

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Instituto de Biologia  
Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado



**Monografia de Conclusão de Curso**

**AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E QUÍMICO DE**

*Culex quinquefasciatus*

Revisão sobre os principais métodos e alternativas para  
construção de Bioinseticidas a partir de *Pichia pastoris*

**Mariana Lima Terres**

Pelotas, 2008

**MARIANA LIMA TERRES**

**AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO E QUÍMICO DE *Culex quinquefasciatus***  
Revisão sobre os principais métodos e alternativas para construção de Bioinseticidas  
a partir de *Pichia pastoris*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biológicas – Bacharelado – da  
Universidade Federal de Pelotas  
como requisito parcial para  
obtenção do grau de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite  
Co-Orientador(a): Prof. Msc. Luana Alves Dummer

**Pelotas, 2008**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dr. Carina Martins de Moraes

Prof. Dr. Paulo Bretanha Ribeiro

Dr. Luciano da Silva Pinto

*Dedico este trabalho à minha família e a todos que contribuíram,  
direta ou indiretamente, para sua conclusão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais, Ubirajara e Sônia, pela compreensão nos momentos de minha ausência, pelo seu amor, carinho, paciência, exemplo e sinceridade em todos os momentos da minha vida.

Agradeço às minhas irmãs, Gabriela e Alanna, pelo amor, carinho e companheirismo, por todas as alegrias que me proporcionaram e continuam proporcionando, pela amizade e solidariedade nos momentos de insegurança e temor durante o trilhar desta jornada.

Agradeço ao meu orientador, Fábio Pereira Leivas Leite, pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de trabalhar e ganhar experiência na área de meu maior interesse dentro do ramo da pesquisa.

Agradeço à Luana Alves Dummer que foi muito mais do que minha co-orientadora, e sim uma grande amiga e colega de laboratório.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Bacteriologia e de Microbiologia. Ao Alceu, Nizoli, Carina, Lorena, Andrea, Adalgisa, Liana, João Rodrigo, Carlos Gil, Régis, Rita, Talita, enfim, a todos que me ajudaram e compartilharam seus conhecimentos e também pela grande amizade que jamais será esquecida.

Agradeço as minhas grandes amigas e inspirações, Carina, Luana, Rita e Adalgisa que foram de extrema importância durante esta jornada. Graças ao apoio, aos seus incentivos, aos conselhos e à nossa grande amizade, consegui chegar onde estou. Vocês me ajudaram a passar por esta etapa da minha vida, sendo companheiras nos momentos felizes ou tristes. Não importa o que aconteça vocês estarão sempre no meu coração e sempre terão o meu carinho e a minha amizade.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas, em especial à Mity, por sua amizade e compreensão, tanto nos momentos felizes quanto nos tristes. Vocês também colaboraram para o fim dessa jornada e ficarão sempre em minha lembrança.

*É preciso impor a si mesmo algumas metas  
para se ter a coragem de alcançá-las.*

*-Benito Mussolini*

Terres, Mariana Lima. Agentes de controle biológico e químico de *Culex quinquefasciatus*: revisão sobre os principais métodos e alternativas para construção de bioinseticidas a partir de *Pichia pastoris*.

## RESUMO

Os mosquitos são importantes vetores de doenças que, apesar da existência de diversos produtos para o controle de suas populações, continuam vitimando milhares de pessoas em todo o mundo, o que tem levado a busca de novas estratégias com objetivo de controlar essas populações. O controle químico através de inseticidas apresenta certa eficiência, porém causa danos ambientais além da ocorrência do desenvolvimento da resistência dos mosquitos decorrente do amplo espectro de ação desses inseticidas. O controle biológico constitui uma alternativa viável no controle de vetores, principalmente quanto à questão ambiental. Com a detecção e isolamento das primeiras variedades de bacilos com propriedades larvicidas, o *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* e a variedade de *B. sphaericus*, que se mostrou altamente tóxica para alguns mosquitos, em especial o *Culex quinquefasciatus*. A ação larvicida desta última bactéria sobre as larvas de mosquito-alvo se deve a presença de protoxinas sintetizadas durante a esporulação e montadas na forma de cristal paraesporal depositada ao longo do esporo ou dentro do esporângio. A principal toxina presente nas cepas de *B. sphaericus* é a toxina binária, composta de duas proteínas: a subunidade A, com 51.4 kDa e a subunidade B com 41.9 kDa, que cristalizam-se em um única molécula paraesporal. Após a ingestão, a toxina é internalizada causando a lise das células do trato gástrico das larvas-alvo. Com a existência de cepas altamente toxigênicas de *B. sphaericus*, torna-se necessário a construção de organismos geneticamente modificados que possibilitem a produção de inseticidas biológicos com alta capacidade toxigênica e especificidade para uso no controle biológico de mosquitos. Existem várias alternativas para a construção de organismos expressando diferentes toxinas, uma delas seria introduzir os genes do *B. sphaericus* em leveduras, como a *Pichia pastoris*. Uma das características que torna *P. pastoris* um excelente candidato para a expressão destas proteínas recombinantes dá-se ao fato que larvas de mosquitos são alimentadas com leveduras em criadouros, tornando desta forma um veículo fácil de administração das toxinas as larvas de 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> estágios.

## Lista de Figuras

Figura 1	Desenho esquemático das fases de desenvolvimento do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	16
Figura 2	Micrografia de <i>Bacillus sphaericus</i>	28
Figura 3	Microscopia eletrônica de <i>B. sphaericus</i> mostrando a localização do esporo e do cristal paraesporal	30

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
2.1 Controle Biológico	11
2,2 Manejo Integrado de Vetores	12
2.3 Controle de Insetos Vetores	13
2.4 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say (1823) (Diptera: Culicidae)	15
2.4.1 Biologia e Ecologia	15
2.4.2 Importância na Saúde Pública	17
2.5 Inseticidas Químicos	18
2.5.1 Organoclorados	19
2.5.2 Organofosforados	21
2.5.3 Carbamatos	22
2.5.4 Piretróides	22
2.6 Resistência a Inseticida Químicos	23
2.7 Inseticidas Alternativos	24
2.8 Bactérias Entomopatogênicas	26
2.8.1 <i>Bacillus sphaericus</i>	27
2.8.2 Toxinas Inseticidas	29
2.8.3 Modo de Ação da Toxina Bin	31
2.8.4 Receptor da Toxina Bin	32
2.9 Uso da Levedura <i>Pichia pastoris</i> para produção de Toxinas de <i>B. sphaericus</i>	33
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>37</b>
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

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, com uma estimativa de dois milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas com estas enfermidades (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999). As três principais espécies que veiculam a maioria dos patógenos humanos pertencem aos gêneros: *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. O controle satisfatório destas populações de mosquitos é impedido pela sua enorme habilidade reprodutiva e flexibilidade genética, o que se manifesta através do desenvolvimento de resistência a inseticidas, levando a constante procura por novos produtos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Por estas razões se vê necessário a introdução de novas estratégias no controle destas doenças. O desenvolvimento de novas vacinas e a construção de mosquitos transgênicos refratários aos agentes infecciosos deverá auxiliar no controle destas enfermidades em um futuro próximo. Entretanto, na atualidade, o esforço maior deve ser feito no desenvolvimento de estratégias de controle.

Os inseticidas usados são baseados em produtos sintéticos com amplo espectro de ação visando reduzir grandes populações de vetores. No entanto, as mesmas propriedades que tornam estes inseticidas úteis, como largo espectro de toxicidade e ação residual prolongada, têm sido responsáveis por sérios problemas ambientais. A emergência e a disseminação de resistência em muitas espécies de vetores, a inter-relação com poluição ambiental e o alto custo no desenvolvimento de novos inseticidas químicos tornam evidente a necessidade de buscar novas alternativas para o controle de vetores.

O controle biológico é uma alternativa viável, principalmente quando se prioriza a questão ambiental (RODRIGUES; TADEI; DIAS, 1988). De forma crescente, tem sido direcionada atenção para uma série de inimigos naturais dos insetos como predadores, parasitas, e patógenos bacterianos, fúngicos e virais. Entretanto, a escolha de um agente biológico deve atender a parâmetros tais como: i) possuir as propriedades de um inseticida químico no que tange a toxicidade ao inseto alvo, passível de ser produzido com alto rendimento em escala industrial; ii) ter durabilidade e estabilidade, permitindo períodos prolongados de armazenamento; iii) bem como ser facilmente transportável (KRIEG; MILTENBURGER, 1984).

Baseada nesta premissa, esse trabalho tem como objetivo realizar uma revisão sobre os principais agentes relacionados ao controle biológico e controle químico do mosquito *Culex quinquefasciatus*, além de apresentar possíveis alternativas para o controle destes através do uso de técnicas de biologia molecular e da levedura *Pichia pastoris*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Controle Biológico**

O controle biológico é um processo no qual as populações existentes nos ecossistemas são reguladas devido à ação de inimigos naturais, que constituem os agentes de mortalidade biótica. Esta estratégia é muito utilizada em sistemas agroecológicos, assim como na agricultura convencional que se vale do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

As dificuldades no controle de vetores utilizando compostos químicos têm ocorrido devido ao aparecimento de resistência (RESENDE; GAMA, 2006), o que aumenta a importância dos agentes de controle biológico. Organismos capazes de parasitar ou preda mosquitos em suas várias fases vêm sendo estudados e em 1964 já eram conhecidos cerca de 220 predadores invertebrados de larvas de mosquitos entre rotíferos, celenterados, platelmintos, moluscos, anelídeos, crustáceos, aracnídeos e insetos (CÔNSOLI et al., 1984). CHAPMAN (1974) amplia tal lista, incluindo vírus, rickettsias, bactérias, protozoários e fungos.

Segundo ALVES (1998), a variabilidade natural dos seres vivos é uma característica que pode ser explorada em programas de biocontrole, visto que, no caso dos entomopatogênicos, esta variabilidade manifesta-se na forma de produção

de toxinas ou em enzimas, crescimento em meio de cultura, resistência as condições ambientais, entre outros.

Os inimigos naturais mais utilizados como biopesticidas são os microrganismos, como bactérias, fungos e vírus (SUJII et al., 2002). De acordo com MORAES; CAPALBO; ARRUDA (1998) as bactérias entomopatogênicas apresentam algumas vantagens para o controle de pragas, relação aos demais grupos de entomopatógenos, entre eles, a produção de esporos resistentes às condições ambientais adversas e principalmente, a sua comprovada inocuidade ao ser humano, mamíferos em geral e à flora e fauna benéficas (MENEZES, 2007).

## **2.2 Manejo Integrado de Vetores (MIV)**

Segundo BOARETTO & BRANDÃO (2000), no final da década de 50 e início da década de 60, surge uma nova forma de pensar o controle de pragas. Inicialmente denominado Controle Integrado, evoluindo posteriormente para Manejo Integrado de Pragas (MIP). O MIP pode ser caracterizado pela consonância dos métodos de controle, baseados em princípios ecológicos, econômicos e sociais (MENEZES, 2007).

Outra definição dada por CHALEGRE (2008) foi de que o Manejo Integrado de Vetores (MIV) ou Manejo Integrado de Pragas (MIP) consiste em uma combinação racional de diversos métodos de controle disponíveis objetivando manter a população de vetores em níveis aceitáveis e de maneira mais efetiva, econômica e segura. Esta combinação inclui componentes biológicos, químicos, físicos e ambientais, visando interferir o mínimo possível no ecossistema. O mesmo autor afirma que, no âmbito do controle de mosquitos, estas ações podem incluir a melhoria da rede de esgoto e distribuição de água, eliminação física de criadouros, uso de barreiras físicas nas habitações, medidas de proteção individual, uso de larvicidas específicos em criadouros que não podem ser eliminados, além da

conscientização e participação da comunidade. Dentre estas ações, o uso de biolarvicidas apresenta vantagens, como a especificidade para o inseto alvo e segurança para o meio ambiente.

O MIP envolve três aspectos principais: i) determinar como o ciclo vital de um patógeno precisa ser modificado, de modo a mantê-lo em níveis toleráveis, ou seja, abaixo do limiar de dano econômico; ii) combinar o conhecimento biológico com a tecnologia disponível para alcançar as modificações necessárias, ou seja, exercer a ecologia aplicada; iii) desenvolver métodos de controle adaptados às tecnologias disponíveis e compatíveis com aspectos econômicos e ecológico-ambientais, conseguindo, assim, a aceitação econômica e social (GEIER, 1966).

