</i> e <i>p20</i>	
pHE4-ADR	<i>cry 4Aa</i> , <i>cry 11Aa</i> e <i>p20</i>	
pVE4-DRC	<i>cry 11Aa</i> , <i>p20</i> e <i>cyt 1Aa</i>	(KHASDAN et al., 2001)
pVE4-DC	<i>cry 11Aa</i> e <i>cyt 1Aa</i>	
pVE4-ADRC	<i>cry 4Aa</i> , <i>cry 11Aa</i> , <i>p20</i> e <i>cyt 1Aa</i>	
pVE4-ADC	<i>cry 4Aa</i> , <i>cry 11Aa</i> e <i>cyt 1Aa</i>	
pVE4-ARC	<i>cry 4Aa</i> , <i>p20</i> e <i>cyt 1Aa</i>	
pVE4-AC	<i>cry 4Aa</i> e <i>cyt 1Aa</i>	

Em nosso estudo para amplificação do gene *cry 11Aa*, um par de oligoiniciadores específicos: anterógrado (5`- GGG GAT CCA TGG AAG ATA GTT CTT TAG – 3`) e retrógrado (5`- CCG GTA CCC TAC TTT AGT AAC GG – 3`) foram desenhados e sintetizados. Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I e inserido em *E. coli* vetor pAE para se obter o plasmídeo recombinante pAE/*cry 11Aa*. Em seguida, pAE/*cry 11Aa* foi expresso em plataforma *E. coli* BL21. O resultado do *Western Blot* mostrou que Cry 11Aa pode ser expressa obtendo a proteína recombinante de 72 kDa em *E. coli* BL21 (DE3). A proteína expressa em *E. coli* BL21 (DE3) C41 conseguiu expressar ~3.6 x mais que a *E. coli* BL21 (DE3) Ril conforme quantificação pelo método de Bradford. Isso pode ser explicado devido a estirpes mutantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3), chamadas de C41 (DE3) e C43 (DE3) originalmente descrito por Miroux e Walker (1996), serem frequentemente utilizados para ultrapassar a toxicidade associada com a superexpressão de proteínas recombinantes.

Para produzir δ -endotoxinas mosquitocidas Bukhari e Shakoori (2009), clonaram o gene Cry 11 de *Bt* cepa DAB 5 (SBS Bt 45) e esta foi transformada em *E.coli* BL21C, obtendo uma proteína de peso molecular de aproximadamente 70 Kda. Em testes com larvas de terceiros instar de *Anopheles stephensi*, foi verificado que a

proteína recombinante teve uma atividade 860 vezes maior para as larvas comparadas com a cepa original de *B. thuringiensis* contendo o gene *Cry 11*. Porém o autor relata que houve mutações no gene presente no plasmídeo transformado, podendo assim sugerir que o aumento observado deu-se devido a esta mutação. Em nosso estudo, não observamos modificações em relação ao gene original, onde o gene clonado apresentava uma identidade de 99% com o gene *cry 11Aa* original do *Bt*.

Delécluse e colaboradores (1995) testaram a atividade larvicida contra *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* e *Aedes stephensi*, a partir de um isolado de *Bt* contendo inclusões purificadas e de uma *E.coli* recombinante produzindo apenas a proteína Cry11A. A toxina Cry11A do isolado era tóxica para as todas as espécies testadas, com elevada atividade contra *Culex pipiens*, onde era mais tóxico do que a cepa padrão de *Bt*. Em nosso estudo demonstramos através de teste biológico a atividade toxica da proteína recombinante Cry 11Aa contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, obtendo uma letalidade de 95% após 72h de experimento. O mesmo resultado foi obtido na cepa de *Bti*, sugerindo que esta ação se deve a similaridade do gene *cry 11Aa* presente na bactéria.

Também foi observada alta letalidade em larvas de *C. quinquefasciatus* na atividade larvicida de *E. coli* recombinantes (BinAB), (Pinto et al, 2012). Isso demonstra que a bactéria *E. coli* recombinante é uma ferramenta eficaz para ser administrada na alimentação de larvas de *C. quinquefaciatus* tendo a mesma aceitabilidade pelas larvas que se alimentam de cepas *E. coli*.

Estas observações enfatizam que *E. coli* é um sistema de expressão eficaz para proteínas recombinantes Cry, além de ser uma ferramenta útil para a manipulação de toxinas geneticamente modificadas sem que ocorram modificações pós-traducionais.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a proteína recombinante Cry 11Aa, têm potencial para ser utilizada no controle biológico.

7 CONCLUSÕES

A proteína recombinante Cry 11Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pode ser expressa em *E. coli*.