### **2.3 Controle de Insetos Vetores**

As práticas para controle de insetos vetores não são recentes. Há registro de seu uso na China há mais de 2.000 anos. Primeiramente essas práticas eram direcionadas para o controle de pragas agrícolas. No fim do século XIX, foram descobertas certas espécies de insetos e alguns artrópodos responsáveis pela transmissão de algumas das mais importantes doenças. Vacinas ou medicamentos efetivos contra a maioria delas ainda não estavam disponíveis e o controle da transmissão era, todavia, fortemente centralizado no combate ao vetor. Os primeiros programas de controle eram baseados em medidas físicas e na aplicação de óleo ou de verde de Paris nos criadouros (ROZENDAAL, 1997).

Hoje, muitas doenças contam com vacinas eficientes, como a da febre amarela, ou com medicamentos geralmente eficazes, como da malária. Porém, ainda é imprescindível o controle do vetor para prevenir diversas doenças, por exemplo, a dengue. Além disso, é parte integrante de muitos programas de saúde, como os voltados à prevenção e controle da malária e das leishmanioses (BRAGA; VALLE, 2007).

A função do controle de vetores em Saúde Pública é prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão. Seus principais objetivos são: i) Manejar os problemas existentes, como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade; ii) Prevenir epidemias ou a re-introdução de doenças; iii) Reduzir os fatores de risco ambiental da transmissão. Para que esses objetivos sejam alcançados, é necessário contar com informações sobre o hospedeiro, a doença, o vetor e o ambiente; e dispor dos recursos necessários para aplicação oportuna (BRAGA; VALLE, 2007). Para se ter um controle efetivo dos vetores não se pode depender de um só método, mas sim, deve-se dispor de várias alternativas, adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva (BRAGA et al., 1999).

O controle seletivo do vetor, definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser considerado uma operacionalização do controle integrado. Ele inclui a seleção das metodologias mais efetivas a serem utilizadas, com base na realidade local, e compreende três fases: i) definição de local; ii) levantamento das informações necessárias; e iii) decisão sobre o momento e a forma de sua implementação (BRAGA et al., 1999).

Os componentes do controle integrado de vetores incluem vigilância, redução da fonte (ou manejo ambiental), controle biológico, controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (ROSE, 2001). O manejo ambiental lança mão de medidas para eliminar o vetor ou seus focos, ou, ainda, para impedir o contato homem-vetor, como a eliminação de criadouros, a drenagem e a instalação de telas em portas e janelas. O controle biológico de mosquitos inclui o uso de vários predadores, invertebrados aquáticos (como *Toxorhynchites* ou copépodos) ou peixes (*Gambusia sp.* e outros) que comem larvas e pupas. Entre as medidas de controle biológico, também se encontram o uso de patógenos, como o fungo *Lagene diumgiganteum*, e de parasitas, como os nemátodeos (*Romanomer- mis culicivorax* e *R. iyengari*) (ROSE, 2001). Vários agentes de controle biológico apresentaram um bom potencial para suprimir populações de mosquitos, como o peixe predador *Gambusia affinis* (HOY, 1985), as bactérias patogênicas *Bacillus thuringiensis israelensis* (MULLA et al., 1982) e *Bacillus sphaericus* (GOLDBERG; MARGALIT, 1977; MULLIGAN III; SCHAEFER; WILDER, 1980) e o fungo patogênico *Metharizium anisopliae* (SCHOLTTE et al., 2003).

## **2.4 *Culex quinquefasciatus* Say, (1823) (Díptera: Culicidae)**

Segundo GUIMARÃES et al. (2001), o gênero *Culex* apresenta aproximadamente 750 espécies. O *C. quinquefasciatus* é tido como uma espécie cosmopolita por distribuir-se por quase todas as regiões do mundo. É encontrado nas porções meridionais da Ásia, na África, nas Américas (desde a parte Central e Sul dos Estados Unidos até a Argentina) e na Oceania. No Brasil, esta espécie está disseminada em todos os centros urbanos, geralmente associada às condições precárias de saneamento, principalmente relacionada a águas residuais (URNINATTI et al., 2002). A presença deste inseto nestas áreas pode estar diretamente relacionada com a incidência de diversas doenças (WHO, 2006) e com o incômodo que causam à população, refletindo na qualidade de vida.

### **2.4.1 Biologia e ecologia**

O *C. quinquefasciatus* tem um ciclo biológico curto diretamente influenciado pela temperatura, compreendendo as seguintes fases: ovo, larva (com 4 instares), pupa e adulto (Fig. 1). Os adultos têm hábito noturno e endofílico. As fêmeas são hematófagas e necessitam fazer o repasto sanguíneo para realizar a postura dos ovos. Estas atacam uma grande variedade de animais, sobretudo o homem, pois são antropofílicas. Aproximadamente 5 dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositam seus ovos agrupados em forma de “jangadas” na lâmina d’água, que eclodirão dando origem às larvas do 1º estágio (L1), entre 1 a 6 dias após a

oviposição (RIBEIRO et al., 2004). Estas larvas sofrem mudas sucessivas e passam por mais três estádios (L2, L3 e L4), com duração média de 7 a 35 dias, até atingir a fase de pupa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). As larvas são filtradoras e se alimentam ativamente de matéria orgânica disponível no ambiente aquático. Em criadouros a alimentação é feita através de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, entre outras. As pupas têm forma de vírgula e ficam paradas junto à superfície da água, embora apresentem mobilidade nesta fase. Esta etapa do desenvolvimento tem duração entre 1 a 5 dias e os indivíduos não se alimentam neste período. Após a fase de pupa, ocorre a emergência dos adultos dando início à fase alada. Os adultos passam por um período de repouso para a esclerotinização da cutícula e, em seguida, realizam a cópula e a busca por alimento. A longevidade dos adultos depende de condições favoráveis do meio, mas geralmente é de 5 a 8 meses, período em que a fêmea pode realizar entre 4 e 5 oviposições (CHALEGRE, 2008).

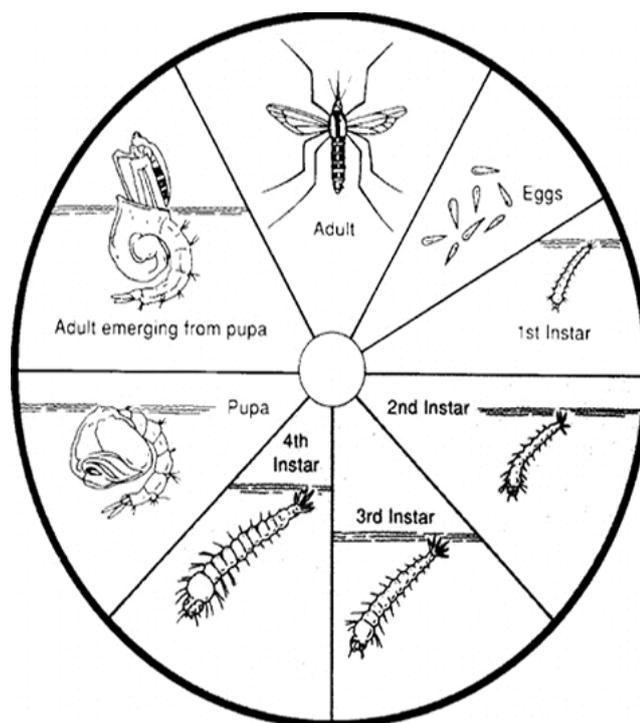


Figura 1 – Desenho esquemático das fases de desenvolvimento do mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Fonte: Arlington Virginia, 2007.

Os criadouros tanto de ambiente domiciliar como peridomiciliar são os mais variados, constituídos de depósitos artificiais e pequenas coleções de águas

estagnadas, com grande quantidade de matéria orgânica, resultando em criadouros típicos representados por coleções de águas altamente poluídas, anóxicas, mal cheirosas e de aspecto sujo, protegidos da exposição solar (MORAIS; MARRELLI; NATAL, 2006).

É comum observar a abundância de larvas em um único criadouro, pois se sabe que as larvas produzem um feromônio dentro do ovo que, ao realizarem as trocas gasosas, liberam este para o ambiente, o que atrai outras fêmeas para fazerem a oviposição em criadouros já colonizados. Quando em alta concentração, este feromônio tem efeito repelente, que poderia ser percebido pela fêmea como um local não apropriado para oviposição com possível competição por recursos (BARBOSA et al., 2007; CHALEGRE, 2008).

#### **2.4.2 Importância na saúde pública**

As espécies dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Mansonia* podem ser importantes vetores de patógenos causadores de doenças como a filariose linfática (MEDEIROS; MENEZES; CESSE, 2003), malária (VOORDOUW; KOELLA; HURD, 2008), dengue (TEIXEIRA et al., 2003), febre amarela (COIMBRA et al., 1987) e outras arboviroses, que atingem um número significativo de pessoas em países da Ásia, África e Américas. O *C. quinquefasciatus* é o vetor principal do nematódeo *Wuchereria bancrofti*, causador da filariose linfática no Brasil. Esta parasitose tem grande importância na saúde pública, pois é endêmica em várias regiões tropicais e, estima-se que há mais de 1,3 bilhões de pessoas, aproximadamente 19% da população mundial, vivendo em áreas sob o risco de contrair a infecção em 83 países e territórios e, cerca de 120 milhões de indivíduos parasitados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Destes, 90% são portadores da *W. bancrofti* e 10% de espécies de filárias de menor ocorrência. Os vermes adultos de *W. bancrofti* alojam-se nos linfonodos e vasos linfáticos do indivíduo infectado, e as

microfilárias (formas larvais) são encontradas no sangue periférico, possuindo uma periodicidade noturna com um pico entre 23:00 e 01:00 h. Este pico coincide com o horário preferencial de hematofagia do *C. quinquefasciatus*, na maioria das regiões endêmicas. As fêmeas ingerem as microfilárias no momento do repasto sanguíneo, e estas migram do tubo digestório para as glândulas salivares, onde elas atingem o estágio larval infectante (larvas L3). O quadro clínico da filariose pode ser assintomático, agudo ou crônico. As manifestações agudas podem ser linfangite, linfadenite, febre e mal estar e as crônicas podem ser linfedema, hidrocele, quilúria e elefantíase, podendo esta última, ser agravada por infecções bacterianas ou fúngicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Além de seu papel como vetor de agentes etiológicos causadores de doenças ao homem, o *C. quinquefasciatus* causa problemas secundários de saúde em inúmeras áreas urbanizadas do Brasil, pois gera um forte incômodo, causado pelas picadas, sons emitidos e alergias contribuindo para a diminuição da qualidade de vida da população (CHALEGRE, 2008).

## **2.5 Inseticidas Químicos**

O controle químico utilizando inseticidas de origem orgânica ou inorgânica representa uma das metodologias mais adotadas como parte no manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001).

O poder tóxico de um inseticida é determinado estabelecendo-se a dose mínima necessária para matar o inseto. Essa dose por sua vez é variável de acordo com os produtos existentes, diferentes reações fisiológicas de cada inseto, entre outros.

Em vista dos fatores expostos e devido a sua toxicidade variável em relação ao homem, animais e plantas, houve necessidade de estabelecer normas quanto a

seu uso, controlando as pragas, com conseqüências muito pequenas a outros organismos e ao meio ambiente (GALLO et al., 2002).

O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997). Foi nesse período que a descoberta e síntese de moléculas de ação inseticida revolucionaram a agricultura, fazendo com que os métodos de controle de pragas utilizados anteriormente (culturais, biológicos e físicos) fossem rapidamente substituídos, com a promessa de uma solução mais rápida e econômica para o controle de pragas e vetores (MENEZES, 2007).

Além dos organoclorados os principais compostos orgânicos inseticidas pertencem, principalmente, aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores (BRAGA; VALLE, 2007).

### **2.5.1 Organoclorados**

Os organoclorados são inseticidas constituídos de carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos; ciclodienos; e policloroterpenos, sendo que o primeiro é o mais antigo. Os difenil-alifáticos incluem o DDT, provavelmente a substância química mais notória do século passado.

Ele atua primariamente nos canais de Sódio (Na) das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos. Os canais de Na abrem-se no momento da transmissão de um impulso nervoso e fecham-se imediatamente após a despolarização da célula nervosa. Esse inseticida posiciona-se em algumas unidades dos sítios de ligação dos canais de Na de tal modo que estes permanecem abertos por um tempo maior, prolongando o período de influxo de Na após um potencial de ação. Em consequência disso, potenciais de ação repetitivos são desencadeados, e os insetos morrem devido à hiperexcitabilidade provocada por esse inseticida. O DDT interfere tanto nos canais de Na abertos como nos fechados (GALLO et al., 2002), e seu efeito é inversamente proporcional à temperatura: quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos.

O benzeno hexacloro (BHC), do grupo dos hexaclorociclohexanos (HCH), tem ação semelhante à do DDT. Os inseticidas ciclodienos, como o clordano, aldrin e dieldrin, surgiram após a Segunda Guerra Mundial. Em sua maioria, são persistentes e estáveis no solo, e relativamente estáveis quando expostos à luz solar ou ultravioleta. Foram utilizados principalmente no controle de térmitas e outro insetos cujas fases larvais alimentam-se nas raízes de plantas. Os ciclodienos inibem o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), que, após a ligação do neurotransmissor aumenta a permeabilidade dos neurônios aos íons Cloreto. Eles atuam impedindo a entrada dos íons cloreto nos neurônios, antagonizando os efeitos do receptor de GABA. Diferente do DDT e dos HCH, os ciclodienos apresentam uma correlação positiva entre a temperatura e toxicidade.

Semelhante aos ciclodienos, apenas dois policloroterpenos foram desenvolvidos: o toxafeno, (em 1947) e o estrobane (em 1951), que vieram a ser usados mais intensamente na agricultura. (BRAGA; VALLE, 2007).

Embora o uso dos organoclorados tenha sido largamente adotado pelos programas de controle de malária, seu uso foi descontinuado e chegando a ser proibido em vários países devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e de humanos.

Essas proibições e restrições referiram-se ao uso agrícola do DDT, embora o inseticida ainda permaneça até os dias de hoje, indicado pela OMS para uso no controle de vetores (BRAGA; VALLE, 2007).

### 2.5.2 Organofosforados

Incluem todos os inseticidas que contêm fósforo em sua constituição. Foram descobertos posteriormente aos organoclorados.

Esse grupo de inseticidas pode ser classificado em três subgrupos: os alifáticos, os derivados de fenil e os heterocíclicos. Apresentam maior utilidade em Saúde Pública por apresentarem muitas vantagens sobre os organoclorados, como serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. Entretanto, apresentam como principal desvantagem, a instabilidade química, tornando obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas.

Esses inseticidas atuam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Essa enzima apresenta dois sítios distintos conhecidos como esterático e aniônico, que servem como pontos de ligação para a acetilcolina. As moléculas dos organofosforados apresentam uma conformação estrutural que permite o encaixe no sítio esterático da enzima AChE, por meio do grupamento fosfato (fosforilação). Ao contrário da acetilcolina, que é prontamente hidrolisada na acetilação, a hidrólise da enzima fosforilada ocorre de maneira lenta. Assim, ocorre um acúmulo de moléculas de acetilcolina na sinapse, que leva à hiperexcitação do sistema nervoso, desencadeando o processo de paralisia que pode levar a morte do inseto (GALLO et al., 2002).

### 2.5.3 Carbamatos

São inseticidas derivados do ácido carbâmico e sua comercialização teve início por volta de 1960. O mais utilizado é o carbaril. Assim como os organofosforados, os carbamatos apresentam ação letal rápida sobre os insetos, apesar de um curto poder residual. Eles também inibem a AChE, embora, nesse caso, a reação envolvida é a carbamilação.

Apesar de atuarem de forma muito similar nos sistemas biológicos, apresentam duas diferenças principais em relação aos organofosforados. Primeiramente, alguns carbamatos são potentes inibidores da Aliesterase (uma Esterase alifática, cuja função exata é desconhecida) e apresentam seletividade pronunciada contra as AChE de certas espécies. A segunda diferença é que a inibição da AChE pelos carbamatos é reversível (BRAGA; VALLE, 2007).

### 2.5.4 Piretróides

Assim como os DDT, os piretróides atuam nos canais de Na dos neurônios do sistema nervoso central e periférico dos insetos, porém só o fazem nos canais de Na abertos no momento da despolarização da membrana do axônio.

Os piretróides, baseados nas antigas piretrinas naturais, surgiram a partir de 1965, e são representados pelas alfacipermetrinas, deltametrinas, permetrinas, cipermetrinas, lambda-cialotrina, entre outros, compreendendo inseticidas de uso agrícola, veterinário e domissanitário. Em geral são pouco tóxicos ou moderadamente tóxicos aos animais superiores e raramente estão envolvidos em

intoxicações ocupacionais no campo. O seu efeito de choque (*knock-down*) quase instantâneo, entretanto, permite a recuperação do inseto em algumas circunstâncias. Em geral, são dotados de poder residual maiores do que as piretrinas naturais, sendo menos sujeitos à fotodecomposição (GALLO et al., 2002).

## 2.6 Resistência a inseticidas químicos

A resistência aos inseticidas, da mesma forma que a resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos, representa um dos exemplos de seleção natural ou seleção darwiniana (GALLO et al., 2002). Desse modo, populações de insetos podem, naturalmente, apresentar uma proporção de indivíduos que tenham alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Cepas resistentes podem surgir como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes. O uso constante de inseticidas tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. A resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente, a re-emergência das doenças transmitidas por vetores, pois, apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle (MENEZES, 2007).

Apesar dos vários estudos documentados sobre a resistência, o número de mecanismos envolvidos é bastante pequeno e inclui diminuição da taxa de penetração pela cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado (BRAGA; VALLE, 2007).

Nesse contexto, o monitoramento e o manejo da resistência, assim como o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais, são elementos de suma importância em qualquer programa de controle de vetores.

## 2.7 Inseticidas Alternativos

O uso inadequado dos inseticidas químicos causa desequilíbrio nos ecossistemas, por poluírem o meio ambiente, atuarem sobre inimigos naturais e promoverem o surgimento de insetos resistentes (CAVALCANTI et al., 2003). Nesse contexto, outros produtos vêm sendo utilizados no controle de vetores. Eles pertencem, principalmente, aos grupos dos inseticidas biológicos e dos reguladores de crescimento (MENEZES, 2007).

Como exemplo de inseticidas biológicos, pode-se citar as bactérias patogênicas, que têm sido usadas no controle de pragas agrícolas por quase cinco décadas. Somente por volta de 1970, foram descobertas bactérias efetivas contra insetos de importância médica, principalmente mosquitos e simuliídeos.

Em 1964, foi descrita uma cepa de *Bacillus sphaericus* com efetividade contra mosquitos (KELLEN; MEYERS, 1964). Embora seu espectro de ação restrito a certos tipos de larvas de mosquito, sua eficácia em águas poluídas tornou-a particularmente útil contra espécies de *Culex*, vetores de filariose e de encefalites viróticas. Durante a última década, tem aumentado o uso de *B. sphaericus* em programas de controle de mosquitos que se desenvolvem em águas poluídas, em áreas urbanas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999).

Outra bactéria, o *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* (DE BARJAC, 1978) provou ser tão efetiva que, alguns anos depois de sua descoberta, tornou-se um dos principais componentes do Programa de Controle de Oncocercose da África

Ocidental e, posteriormente, passou a ser usada como uma alternativa para inseticidas químicos sintéticos em muitos programas de controle de mosquitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999).

Os reguladores de crescimento (ou IGR, sigla derivada de *Insect Growth Regulator*), que atuam no desenvolvimento e na reprodução dos insetos, também são considerados inseticidas alternativos. Os mais utilizados pertencem ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU, inibidores de síntese de quitina) ou são compostos quimicamente relacionados ao hormônio juvenil natural de insetos, considerados como análogos de hormônio juvenil (AHJ) (SLAMA; ROMANUK; SORM, 1974).

As BPU inibem a síntese de quitina nos insetos (POST; MULDER, 1974), resultando em interferência na formação de cutícula a cada vez que o inseto sofre a muda. Isso ocorre porque a cutícula apresenta quitina em sua composição. Os AHJ interferem no sistema endócrino dos insetos e também no seu desenvolvimento, inibindo a emergência dos adultos (MIAN; MULLA, 1982).

A variedade de inseticidas disponíveis para o controle de vetores de importância médica é reduzida. Aliados a isso, a resistência a produtos convencionais e o potencial desenvolvimento de resistência a reguladores do desenvolvimento de insetos indicam a necessidade de um controle racional de vetores que considere os diferentes componentes do controle integrado. Nesse contexto, a utilização de inseticidas deve ser vista como uma ferramenta complementar à vigilância e às ações de redução de criadouros (BRAGA; VALLE, 2007).

Outra alternativa seria a construção de organismos geneticamente modificados que permitissem a produção de inseticidas biológicos com alta capacidade toxigênica e especificidade para uso no controle de mosquitos. Ao mesmo tempo, um organismo que produz múltiplas toxinas seria bem mais difícil de desenvolver resistência, desta forma estendendo sua vida útil como inseticida biológico. Existem várias alternativas para a construção de organismos expressando diferentes toxinas. Uma delas seria a construção de uma amostra de *B. sphaericus* toxigênica contendo um gene que expresse uma ou mais das toxinas do *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*, outra seria o inverso, introduzir os genes da toxina binária de *B. sphaericus* em uma amostra toxigênica de *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*

(BAR et al., 1998; MURO; PRIEST, 2000; SHI et al., 2001; FEDERICI et al., 2003; TANAPONGPIPAT et al., 2003b). Uma alternativa seria introduzir os genes de *B. sphaericus* em bactérias que vivem no mesmo ambiente em que as larvas de mosquitos se desenvolvem tais como cyanobactérias (*Caulobacter crescentus*, *Ancylobacter aquatcus*) ou em *Enterobacter amnigenus* que foi isolada de larvas de *Anopheles dirus* (TANAPONGPIPAT et al., 2003a). Entretanto estas alternativas possuem sérios problemas que devem ser resolvidos antes de se tornarem viáveis para o seu uso como inseticida biológico tais como: instabilidade de plasmídeos que contém os genes das toxinas, exigência nutricional para sua produção em escala industrial, mas, principalmente, a baixa expressão de proteína heteróloga.

## 2.8 Bactérias Entomopatogênicas

Na busca por métodos alternativos mais seguros e seletivos para controle de insetos-praga, tem sido sugeridos reguladores de crescimento de insetos, feromônios, esterilizantes, parasitos, predadores e entomopatogênicos como agentes de biocontrole. Entende-se por entomopatogênicos os microrganismos que afetam os insetos, causando doenças que geralmente diminuem e, em alguns casos, eliminam totalmente populações de insetos. Entre as alternativas acima citadas, nenhuma é mais aplicável ou oferece maiores possibilidades de sucesso rápido do que o uso dos entomopatogênicos (CAPALLO; MORAES, 1988).

Dentro destes, as bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas os agentes mais promissores devido à eficiência de suas toxinas, a facilidade de produção em grande escala, assim como de armazenamento, transporte e aplicação.

As espécies que se destacam no controle biológico dos insetos vetores são o *Bacillus sphaericus* e o *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*. Estes microrganismos vêm sendo comercializados há mais de uma década, pois produzem proteínas inseticidas que, ao serem ingeridas, são letais para as larvas dos mosquitos devido a sua ação

no trato digestivo. O *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* tem atividade decrescente para os gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Mansonia*. Já o *B. sphaericus*, tem uma especificidade maior para espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* e menor para os gêneros *Aedes* e *Mansonia*. A grande vantagem que o *B. sphaericus* apresenta em relação ao *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* é a sua grande persistência em criadouros ricos em matéria orgânica, típicos de larvas de *Culex*, além de seus esporos sofrerem reciclagem nos cadáveres das larvas, ampliando seu período de persistência nos criadouros (NICOLAS; DARRIET; HOUGARD, 1987).

Produtos à base de *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis* têm sido usados em programas de controle de mosquitos e simúlideos por mais de 20 anos.