A proteína recombinante Cry 11Aa expressa em *E. coli* apresentou atividade biológica em larvas de *Culex quinquesfasciatus*.

REFERÊNCIAS

BHATTACHARYA, P. R. *Bacillus thuringiensis* crystal protein (δ -endotoxin) gene expression is independent of early sporulation specific functions. **Journal of Biosciences**. v.18, n.2, p.221-228, 1993.

BLAIOTTA, D.; ERCOLINI, C.; PENNACCHIA, V.; FUSCO, A.; CASABURI, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**. v.97, p.719-730, 2004.

Ben-Dov, E.; Boussiba, S.; Zaritsky, A. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Journal of Bacteriology**. v.177(10), p.2851-2857, 1995.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C. H.; LESCAR, J. Structural of the functional form of the mosquito larvicidal cry 4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8 Å resolution. **Journal of Bacteriology**. v.188, p.3391-3401, 2006.

BOSCH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER KLEI, H.; DE MAAGD, R.; STIEKEMA, W. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **BioTechnology**. v.12, p.915–918.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRAVO, A.; Gill, S.S.; SOBERON, M.; *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: Comprehensive Molecular Insect Science. **Elsevier BV**. v.6, p.175–206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicology Review**. v.49(4), p. 423-435, 2007.

BUKHARI, D. A. A.; SHAKOORI, A. R. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* cry11 crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Molecular Biology Reports**. v.36, p.1661-1670, 2009.

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

CHOU, C. P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.521-532, 2007.

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

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v.31, p.53-80, 1993.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan* encoding a highly mosquicidal protein, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61(12), p.4230–4235, 1995.

DE MAAGD, R. A.; KWA, M. S.; VAN DER, K. H.; YAMAMOTO, T.; SHIPPER, B.; VALK, J. M.; SHIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1A (b) Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and altered Membrane Protein Recognition. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.5, p.1537-1543, 1996.

DE MAAGD, R. A.; BAKKER, P. L.; MASSON, L.; ADANG, M. J.; SANGADALA, S.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry 1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v.31, p.463-471, 1999b.

De MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics, Amsterdam**, v.17, n.40, p.193-199, 2001.

DE MAADG, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, C. B. N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.37, p.409-433, 2003.

DEMAIN, A.L., VAISHNAV, P. "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms". **Biotechnology Advances**, v.27, p.297–306, 2009.

DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. **Agriculture and Humam Values**. v.24, p.281-306, 2007.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **Euopean Patent Applied**. EP O. p. 303-426 A2, 1998.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M. A.; NYE, G.J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M.G. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.5389-5394, 1996.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; et al. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galechiae*. **Collection of Czchoslovak Chemical communications**, v.34, p.1118-1120, 1969.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In Proc of XXVII Ann. Meeting of the Soc. **For Invertebrate Pathology. France, Montpellier**. p.184, 1994.

FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M. H.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry 11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop a-8 of domain II. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. v.579, p.3508-3514, 2005.

FERRÉ, JUAN; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.501-533, 2002.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano.XI, n.38, p.32-35, 2010.

FIUZA, L. M. *Receptores de Bacillus thuringiensis* em insetos: análises in vitro de receptores membranares de proteínas Cry em larvas de lepidópteros. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.32, p.82-87, 2004.

GLARE, R. T.; O'CALLAGHAN, M. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Biocontrol & Biodiversity**. p.02-58, 1998.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M.; *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley**. p.350, 2000.

HABID, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactéria entomopatogênicas. In Controle Microbiano de Insetos. Editado por S.B. Alves. 2. Ed. **FEALQ, Piracicaba**. p.383-446, 1998.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* in: Entomopath bact.: from laboratory to field application. (Charles, J. et al., eds), **Kluwer Academic Publishers**. p.41-44, 2002.

HOWLADER, M. T. H.; KAGAWA, Y.; SAKAI, H.; HAYAKAWA, T. Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry 4Aa. **Journal Bioscience and Bioengineering**. v.3, p.179-183, 2009.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for Screening recombinant colonies. **Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology**. H71, 234, 2006.

KAGIMURA, F. Y.; KASBURG, C. R.; FREITAS, D.; VILANI, D.; QUEIROZ, J. A.; DAMIN, S.; ONOFRE, S. B. Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Bauveria bassiana* (Bals.) VUILL. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.4, n.2, p.277-290, 2011.

KHASDAN, V.; BEN-DOV, E.; MANASHEROB, R.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Environmental Microbiology**. v.3(12), p.798-806, 2001.