### **2.8.1 *Bacillus sphaericus***

Este bacilo destaca-se como agente de controle de larvas de *C. quinquefasciatus*. Descoberto por Neide (1904) é uma bactéria Gram-positiva, saprófita e esporulante, geralmente encontrada em solos e ambientes aquáticos (Fig. 2). Durante a fase de esporulação são produzidos esporos arredondados, localizados na região terminal em um esporângio em forma de raquete, além de inclusões ou cristais protéicos.

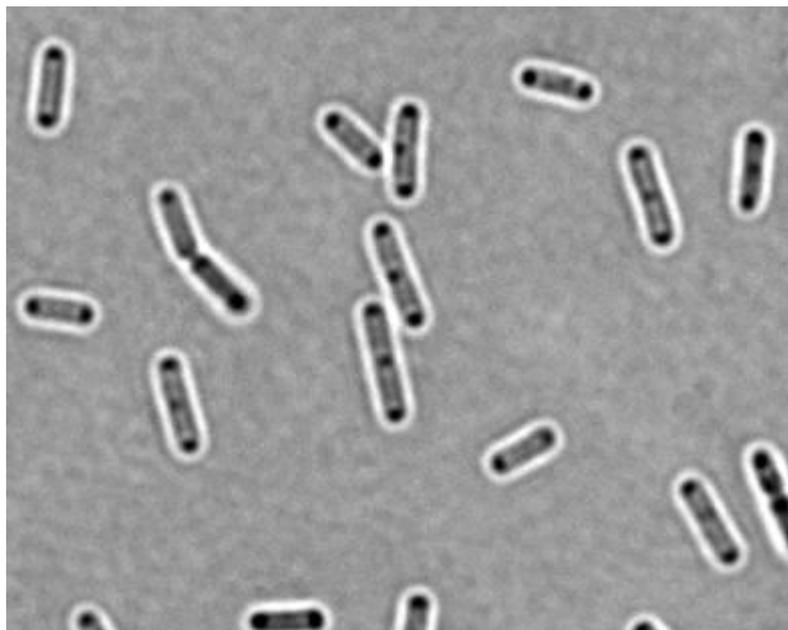


Figura 2 – Micrografia do *Bacillus sphaericus*.

Fonte: Agave Biosystems

O primeiro registro de isolamento de *B. sphaericus* foi realizado por KELLEN & MEYERS (1964), porém não recebeu atenção devido a sua baixa toxicidade. SINGER (1973) isolou diversas cepas, dentre elas a SSII-1, com uma toxicidade relevante a ponto de incentivar os estudos nesta área. Outras cepas com alta atividade larvicida foram isoladas, como a 1593 da Indonésia (SINGER, 1977), 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), 2362 da Nigéria (WEISER, 1984) e C3-41 da China (ZHANG et al., 1987). Estas são as principais cepas que têm sido utilizadas para a produção industrial de bioinseticidas à base do *B. sphaericus*. A classificação mais utilizada é pela técnica de aglutinação flagelar que determina os diferentes sorotipos. As cepas mais ativas estão classificadas segundo os seguintes sorotipos: H5a5b, que inclui as cepas 1593, 2362, 2317, 1691 e C3-41; H25, onde se encontra a cepa 2297 e o H6, no qual se inclui a IAB59 (DE BARJAC et al., 1985; CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELÉCLUSE, 1996).

O *B. sphaericus* é particularmente tóxico para larvas de *C. quinquefasciatus* e produtos comerciais à base desta bactéria estão disponíveis, inclusive no Brasil. A eficácia do uso do *B. sphaericus* para o controle de vetores já foi comprovada em vários países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1993; THIÉRY et al., 1996).

### 2.8.2 Toxinas Inseticidas

O *B. sphaericus* apresenta duas classes de toxinas inseticidas, a Toxina Binária (Bin) e as Toxinas Mosquicidas (Mtx), que são sintetizadas em diferentes fases do desenvolvimento da bactéria. Foram identificados três tipos de toxinas Mtx: A Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31,8 kDa) e Mtx3 (35,8 kDa). A Mtx1 é considerada uma protoxina, sendo processada por proteinases intestinais em fragmentos menores de 27 e 70 kDa (THANABALU et al., 1993). A identificação desta toxina foi realizada a partir da clonagem da cepa SSII-1, e ela é expressa durante a fase vegetativa de crescimento (THANABALU et al., 1991). Segundo PATRIDGE & BERRY (2002), a Mtx1 é a primeira toxina do *B. sphaericus* ativa para uma espécie de díptero da família Chironomidae, o *Chironomus riparus*. Outro dado importante deste estudo foi a detecção de atividade larvicida da Mtx1 contra *A. aegypti*, diferentemente da toxina Bin. Pelo fato de serem produzidas durante a fase vegetativa, as toxinas Mtx são degradadas por proteases e quase não contribuem para a toxicidade final de culturas esporuladas do *B. sphaericus* (CHARLES et al., 1996). Entretanto, quando expressas de forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx1 e Mtx2 possuem alta atividade larvicida para culicídeos (WEI; CAI; YUAN, 2006; WIRTH et al., 2007).

Vários estudos mostraram que a alta atividade inseticida é observada, exclusivamente, naquelas cepas do *B. sphaericus* produtoras de cristal durante a fase de esporulação (Fig. 3). Por esta razão, apesar das toxinas Mtx terem um importante potencial larvicida, observa-se que a atividade inseticida de culturas esporuladas do *B. sphaericus* é devida ao cristal que contém a toxina Bin, visto que as toxinas Mtx sofrem intensa degradação durante o crescimento bacteriano. Quando ingerido pelas larvas, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino liberando a protoxina Bin que é clivada por serina-proteases, para atingir a forma de toxina ativa (BAUMANN et al., 1985; DAVIDSON et al., 1987; BROADWELL; BAUMANN, 1987).

A protoxina é formada por dois polipeptídeos de 42 e 51 kDa (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988), denominados BinA e BinB, respectivamente. Estes polipeptídeos são produzidos de forma equimolar e, após a ativação proteolítica, são clivados em fragmentos de 39 e 43 kDa, respectivamente.

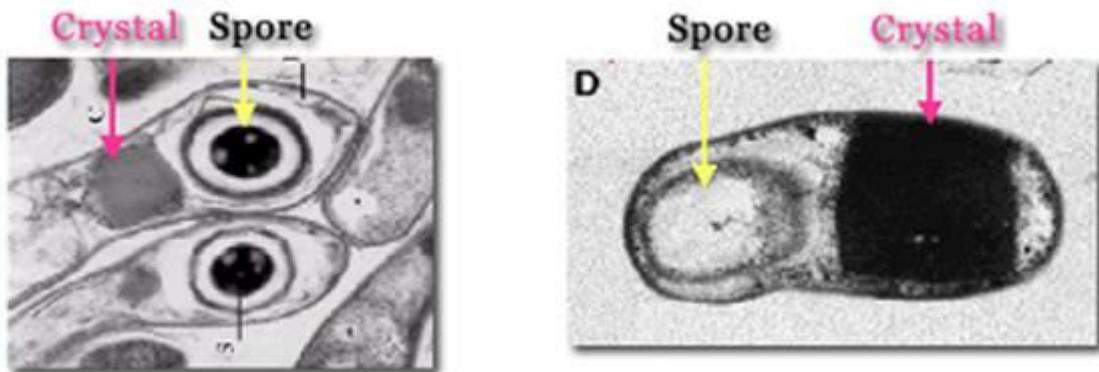


Figura 3 – Microscopia eletrônica de *B. sphaericus* mostrando a localização do esporo e do cristal paraesporal.

Fonte: Vietsciences-Nguyễn Lân Dũng, 2005.

Os componentes BinA e BinB agem em sinergia e, por esta razão, ela é considerada uma toxina binária (Bin) (NICOLAS et al., 1993). Experimentos para determinar a atividade *in vivo* dos dois componentes obtidos isoladamente através de cepas recombinantes, mostraram que BinA individualmente é tóxico para larvas de *C. pipiens*, embora seja requerido em altas concentrações, enquanto BinB isolado não é tóxico (NICOLAS et al., 1993). Posteriormente, estudos *in vitro* mostraram que o componente BinB é responsável por reconhecer e se ligar a receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal das larvas, enquanto BinA não tem capacidade de ligação e sua função está relacionada à toxicidade (CHARLES et al., 1997).

Recentemente, foi descoberto que o *B. sphaericus* cepa IAB59 produz duas outras toxinas até então desconhecidas. Os estudos desta cepa foram motivados pelo fato de larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes às cepas do *B. sphaericus* 2362 e

C3-41, que produzem apenas a toxina Bin, são susceptíveis à cepa IAB59, indicando que esta cepa deveria produzir outro fator tóxico além da toxina Bin (PEI et al., 2002). Foram identificadas duas toxinas da família Cristalogênica (Cry) na cepa IAB59, a Cry48Aa e Cry49Aa de 135 e 53 kDa, respectivamente, que agem em sinergia (JONES et al., 2007). A presença destas duas toxinas pode explicar porque esta cepa supera a resistência voltada para esta toxina. As toxinas Cry48Aa e Cry49Aa apresentam alta toxicidade para *C. quinquefasciatus* quando administradas de forma purificada e em concentração equimolar. Porém, a contribuição destes fatores para a toxicidade da cepa IAB59 nativa não é evidente devido ao baixo nível de acumulação da Cry48Aa no *B. sphaericus*, que impede a proporção de 1:1 requerida para a ação destas toxinas (JONES et al., 2007). O modo de ação destas duas toxinas é único, pois uma nova interação parece ser requerida entre a subunidade Cry48Aa, que é uma toxina Cry de três domínios, que diferentemente das outras toxinas Cry desta família necessita de uma proteína acessória que é a Cry49Aa, que possui homologia com a toxina Bin do *B. sphaericus* (JONES et al., 2007).

### 2.8.3 Modo de Ação da Toxina Bin

O *B. sphaericus* apresenta um espectro de ação restrito para larvas de mosquitos (LACEY et al., 1988, DAVIDSON; YOUSTEN, 1990; GROVES; MEISCH, 1996). Espécies do complexo *Culex*, como *C. quinquefasciatus* e *C. pipiens*, são as mais sensíveis.

DARBOUX et al. (2001), afirmam que o intestino médio de larvas de *C. pipiens* é o primeiro alvo da toxina binária (Bin) presente nas inclusões paraesporais de *B. sphaericus*. Após a ingestão do complexo espora-cristal por larvas de mosquitos suscetíveis, ocorre a rápida solubilização da matriz do corpo paraesporal, no pH altamente alcalino do intestino médio. Posteriormente, a toxina binária é proteoliticamente clivada a peptídeos ativos menores; a proteína de 51,4 kDa é

rapidamente convertida a uma proteína estável de 43 kDa, enquanto a proteína de 41,9 kDa é processada a um fragmento de cerca de 39 kDa. Estes polipeptídios, separadamente ou em associação, atravessam a membrana peritrófica e ligam-se a receptores específicos nas microvilosidades apicais da membrana das células epiteliais, nas regiões de ceco gástrico e intestino médio posterior. Em seguida, verifica-se a interiorização de ambas as toxinas, promovendo a toxicidade por um mecanismo ainda desconhecido, que induz o aparecimento de áreas de baixa densidade eletrônica, devido ao surgimento de grandes citolisossomos ou vacúolos nas células epiteliais do intestino, havendo expansão mitocondrial e posterior lise celular (MENEZES, 2007).

Durante o período de intoxicação, as larvas apresentam sintomas como a interrupção da alimentação, tremores e dificuldades de locomoção. Trata-se de um processo de ação lenta e gradual, com morte do inseto ocorrendo entre 4 – 48 horas, dependendo da dose ingerida (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000).

A etapa determinante do modo de ação da toxina Bin é o reconhecimento e ligação a receptores específicos presentes na superfície das microvilosidades intestinais.

#### **2.8.4 Receptor da Toxina Bin**

O receptor da toxina Bin presente no mesêntero de *C. quinquefasciatus*, principal espécie-alvo do Bsp, foi caracterizado como uma  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20) de 60 kDa, com 580 aminoácidos, ligada à membrana apical do epitélio intestinal, através de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (SILVA-FILHA et al., 1999; DARBOUX et al., 2001; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006). O receptor da espécie citada acima foi denominado Cqm1, em referência à “*C. quinquefasciatus*, maltase 1”. O gene que codifica o receptor nestas espécies possui aproximadamente 1870 nucleotídeos. A seqüência completa do gene *cqm1* está

disponível no GeneBank sob número de acesso DQ333335, obtida de uma colônia de *C. quinquefasciatus* sensível ao *B. sphaericus*, inclui uma região 5' não traduzida de 32 pares de bases (pb), uma região codificante de 1743 pb, um primeiro íntron de 50 pb e outro que foi previsto mas não identificado. Além disso, o gene apresenta uma região 3' não traduzida com tamanho variando entre 54 e 76 pb, o que pode estar associado à presença de dois sítios de poliadenilação (ROMÃO et al., 2006). A distribuição dos receptores no mesêntero é regional e ocorre principalmente no ceco gástrico e o intestino posterior na maioria das espécies de *Culex* susceptíveis (CHARLES et al., 1996). As seqüências do cDNA de *cqm1* possui 1851 pares de base, com uma região codificante de 1743 pb (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006). O reconhecimento e a ligação da toxina Bin ao receptor são considerados etapas chave na ação do *B. sphaericus* em larvas de mosquitos (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; NIELSEN-LEROUX et al., 1995).

## **2.9 Uso da levedura *Pichia pastoris* para produção de toxinas de *B. sphaericus***

Nas últimas duas décadas, a levedura haplóide e metilotrópica *Pichia pastoris* tem sido utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas (TORRES; MORAES, 2000). Esta levedura apresenta inúmeras vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, entre elas, a fácil manipulação genética que, associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitem sua expansão para produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO; GREG, 1999; CEREGHINO; GREG, 2000; GELISSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002). Outra característica que torna *P. pastoris* um excelente candidato para expressão de toxina com potencial larvicida dá-se ao fato que larvas de mosquitos são alimentadas com leveduras em criadouros, tornando desta forma

um veículo fácil de administração das toxinas as larvas de 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> estágio (COSTA, 1994).

Por ser um organismo eucarioto simples, a *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, entre elas a glicosilação, que é a adição de açúcar e de pontes dissulfídicas. Ela também é capaz de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, o que torna as etapas de purificação mais simples (CEREGHINO; GREG, 1999). Todavia, se a glicosilação não é desejada, as proteínas de interesse devem ser produzidas intracelularmente.

O sucesso do sistema *Pichia* está relacionado em grande parte ao promotor AOX1 do gene codificador para a enzima álcool oxidase que é reprimido no meio de cultura contendo glicerol, e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como fonte única de carbono (HINGGS, 1998; CREEG, 1999; BOETTNER et al., 2002). A enzima AOX, é a primeira enzima na via de utilização do metanol e constitui cerca de 70% do total de proteínas solúveis nas células crescendo em meio com metanol como fonte de carbono. Isso permitiu constatar que a síntese da enzima AOX é regulada em nível transcricional e que o promotor desse gene pode ser eficientemente empregado para controlar a expressão de genes exógenos (CREEG et al., 1993; GELLISSEN et al., 2005). Estudos do genoma de *P. pastoris* revelaram a existência de um segundo promotor funcional para enzima álcool-oxidase, o gene AOX2, que codifica uma proteína que é 97% idêntica e tem a mesma atividade específica da AOX1. Entretanto, em células de levedura crescendo em metanol, AOX2 codifica a menor fração do total de álcool-oxidase durante a expressão. Assim, o promotor de AOX1 tem sido incorporado em muitos vetores de expressão (CREEG et al., 1993; HINGGS, 1998).

De acordo com a inserção do gene para síntese da proteína exógena no genoma da levedura, existem duas possibilidades que caracterizam dois fenótipos distintos de *P. pastoris*. Estes dois fenótipos são: Mut<sup>+</sup> (Methanol Utilization Plus) e Mut<sup>s</sup> (Methanol Utilization Slow). Mut<sup>+</sup> apresenta os genes AOX1 e AOX2 funcionais e crescem em metanol em níveis similares ao selvagem. O Mut<sup>s</sup> apresenta seu promotor AOX1 reprimido. O metabolismo de metanol nessa linhagem é dependente da transcrição do gene AOX2 e por isso cresce lentamente em metanol, mas,

eventualmente, esse mutante produz mais proteínas quando comparado ao Mut<sup>+</sup> (HIGGINS, 1998; CHAUHAN et al., 1999).

Uma vez que uma cópia do gene da proteína de interesse está integrada por célula transformada, o aumento da densidade populacional aumenta o rendimento da proteína por massa de células (CREEG et al., 1993). Algumas proteínas heterólogas são glicosiladas quando secretadas em leveduras, porém eventos indesejáveis como processo aberrante ou hiperglicosilação podem acontecer durante esse processo gerando proteínas não-funcionais (SMITH et al., 1985; CHEN et al., 1996; MONTESINO et al., 1998; NOHR et al., 2003).

*P. pastoris* também é considerada uma levedura com capacidade fermentativa pobre, tendo preferência por crescimento respiratório (CEREGHINO et al., 2002). A vantagem desta característica sobre as leveduras fermentativas é a possibilidade de obter cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos de fermentação causem danos de toxicidade para as células (TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO et al., 2002).

Vários genes de diferentes procedências, como bactérias, vírus (DUMMER, 2008), fungos, invertebrados, plantas e humanos já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1. A maioria dos genes expressos tiveram seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns, como o fator de necrose tumoral humano, foi produzido no ambiente intracelular (SREEKRISHNA et al., 1989). Os vetores de expressão em *P. pastoris* são geralmente do tipo integrativo. Esses vetores possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene AOX1 além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (*his4*) de *P. pastoris*.

Para a manutenção e replicação do plasmídio em *B. sphaericus*, há uma origem de replicação de procariotos, sendo que a seleção, tanto em procariotos como em leveduras, é realizada através do gene *Sh ble* que confere resistência ao antibiótico Zeocina.

Recentemente, novos plasmídios com promotores alternativos se tornaram disponíveis. Esses vetores contêm o promotor GAP, um forte promotor constitutivo derivado do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP). Em culturas

crescidas em glicose, os níveis de expressão obtidos pelo promotor GAP são similares àqueles obtidos com o promotor AOX1 em culturas crescidas com metanol em frascos. Uma das vantagens do promotor GAP com relação ao promotor AOX1 é que, por ser constitutivo, não é necessário mudar a cultura de um meio para outro para induzir expressão. No entanto, o uso do promotor GAP é apropriado somente para genes cujo produto não seja deletério para a célula. Além do mais, os níveis de expressão a partir do promotor AOX1 são geralmente aumentados quando o metanol é adicionado à culturas com taxas de crescimento limitantes em fermentadores. O mesmo fenômeno não é observado com o promotor GAP. Este promotor é utilizado para expressões de proteínas intracitoplasmáticas que não causem prejuízos à célula.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico é uma alternativa racional, extremamente necessária e essencial para a melhoria da saúde pública e da agricultura, além de não trazer prejuízos ao meio ambiente.

Dentre os agentes utilizados para o controle biológico, destacam-se as bactérias entomopatogênicas por possuírem inúmeras vantagens em relação aos demais agentes, como sua densidade, distribuição espacial e temporal e, principalmente, pela sua especificidade sobre os insetos-alvo.

A construção de um inseticida biológico recombinante surge como uma estratégia dentro do controle biológico.

Baseado nas informações precedentes, está em andamento um projeto que objetiva produzir de um inseticida biológico recombinante tendo como base a levedura *P. pastoris*, à qual serão clonados os genes da toxina binária de *B. sphaericus* (ANEXO 1). Desta forma, os genes deverão ser inseridos no vetor de expressão constitutivo pGAP, disponibilizado comercialmente. Assim, a cepa selvagem de *Pichia pastoris* X-33 recombinante deverá ser fornecida a larvas de *C. quinquefasciatus* para avaliar a eficácia e os níveis de toxicidade do inseticida biológico elaborado a partir de *Pichia pastoris* recombinante para o controle de mosquitos.

#### 4. REFERÊNCIAS

AGAVE BIOSYSTEMS. Figura 2 - Micrografia de *B. sphaericus*. Disponível em:<<http://www.agavebio.com/Catalog/images/S-layer%20Catalog%20img7.jpg>> Acesso em: 07 out. 2008.

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba-SP: FEALQ, 1998. p.21-37

ARLINGTON VIRGINIA, 2007. Figura 1 - Desenho esquemático das fases de desenvolvimento do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Disponível em: <[http:// www. Arlingtonva.us/Departamentos/HumanServices/services/ health/ Envhealth/Humanservicesmosquitocontrol5.aspx](http://www.Arlingtonva.us/Departamentos/HumanServices/services/health/Envhealth/Humanservicesmosquitocontrol5.aspx)> Acesso em: 5 out. 2007.

BAR, E.; SANDLER, N.; MAKAYOTO, M.; KEYNAN, A. Expression of chromosomally inserted *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin genes in *Bacillus sphaericus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 206-213, 1998.

BARBOSA, R. M. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n.4, p. 523-529, 2007.

BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 163, p. 738-747, 1985.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 2045-2050, 1988.

BOARETTO, M. A. C.; BRANDÃO, A. L. S. **Manejo Integrado de pragas**. Apostila da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2000. 7p.

BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOLZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. High-throughput screening for the expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal Biotechnology**, 99: 51-62, 2002.

BRAGA I. A.; GALARDO A. K. R.; MACHADO FILHO M. R.; ZIMMERMAN R.; BRAGA I. L. Controle seletivo de vetores da Malária: guia para o nível municipal. **Brasília: Ministério da Saúde**; 1999.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Revista de Epidemiologia do Serviço de Saúde**, dic. 2007, vol.16, no.4, p.179-293. ISSN 1679-4974.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 1333-1337, 1987.

CAPALLO, D. M. F.; MORAES, I. de O. Controle Biológico de Insetos. **Anais- 2. Sociedade de Entomologia do Brasil**. Campinas, Fundação Cargill, 115p.,1988.

CAVALCANTI, R. S.; MOINO, J. R. A.; SOUZA, G. C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxan sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto de Biologia**, V.69, p.17-22, 2003.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnol.**, v. 13, p. 329-332, 2002.

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

CHAPMAN, H. C. Biological control of mosquito larvae. **Annual Review of Entomology**, v.19, p.33-59, 1974.

CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p. 451-472, 1996.

CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. **Annual Institut Pasteur/Actualités**, Paris, v. 7, p. 233-245, 1997.

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**. v. 95 (Supl. 1): p. 201-206, 2000.

CHAUHAN, A. K.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**. 34: 139-145, 1999.

CHEN, Y.; CINO, J.; HART, G.; FREEDMAN, D.; WHITE, C.; KOMIVES, E. A. High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. **Process Biochemistry**, 32: 107-111, 1997.

COIMBRA, T. L. M. et al. Epidemiological investigation into cases of yellow fever in the North-west region of S. Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 21, n. 3, 1987. Disponível em: [http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101987000300004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101987000300004&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 29 Set. 2008. doi: 10.1590/S0034-89101987000300004

CONSOLI, R. A. G. B.; GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, C. P.; SANTOS, B. de S. Atividade predatória de *Helobdella triserialis lineata* (Hirudínea: Glossiphonidae) sobre formas imaturas de *Aedes fluviatus* e *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae), em laboratório. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, p.359-66, 1984.

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

COSTA, P.R.P.; VIANNA, É.E.S.; SILVEIRA JÚNIOR, P.; RIBEIRO, P.B. Influência da temperatura na longevidade e viabilidade do ciclo aquático de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 1994.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376-3385, 1985.

CREEG, J. N.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris* – a review – **Biotechnology**, 11: 905-910, 1993.

DARBOUX, I.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F.; PAURON, D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect biochemistry and Molecular Biology**, n.31, p.981-989, 2001.

DAVIDSON, E. W. et al. Enzymatic activation of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 50, p. 40-44, 1987.

DAVIDSON, E. W.; YOUSTEN, A. A. The mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus*. In: BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**, New Brunswick: Ed. Rutgers University, 1990. p. 237-255.

DE BARJAC, H. A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Série D 1978;286(10):797-800.

DE BARJAC, H. et al. Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity in mosquito larvae. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 21, p. 85-90, 1985.