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.J.; CHIU, S.S.; CURRIER, S.; GONZALEZ JR.; J.M. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of bacteriology**. v.172, p.3172-3179, 1990.

LUXANANIL, P.; TANAPONGPIPAT, S.; PROMDONKOY, B.; ATOMI, H.; IMANAKA, T.; PANYIM, S. Expression of binary toxin genes in the mosquito-colonizable bacteria, *Bacillus cereus*, leads to high toxicity against *Culex quinquefasciatus* larvae. **Current Microbiology**. v.47, p.372-375, 2003.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology Review**. v.60, p.512-538, 1996.

MARROQUIN, L. D.; ELYASSNIA, D.; GRIFFITTS, J. S.; FEITELSON, J. S.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** v.155, p.1693-1699, 2000.

MARTINS, E. S. **Clonagem expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Programa de Pós-Graduação Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2005.

MIROUX, B.; WALKER, J.E. O excesso de produção de proteínas em *E. coli*: hospedeiros mutantes que permitem a síntese de algumas proteínas de membrana e de proteínas globulares em níveis elevados. **Journal Molecular Biology**. v.260, p 289-298, 1996.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: mode de ação e resistência. **Controle Biológico**, v.3, p.163-200, 2000b.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasmas de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: **Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. p.65, 2001.

OECD, 2007. Consensus Document on Safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derive insect control proteins. **Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)**, p.1-109, 2007.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**. v.15; 246(2), p.191–198., 2005.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M.; Recombinant protein therapeutics – success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**. **Boston**, v.22, p.1513-1519, 2004.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, **Cambridge**, v.15, p.173-177, 1997.

PETRY, F., LOZOVEI, A. L.; FERRAZ, M. E.; NETO, L. G. S. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.48. p.127-132, 2004.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.71, n.2, p.255-281, 2007.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**. v.3, p.159-168, 2008.

PINTO, L. S.; GONÇALES, R. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; KNABAH, P. F.; BORSUK, S.; CAMPOS, V. F.; ARRUDA, F. V.; LEITE, F. P. L. Stability, oviposition attraction, and larvicidal activity of binary toxin from *Bacillus sphaericus* expressed in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.95, p.1235-1241, 2012.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis* : Uma breve revisão. **Agrociência**. vol.VII, n.2, p.1-10, 2003.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37(8), p.1103-1109, 2004.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P.R.; NIELSEN-LE ROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**. v.18, p.189-194, 2010.

REDDY, S. T.; KUMAR, N. S.; VENKATESWERLU, G. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnology Letters**. v.20, p. 279-281, 1998.

REZENDE, M. C.; FALERO, G. C.; MACORIS, M, L, G.; ANDRIGHETT, M. T. M.; TAKAKU, L. Instruções para Bioensaio para avaliação de aplicações espaciais de inseticidas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.13(3), p.185-190, 2004.

RIBEIRO, P. B.; COSTA, P. R. P.; LOECK, A. E.; VIANNA, E. E. S.; JUNIOR, P. S. Exigências térmicas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera, culicidae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Ilheringia. **Série Zoologia**. v.94, n.2, p.177-180, 2004.

ROSAS-GARCÍA, N.M.; MIRELES-MARTÍNEZ¹, M.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, J.L. & IBARRA, J.E. Screening of cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal of Applied Microbiology**. v104, p.224–230, 2007.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. MolecularCloning - A Laboratory Manual (2a ed.). **Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal

crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.62, p.775-806, 1998.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. (Org). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. **Caxias do Sul: EDUCS.** p.433, 2002.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* Dbased insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology.** v.77, p.13-21, 2001.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology.** v.72, n.2, p.211-222, 2006.

URNINATTI, P. R.; NATAL, D.; COSTA, C. B.; CERETTI, W. Estudo da variação sazonal da população de *Culex quinquefasciatus* em área periurbana da cidade de São Paulo. **O Biológico.** v.64, n.1, p.1-12, 2002.

WERNECK, J. O. S.; JÚNIOR, E. F. S.; EVANGELISTA, L. S.; SILVA, T. A. de L.; VALTEZ, V. R.; MONNERAT, R. G. Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).** p.20, 2008.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews Microbiology.** v.40. p. 549-576, 1986.

YAMAGIWA, M.; OGAWA, R.; YASUDA, K.; NATSUYAMA, H.; SEN, K.; SAKAI, H. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry 11Aa produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** v.68, p.523-528, 2002.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes,** v.3, p.315-343, 1984.

ZHONG, C.; ELLARD, D.J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S. & HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxin to insects in three orders. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.76, p.131-139, 2000.