DUMMER, L. A. **Clonagem e expressão em *Pichia pastoris* da glicoproteína D (gD) de Herpesvírus Bovino tipo 5**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FEDERICI, B.A.; PARK, H.W.; BIDESHI, D.K.; WIRTH, M.C.; JOHNSON, J.J. Recombinant bacteria for mosquito control. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 3877-3885, 2003.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CRAVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, ed. Piracicaba-SP: FEALQ, v. 10, p.303-95, 2002.

GEIER, P. W. Management of insect pests. **Annual Review of Entomology**, 11:471-490, 1966.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J. M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; KLEI, I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. **FEMS Yeast Research** – In press – 2005.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergei unguilata*, *Culex univittata*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News** 1977;37:355-358.

GROVES, R. L.; MEISCH, M. V. Laboratory and field plot bioassay of *Bacillus sphaericus* against Arkansas mosquito species. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 12, p. 220-224, 1996.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI. **Ectoparasitas de importância veterinária**. São Paulo, Plêiade/FAPESP, p. 105-153, 2001.

GURKAN, C.; ELLAR, D.J. Expression in *Pichia pastori* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* CytAa1 toxin. **Protein Expression and Purification**, v. 29, p. 103-116, 2003.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M.. **Methods of Molecular Biology**, 1 ed. vol. 103. Humana Press-Totowa, New Jersey, 1998, 270p.

HOY J. B. Experimental mass-rearing of the mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of American Mosquito Control Association**, 1985;1(3):295-298.

JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

KELLEN, W.R.; MEYERS, C. M. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1964;7:442-448.

KRIEG, A.; MILTEBURGER, H.G. Bioinseticides: I. *Bacillus thuringiensis*. In: MIZRAHI, A. & VAN WEZEL, A. L. **Advances in Biotechnological Process**. New York, Alan R. Liss, Inc., 1984. p. 273-290.

LACEY, L. A. et al. Mosquito host range and field activity of *Bacillus sphaericus* isolate 2297 (serotype 25). **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 4, p. 51-56, 1988.

MEDEIROS, Z.; MENEZES, J. A.; CESSE, E. P. et al. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951 – 2000. **Revista de Epidemiologia do Serviço de Saúde**, June 2003, v. 12, n. 2, p. 77-86. ISSN: 1679-4974.

MENEZES, A. M. D. **Avaliação de substratos alternativos para produção de bioinseticida a base de *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide (1904) (Eubacteriales: Bacillaceae) e impacto dos principais inseticidas químicos, utilizados para controle de *Culex quinquefasciatus* Say (1823) (Diptera: Culicidae), sobre a ação desta bactéria.** 2007. 142f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MIAN, L. S.; MULLA, M. S. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. **Residue Reviews**, 1982;84:27-112.

MONTESINO, R.; GARCIA, R.; QUINTERO, O.; CREMATA, J. A. Variation in N-linked oligosaccharide structure on heterologous protein secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 14: 197-207, 1998.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.815-844, 1998.

MORAIS, S.A.; MARRELLI, M. T.; NATAL, D. Aspectos da distribuição de *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.50, n.3, p.413-418, 2006.

MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A.; DARWAZEH, H. A.; EDE, L. Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes. **Applied Environmental Microbiology**, 1982;43(6):1288-1293.

MULLIGAN III, F. S.; SCHAEFER, C. H.; WILDER, W. H. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H.14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology**, 1980;73:684-688.

MURO, M. A.; PRIEST, F.G. Construction of chromosomal integrants of *Bacillus sphaericus* by conjugation with *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 547-555, 2000.

NOHR, J.; KRISTIANSEN, K.; KROGSDAM, A. M. Protein expression in yeasts. **Methods Molecular Biology**, 232: 111-25, 2003.

NICOLAS, L., DARRIET, F., HOUGARD, J.-M. Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. **Medical Vectors Entomology**, Oxford, v. 1, p. 157-162, 1987.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 275-280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.-F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 210, p. 585-590, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C., et al. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 228, p. 206-210, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report on the workshop on the large scale-use of *Bacillus sphaericus* to control *Culex quinquefasciatus* in urban environments**. Maroua, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis: the disease and its epidemiology**. Geneva, 2006. Disponível em: <[http://www.who.int/lymphatic\\_filariasis/epidemiology/en/](http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/)>. Acesso em: 26 set. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guideline specifications for bacterial larvicides**. Geneve: WHO; 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis***. Geneve: WHO; 1999

PARTRIDGE, R. M.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 79, p. 135-136, 2002.

PAUCHET, Y. et al. Effects of a mosquitocidal toxin on mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1335-1344, 2005.

PEI, G. F. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes a slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002.

POST, L. C.; MULDER, R. Insecticidal properties and mode of action of 1-(2,6-dihagenzoyl)-3-phenylureas. Los Angeles, CA: **American Chemical Society National Meeting**; 1974.

RESENDE, M. C. de; GAMA, R. A. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxifen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p.27-34, 2006.

RIBEIRO, P. B. ; COSTA, P. R. P. ; LOECK, A. E.; VIANNA, É. E. S. ; SILVEIRA JUNIOR, P. Exigências térmicas de *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae), em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.. Iheringia - **Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 94, n. 2, p. 177-180, 2004.

RODRIGUES, I.B.; TADEI, W.P.; DIAS, J.M.C.S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 441-444, 1988.

ROMÃO, T. P. A. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **FEBS Journal**, Oxford, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.

ROSE R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases** 2001;7(1):17-23.

ROZENDAAL, J. A. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneve: **Organização Mundial da Saúde**; 1997.

SCHOLTTE, E. J.; NIJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria Journal**, 2003;2(1):1-8.

SCORER, C. A.; BUCKHOLZ, R. G.; CLARE, J. J.; ROMANOS, M. S. The intracellular production and secretion of HIV – 1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene** 136: 111-119, 1993.

SHI, Y.; YUAN, Z.; CAI, Q.; YU, J.; YAN, J.; PANG, Y. Cloning and expresión of the binary toxin gene from *Bacillus sphaericus* IAB872 in a crystal-minus *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Current Microbiology**, v. 43, p. 21-25, 2001.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; CHARLES, J.-F.; NIELSEN-LEROUX, C. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* binary toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens*. **Insect Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.

SINGER, S. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. **Nature**, London, v. 244, p. 110-111, 1973.

SINGER, S. Isolation and development of bacterial pathogens in vectors. In: BIOLOGICAL REGULATION OF VECTORS, 1977, Bethesda. **Reports**. Bethesda: National Institutes of Health, 1977. p. 3-18.

SLAMA K, ROMANUK M, SORM F. Insect Hormones and Bioanalogues. New York: Springer Verlag; 1974.

SMITH, B.; HOLLANSER, Z.; KOPPEL, R.; KATCHALSKI-KATZIR, E. Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes. **Methods Enzymology**, 135: 160-170, 1987.

SREEKRISHNA, K.; NELLES, L.; POTENZ, R.; CRUZE, J.; MAZZAFERRO, P.; FISH, W.; FUKU, M.; HOLDEN, K; PHELPS, D.; WOOD, P.; PARKER, K. High-level expression purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry** 28: 4117-4125, 1989.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S.; SCHIMIDT, F. G. V.; ARMANDO, M. S.; MARCONI, M. B. Controle biológico de insetos-praga na soja orgânica do Distrito Federal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.19, n.2, p.299-312, 2002.

TANAPONGPIPAT, S.; NANTAPONG, N.; COLE, J.; PANYIM, S. Stable integration and expression of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* into the chromosome of *Enterobacter amnigenus*: a potencial breakthrough in mosquito biocontrol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, p. 243-248, 2003a.

TANAPONGPIPAT, S.; LUXANANIL, P.; PROMDONKOY, B.; CHEWAWIWAT, N.; AUDTHO, M.; PANYIM, S. A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confer toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 259-263, 2003b.

TEIXEIRA, M. da G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M da C. N. et al. Dinâmica de circulação de vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. **Epidemiologia do Serviço de Saúde**, jun. 2003, vol. 12, n. 2. p. 87-97. ISSN: 1679-4974.

THANABALU, T.; BERRY, C.; HINDLEY, J. Citotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27- and 70- kDa peptides. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 2314-2320, 1993.

THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2776-2785, 1991.

THIÉRY, I. et al. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. **Annual Institut Pasteur/Actualités**, Paris, v. 7, p. 247-260, 1996.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.

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

VIETSCIENCES-NGUYEN LAN DUNG, 2005. Figura 3 - Microscopia eletrônica de *B. sphaericus* mostrando a localização do esporo e do cristal paraesporal.

Disponível em:

<<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/cautruuctebaovk.htm>>

Acesso em: 10 out. 2008.

VOORDOUW, M. J.; KOELLA, J. C.; HURD, H. Comparison of male reproductive success in malaria-refractory and susceptible strains of *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, 2008, v. 7, ISSN: 1475-2875.

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. **Zent. bl. Mikrobiol.**, Jena, v. 139, p. 57-60, 1984.

WICKREMESINGHE, R. S. B.; MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. **Mosquito News**, New York, v. 40, p. 387-389, 1980.

WIRTH, M. C. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.

ZHANG, Y. M. et al. Isolation of two high toxic *Bacillus sphaericus* strains. **Insecticidal Microorganism**, v. 1, p. 98-99, 1987.

**ANEXO**

**PROJETO DE PESQUISA**

**Produção de biopesticida utilizando *Pichia pastoris* recombinante**

**Proponente:**

**Mariana Lima Terres, C.B.**

## 1. INTRODUÇÃO:

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 com uma estimativa de dois milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas com estas enfermidades (OMS, 1999). 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). Por estas razões se vê necessário a introdução de novas estratégias no controle destas doenças. O desenvolvimento de novas vacinas e a construção de mosquitos transgênicos refratários aos agentes infecciosos deverão auxiliar no controle destas enfermidades em um futuro próximo. Entretanto, na atualidade, o esforço maior deve ser feito no desenvolvimento de inseticidas.

Os inseticidas usados nos últimos anos têm se baseado em produtos sintéticos com amplo espectro de ação visando reduzir grandes populações de vetores. No entanto, as mesmas propriedades que tornam estes inseticidas úteis, como largo espectro de toxicidade e ação residual prolongada, têm sido responsáveis por sérios problemas ambientais. A emergência e a disseminação de resistência em muitas espécies de vetores, a inter-relação com poluição ambiental e o alto custo no desenvolvimento de novos inseticidas químicos tornam evidente a necessidade de buscar novas alternativas para o controle de vetores.

O controle biológico é uma alternativa viável no controle de vetores, principalmente quando se prioriza a questão ambiental (RODRIGUES et al., 1988). De forma crescente, tem sido direcionada atenção para uma série de inimigos naturais dos insetos como predadores, parasitas, patógenos bacterianos, fúngicos e virais. Entretanto, a escolha de um agente biológico deve atentar a parâmetros tais como: possuir as propriedades de um inseticida químico no que tange a toxicidade ao inseto alvo, passível de ser produzido com alto rendimento em escala industrial;

ter durabilidade e estabilidade, permitindo períodos prolongados de armazenamento; bem como ser facilmente transportável (KRIEG; MILTENBURGER, 1984).

Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos, são poucas aquelas que podem ser utilizadas no controle biológico de pragas da agricultura e vetores de doenças tropicais (MOINO JÚNIOR, 2000). Na década de 1970 a Organização Mundial da Saúde e outras instituições internacionais iniciaram estudos, e incentivaram os já existentes, em relação a novos agentes de controle biológico. Deste esforço resultou a detecção e isolamento em Israel, de uma variedade de *B. thuringiensis*, que demonstrou intensa atividade larvicida, a qual foi identificada por Huguette de Barjac, no Instituto Pasteur, como *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* (GUERINEAU et al., 1991). O desenvolvimento das pesquisas relacionadas a este microrganismo estimulou a retomada das investigações com outra espécie do mesmo gênero – *B. sphaericus* - cujo isolamento da primeira amostra entomotoxigênica foi feito por Kellen, na Califórnia, em 1964. A linhagem de *B. sphaericus* que é altamente tóxica para alguns mosquitos, em especial o *Culex quinquefasciatus*, originou-se do Nordeste da Nigéria, curiosamente isolada de adulto recém emergido de *Simulium damnosum*, sem, contudo, produzir intoxicação para borrachudos. Desde a sua descoberta por Neide em 1904, muitas estirpes de *B. sphaericus* têm sido isoladas e armazenadas (CHARLES et al., 1996; RABINOVITCH et al., 2000).

As espécies de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* ganharam notoriedade nos meios científico e industrial, uma vez que algumas linhagens puderam ser empregadas como princípios ativos de preparações industrializadas, como controladores de pragas florestais e agrícolas, ou de vetores de doenças para o homem e animais (ARAÚJO-COUTINHO, 2003; RESENDE, 2003).

A ação destas bactérias sobre as larvas alvo de mosquitos se deve a presença de protoxinas que são sintetizadas durante a esporulação e montadas na forma de cristal paraesporal depositada ao longo do esporo ou dentro do esporângio (REGIS et al., 2001).

Muitas cepas de *B. sphaericus* têm sido isoladas nos últimos anos, e as mais toxigênicas são a 1593, e especialmente a 2362 que pertencem ao sorotipo flagelar 5a5b (CHARLES et al., 1996; DELÉCLUSE et al., 2000). A principal toxina nestas amostras é a toxina binária, que é composta de duas proteínas, uma de 51.4 kDa, que é responsável pela aderência, e uma de 41.9 kDa, que é a porção toxigênica, as

duas cristalizam-se em um única molécula paraesporal. Após a ingestão da toxina pela larva, as proteínas 51.4 e 41.9 kDa são clivadas por proteases digestivas ficando com 43 e 39 kDa respectivamente formando a toxina ativa (BAUMANN et al., 1991; CHARLES et al., 1996). A toxina ativa se liga ao seu receptor ( $\alpha$ -glucosidase) nas microvilosidades das células do trato gástrico (DARBOUX et al., 2001) e é internalizada causando a lise das células (DAVIDSON, 1988). Além da toxina binária, muitas amostras de *B. sphaericus* produzem outras toxinas durante a fase vegetativa de crescimento que são as toxinas Mtx. Estas toxinas Mtx1, Mtx2 e Mtx3 são bem menos estáveis e tóxicas que a toxina binária (DELÉCLUSE et al., 2000). A desvantagem que o *B. sphaericus* apresenta no controle biológico é que somente a toxina binária é ativa, favorecendo desta forma o aparecimento de larvas resistentes a esta toxina. Em fato, resistência ao *B. sphaericus* foi descrita em populações de *Culex* no Brasil, China, França e Índia (RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; YUAN et al., 2000).

As inclusões cristalinas de *B. thuringiensis israelensis* são compostas de pelo menos quatro polipeptídeos de 125, 135, 68 e 28 kDa, conhecidos como Cry 4Aa, Cry 4Ba, Cry 11Aa e Cyt1Aa respectivamente (CRICKMORE et al., 1998). Estudos na seqüência de aminoácidos das toxinas Cry demonstraram que as mesmas tinham relação com outras Cry toxinas (CRICKMORE et al., 1998; SCHNEPF et al., 1998). Entretanto, a toxina Cyt1A difere na seqüência de aminoácidos e toxicidade em relação às toxinas Cry, sendo altamente toxigênica a uma gama de células de vertebrados e invertebrados. A Cyt1A possui uma afinidade aos ácidos graxos insaturados na porção lipídica das membranas celulares (THOMAS; ELLAR, 1983), e se suspeita que sua ação seja devido à formação de poros ou de uma ação detergente na membrana celular causando distúrbios na mesma (BUTKO et al., 1997). Mesmo não se tendo um total conhecimento da forma de ação da toxina Cyt1A ela é de extrema importância no controle de mosquitos. Diversos estudos têm demonstrado que a toxicidade do *B. thuringiensis israelensis* é devido ao sinergismo entre suas toxinas especialmente entre a Cyt1A e Cry toxinas (WU; CHANG, 1985; IBARRA; FEDERICI, 1986; WIRTH et al., 2000 a, b). Outro aspecto importante desta toxina dá-se ao fato que ela pode retardar e até superar a resistência a toxinas Cry e da toxina binária de *B. sphaericus* 2362 a larvas de mosquitos resistentes (GEORGHIOU; WIRTH, 1997; WIRTH, 2000a). A sua utilização faz aumentar o espectro de ação da toxina binária de *B. sphaericus* a larvas de *A. aegypti* (WIRTH,

2000b). Recentes estudos demonstraram que a falta de sensibilidade das larvas de *C. quiquefasciantus* resistentes ao *B. sphaericus* era devido á ausência de receptores da toxina binária nas microvilosidades do trato gástrico das larvas (DARBOUX et al., 2002). FEDERICI et al. (2003) demonstrou que a lesão da toxina Cyt1A na membrana celular das células do trato gástrico permitia a penetração da toxina binária do *B. sphaericus*, desta forma, tornado as larvas sensíveis a esta toxina.

A existência de cepas altamente toxigênicas tanto de *B. thuringiensis israelensis* como *B. sphaericus*, e cada uma com um conjunto de diferentes toxinas, sugere que a construção de organismos geneticamente modificados possibilite a produção de inseticidas biológicos com alta capacidade toxigênica e especificidade para uso no controle de mosquitos. Existem várias alternativas para a construção de organismos expressando diferentes toxinas, uma seria a construção de uma amostra de *B. sphaericus* toxigênica contendo um gene que expresse uma ou mais das toxinas do *B. thuringiensis israelensis*, outra seria o inverso, introduzir os genes da toxina binária de *B. sphaericus* em uma amostra toxigênica de *B. thuringiensis israelensis* (BAR et al., 1998; MURO; PRIEST, 2000; SHI et al., 2001; FEDERICI et al., 2003; TANAPONGPIPAT et al., 2003b). Uma outra alternativa seria introduzir os genes de *B. sphaericus* em bactérias que vivem no mesmo ambiente em que as larvas de mosquitos se desenvolvem tais como cyanobacterias (*Caulobacter crescentus*, *Ancylobacter aquatcus*) ou em *Enterobacter amnigenus* que foi isolada de larvas de *Anopheles dirus* (TANAPONGPIPAT et al., 2003a). Entretanto estas alternativas possuem sérios problemas que devem ser resolvidos antes de se tornarem viáveis para o seu uso como inseticida biológico tais como: instabilidade de plasmídeos que contém os genes das toxinas, exigência nutricional para sua produção em escala industrial, mas principalmente a baixa expressão de proteína heteróloga.

Entretanto, uma possível alternativa é a de expressar estas toxinas em leveduras, principalmente em *Pichia pastoris* (GURKAN; ELLAR, 2003). Quando comparada a outros sistemas de expressão de proteínas, a *P. pastoris* oferece várias vantagens (CINO, 1999). Primeiramente, há incorporação do gene em estudo ao cromossoma evitando assim a instabilidade de plasmídeos, principalmente com os aumentos de escala a níveis industriais (CEREGRINO; CREGG, 2000). Também foi constatado que a maioria das proteínas são expressas em altos níveis com esta levedura, bem maior do que em bactérias. *P. pastoris*, possui uma alta taxa de crescimento e fácil multiplicação tanto em agitador orbital quanto em fermentador, e

é facilmente adaptável à fermentação em larga escala para a produção de proteínas recombinantes. Suas exigências quanto aos meios de cultivo são bem mais flexíveis, sendo possível desenvolver meios a partir de resíduos industriais. Essas características fazem com que a *P. pastoris* seja de fácil manipulação genética, permitindo uma eficiente expressão de proteínas recombinantes. Outra característica que torna *P. pastoris* um excelente candidato dá-se ao fato que larvas de mosquitos são alimentadas com leveduras em criadouros, tornando desta forma um veículo fácil de administração das toxinas as larvas de 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> estágio (COSTA, 1994).

Baseado nas informações precedentes, este projeto propõe uma nova estratégia para produção de um inseticida biológico recombinante. O inseticida biológico terá como base a levedura *P. pastoris*, à qual serão clonados os genes da toxina binária de *B. sphaericus*.

Para testar a hipótese montar-se-ão experimentos, devidamente relatados na parte de materiais e métodos, utilizando-se as instalações da Universidade Federal de Pelotas, respeitando as exigências atuais sobre biossegurança.

### **HIPÓTESE:**

O inseticida biológico produzido utilizando *Pichia pastoris* recombinante, controla a população de mosquitos.

### **OBJETIVO GERAL:**

Desenvolver e avaliar um inseticida biológico elaborado a partir de *Pichia pastoris* recombinante para o controle de mosquitos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Construir uma cepa de *P. pastoris* que expresse a toxina binária de *B.sphaericus*.
- 2- Avaliar a patogenicidade das *P. pastoris* recombinantes para larvas de *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*.

### JUSTIFICATIVA:

#### Relevância do projeto para o Brasil

A pesquisa é direcionada para a descoberta de bioinseticidas e destina-se ao controle de simúlídios e mosquitos. É um campo onde o progresso tem sido alcançado de forma eficiente, porém novos avanços se fazem necessários pelo fato destes insetos representarem uma constante ameaça à saúde e ao conforto da população. Mosquitos são transmissores de uma série de doenças humanas que causam problemas de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais.

As cidades por suas características topográficas e demográficas e muitas vezes com crescimento sem um planejamento ideal, constituem-se em regiões favoráveis à procriação de mosquitos. Nos últimos anos, o aumento da população de mosquitos tornou-se um problema real à população da zona urbana representando uma fonte potencial de vetores para certas doenças e constituindo-se em fator de desconforto à população. O controle de insetos em geral vem sendo realizado através da utilização de inseticidas químicos sintéticos, sem obter resultados eficientes, possivelmente pela emergência de população resistente. Aliado a este desempenho falho, os inseticidas químicos vem representando importante fator no desequilíbrio da fauna aquática da região, como também se constituem em

substâncias de efeito deletério ao organismo humano e de outros animais superiores.

Vários pesquisadores têm chamado atenção para inúmeras vantagens, que podem advir da produção de bioinseticida, principalmente no que concerne a países em desenvolvimento (ARAÚJO-COUTINHO, 2003; RESENDE, 2003). A produção de bioinseticidas à base de *P. pastoris* possibilitará o controle de insetos indesejáveis e ainda possibilitará a utilização de resíduos e subprodutos de indústrias como meio de cultura, o que resultará em baixo custo do produto final. Paralelamente, às condições climáticas e ambientais de cada região do país poderão ser levadas em consideração ao ser realizada a formulação final de cada bioinseticida, aumentando assim seu rendimento (ALVES, 1988). Portanto entende-se que o desenvolvimento de um inseticida biológico que possa responder às necessidades da nossa região e de outras é de grande importância na saúde pública do nosso país.

### **Relevância do projeto para o Instituto de Biologia da UFPel**

O presente projeto visa dar continuidade ao importante trabalho de pesquisa em controle biológico de pragas realizado na Universidade Federal de Pelotas. Do ponto de vista de desenvolvimento científico e tecnológico, o projeto será desenvolvido em âmbito universitário com a participação de técnicos altamente capacitados em cooperação com diversos departamentos, tendo responsabilidades docentes para estudantes com o maior espectro de formação acadêmica, desde alunos de graduação até de doutorado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Produção dos genes que codificam para a toxina binária de *B. sphaericus*.

Os genes serão amplificados por PCR, a partir das cepas de referência obtidas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, seguindo metodologia conhecida (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Utilizar-se-ão os seguintes primers, contendo os sítios de restrição *Xho*I e *Xba*I :

- *B. sphaericus* Bin toxina:

5'-CGCCTCGGAATTCAAGCTTGTCAACATGTGA-3' (senso)

5'-TCGAGTCTAGA CTAAAAGGGACCTAAAAG-3' (antisenso)

### 2. Clonagem dos genes

O sistema de expressão em *P. pastoris* incluirá o vetor de expressão intracitoplasmático pGAPZ e o vetor de expressão secretor pGAPZ $\alpha$  (INVITROGEN Co., Carlsbad, CA, USA). Estes vetores integrativos contêm um promotor ( $P_{GAP}$ ), caracterizado por expressar altos níveis de proteínas recombinantes, para a GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), uma enzima constitutiva. Além disso, eles contêm um sítio de múltipla clonagem com 10 sítios de restrição únicos, uma cauda de polihistidina permitindo a purificação por cromatografia das proteínas recombinantes, e o gene *Sh ble* conferindo resistência a zeocina. O vetor pGAPZ $\alpha$  apresenta a seqüência sinal “ $\alpha$ -factor” nativa de *Saccharomyces cerevisiae* a qual permite uma eficiente secreção de proteínas exógenas em *P. pastoris*.

Os genes das toxinas amplificados por PCR serão purificados pelo Qiaquick Gel Extraction kit (QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK) e posteriormente digeridos por *Xho*I e *Xba*I, em banho Maria durante duas horas a 37°C. O mesmo processo será utilizado para a digestão dos vetores. Posteriormente, a inserção dos genes das toxinas nos plasmídeos será realizada através da DNA Ligase, deixando-

se reagir durante 14 horas a 16°C. Células competentes de *Escherichia coli* TOP10 (INVITROGEN Co., Carlsbad, CA, USA) serão transformadas por meio de choque térmico. Para tal uma suspensão contendo a bactéria e o novo plasmídeo, será submetida a banho de gelo durante 30 minutos, sendo em seguida colocada em banho Maria a 42°C por um minuto. Após será inoculada em caldo Luria Bertani (LB) e incubada em agitador orbital durante uma hora a 37°C. Após será semeado em meio LB sólido com zeocina, cultivando-se as placas a 37°C durante 24 horas. Para análise, a *Escherichia coli* recombinante será cultivada em caldo LB com zeocina, durante 14 horas a 37°C em agitador orbital. Os clones recombinantes serão identificados por análise de restrição dos plasmídeos extraídos por Mini-prep (QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK).

Células competentes de *P. pastoris* da linhagem X-33 serão preparadas de acordo com o *Pichia EasyComp*<sup>TM</sup> Transformation Kit (INVITROGEN Co., Carlsbad, CA, USA). Os plasmídeos recombinantes selecionados serão linearizados com *SacI* e transformados em células X-33 competentes, por eletroporação. Os vetores originais sem a inserção serão utilizados como controle negativo da expressão. A integração dos genes será confirmada por PCR com o uso de primers fornecidos pela Invitrogen.

### **3. Análise dos clones**

Para análise da expressão, colônias isoladas serão inoculadas em caldo BMGH (INVITROGEN Co., Carlsbad, CA, USA) e incubadas a 28°C com agitação constante por 5 dias. Amostras serão coletadas periodicamente e os níveis de expressão analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) e por “Western Blot”. As colônias recombinantes que apresentarem os melhores níveis de expressão de suas respectivas toxinas serão selecionadas para expressão em grande escala.

#### **4. Avaliação do efeito de *P. pastoris* recombinante na atividade larvicida.**

A amostras selecionadas serão multiplicadas em Erlenmayer de 500mL contendo 50 mL de caldo YM (extrato de levedura 3g, extrato de malte 3g, peptona 5g, Dextrosa 10g, água qsp 1 L) a 28°C em agitador orbital a 150 rpm por 24 horas. Após a multiplicação será realizada a contagem do número total de células viáveis pelo método de diluições seriadas e semeadura em placas, e também em câmara de Petroff–Hauser. A contagem visará relacionar número de células viáveis por mL de meio com atividade larvicida.

Para o teste de atividade larvicida, frascos contendo diluições seriadas das cepas recombinantes selecionadas em 100 mL de água destilada estéril, receberão 25 larvas de mosquitos do 2<sup>o</sup>- 3<sup>o</sup> estágio. Um frasco sem as células de levedura em teste funcionará como controle negativo do experimento. Um outro frasco contendo inseticida biológico comercial será utilizado como controle positivo do experimento. Estes frascos serão mantidos a 25°C e realizada a leitura em 24, 48 e 72 horas pela observação do número de larvas vivas e mortas, calculando então a DL<sub>50</sub>. As larvas utilizadas nos bioensaios de atividade larvicida serão provenientes de colônias estabelecidas e mantidas no Laboratório de Criação de Insetos do Instituto de Biologia da UFPel seguindo a metodologia de criação estabelecida por Costa et al. (1994).

#### **5. Análise estatística:**

Os dados serão analisados para significancia estatistica usando ANOVA seguindo de Student-Newman-Keuls (Instat software, GraphPad, San Diego, CA, EUA) considerando significativo  $p < 0.05$ .

## 6. CRONOGRAMA:

ETAPAS	ANO 1	ANO 2	ANO 3
1. Produção dos genes que codificam para a toxina binária de <i>B. sphaericus</i> .	X		
2. Clonagem dos genes.	X		
3. Análise dos clones.	X		
4. Avaliação do efeito de <i>P. pastoris</i> recombinante na atividade larvicida.		X	
5. Avaliação da produção em larga escala <i>P. pastoris</i> recombinante.		X	X
6. Estabelecimento e manutenção de colônias de larvas em laboratório	X	X	X
7. Avaliação dos resultados, redação de relatórios e trabalhos técnico-científicos.			X

## 7. RISCOS E ALTERNATIVAS:

O projeto não apresenta riscos maiores que impeçam atingir os objetivos propostos. Os insumos que serão utilizados são de fácil acessibilidade e são encontrados na praça ou no exterior.

A Universidade Federal de Pelotas através do Instituto de Biologia e o Centro de Biotecnologia possuem todos os equipamentos necessários para a execução do projeto, desde aqueles a serem utilizados na modificação de *P. pastoris* (termocicladores, equipamentos para eletroforese, etc.), na multiplicação da levedura (autoclaves, fornos, fermentadores de 2 a 20 L de capacidade, centrífugas refrigeradas, etc.), produção de larvas de mosquitos e até condições controladas

para avaliação do efeito de *P. pastoris* recombinante na atividade larvicida. A UFPel tem uma longa tradição de interação com a indústria Leivas Leite S/A, o que lhe dá acesso à utilização de planta de fermentadores podendo realizar trabalhos com fermentadores de 100 e 1000 L de capacidade.

## 7. ORÇAMENTO:

ÍTEM	VALOR (R\$)	
<i>Pichia</i> EasyComp™ Transformation Kit	600,00	
Cepa de <i>P. pastoris</i> X-33	600,00	
Vetores	2.400,00	
Qiaquick Gel Extraction kit	200,00	
Mini-prep	180,00	
Primers	1.200,00	
Enzimas	550,00	
Sais	300,00	
Tampões	300,00	
Material para SDS-Page e Western Blot	850,00	
Meios de cultivo	900,00	
Placas de Petri descartáveis	200,00	
Ração para Codornas	180,00	
Codornas	40,00	
Material para desinfecção	50,00	
<b>Subtotal</b>	<b>8.550,00</b>	
<b>Passagens e diárias</b>		
ÍTEM	QUANTIDADE	VALOR (R\$)
Diárias	15	1.500,00
Passagens	3	1.800,00

---

Subtotal	3.300,00
----------	----------

---

TOTAL	11.850,00
-------	-----------

---

## 9. REFERÊNCIAS:

ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S B. (ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 21-37.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Utilização de entomopatógenos microbianos em programas de vetores em saúde pública: vantagens e desvantagens. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro. **Anais do 8° Simpósio de Controle Biológico**, São Pedro, 2003. p. 46.

BAR, E.; SANDLER, N.; MAKAYOTO, M.; KEYNAN, A. Expression of chromosomally inserted *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin genes in *Bacillus sphaericus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 206-213, 1998.

BAUMANN, P.; CLARK, M.A.; BAUMANN, L.; BROAWELL, A.H. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organisms and its toxins. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 425-436, 1991.

BUTKO, P.; HUANG, F.M.; PUSZTAI-CAREY, M.; SUREWICZ, W.K. Interaction of delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. **Biochemistry**, v. 36, p. 12862-12868, 1997.

CEREGRINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichi pastori*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHARLES, J.F.; NIELSEN-LEROUX, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 451-472, 1996.

CINO, J. High Yield Protein Production from *Pichia pastoris* Yeast: A Protocol for Benchtop Fermentation. *American Biotechnology Laboratory*, May 1999. Acessado em 27 de janeiro de 2004. [http://www.nbsc.com/papers/ABL\\_pichia.htm](http://www.nbsc.com/papers/ABL_pichia.htm)

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

COSTA, P.R.P.; VIANNA, É.E.S.; SILVEIRA JÚNIOR, P.; RIBEIRO, P.B. Influência da temperatura na longevidade e viabilidade do ciclo aquático de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 1994.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RITE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 807-813, 1998.

DARBOUX, I.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F.; PAUCHET, Y.; PAURON, D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *C. pipiens* (Diptera: culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 31, p. 981-990, 2001.

DARBOUX, I.; PAUCHET, Y.; CASTELLA, C.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F.; PAUCHET, Y.; PAURON, D. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 5830-5335, 2002.

DAVIDSON, E.W. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales:Bacillacea) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, p. 151-157.

DELÉCLUSE, A.; JUAREZ-PEREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. **In: Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field application** (ed. J.-F. Charles, A. Delècluse and C. Nielsen-LaRoux). p. 101-125. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. 2000.

FEDERICI, B.A.; PARK, H.W.; BIDESHI, D.K.; WIRTH, M.C.; JOHNSON, J.J. Recombinant bacteria for mosquito control. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 3877-3885, 2003.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied Environment Microbiology**, v. 63, p. 1095-1101, 1997.

GUERINEAU, M.; ALEXANDER, B.; PRIEST, F.G. Isolation and identification of *Bacillus sphaericus* strains pathogenic for mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 325-333, 1991.

GURKAN, C.; ELLAR, D.J. Expression in *Pichia pastori* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* CytAa1 toxin. **Protein Expression and Purification**, v. 29, p. 103-116, 2003.

IBARRA, J.E.; FEDERICI, B.A. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 527-533, 1986.

KRIEG, A.; MILTEBURGER, H.G. Bioinseticidas: I. *Bacillus thuringiensis*. In: MIZRAHI, A. & VAN WEZEL, A. L. **Advances in Biotechnological Process**. New York, Alan R. Liss, Inc., 1984. p. 273-290.

MOINO JÚNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V.H.P. (ed). **Controle Biológico de Pragas: Produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, 2000. p. 175-186.

MURO, M. A.; PRIEST, F.G. Construction of chromosomal integrants of *Bacillus sphaericus* by conjugation with *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 547-555, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *World Health Organization Report*. Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99. Geneva.1999.

RABINOVITCH, L.; SILVA e BRAZÃO, C.M.; ALVES, R.S. de A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. de (ed). **Controle Biológico**. v.2. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 17-90.

RAO, D.R.; MANI, T.R.; RAJENDRAN, R.; JOSEPH, A.S.; GAJANANA, A.; REUBEN, R. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of American Mosquito Control Association**. v. 11, p. 1-5, 1995.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Bacteriological larvicides of dipteran diseases vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

RESENDE, M.C.de. Uso de *Bacillus* entomopatogênicos em programas de controle de vetores no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro. **Anais do 8º Simpósio de Controle Biológico**, São Pedro, 2003. p. 57.

RODRIGUES, I.B.; TADEI, W.P.; DIAS, J.M.C.S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 441-444, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: **a Laboratory Manual**, Third Edition, Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, p. 775-806, 1998.

SHI, Y.; YUAN, Z.; CAI, Q.; YU, J.; YAN, J.; PANG, Y. Cloning and expresión of the binary toxin gene from *Bacillus sphaericus* IAB872 in a crystal-minus *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Current Microbiology**, v. 43, p. 21-25, 2001.

SILVA-FILHA, M.H.; REGIS, H.L.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 525-530, 1995.

TANAPONGPIPAT, S.; NANTAPONG, N.; COLE, J.; PANYIM, S. Stable integration and expression of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* into the chromosome of *Enterobacter amnigenus*: a potencial breakthrough in mosquito biocontrol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, p. 243-248, 2003a.

TANAPONGPIPAT, S.; LUXANANIL, P.; PROMDONKOY, B.; CHEWAWIWAT, N.; AUDTHO, M.; PANYIM, S. A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confer toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 259-263, 2003b.

THOMAS, W.E.; ELLAR, D.J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal d-endotoxin. **FEBS Letters**, v. 154, p. 362-368, 1983.

WIRTH, M.C.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restore toxicity of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 37, p. 401-407, 2000a.

WIRTH, M.C.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1093-1097, 2000b.

WU, D.; CHANG, F.N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Letters**, v. 190, p. 232-236, 1985.

YUAN, Z.; ZHANG, Y.; CAI, Q.; LIU, E.Y. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from southern China. **Biocontrol Science Technology**, v. 10, p. 41-49, 2000.