

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA UTILIZANDO *Pichia pastoris* RECOMBINANTE COM AÇÃO MOSQUITOCIDA ÀS LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* A PARTIR DO GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA BINAB

GONÇALES, Relber Aguiar¹; BRUM, Fernanda Antunes¹; KNABAH, Paula Ferreira¹, BORSUK, Sibeles¹; LEITE, Fabio Pereira Leivas²; PINTO, Luciano da Silva^{1*}

¹Dept^o de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Parasitologia Molecular, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Cx. Postal 354, Pelotas, RS 96010-900, Brasil. E-mail: relberg.ib@ufpel.edu.br

²Dept^o de Microbiologia e Parasitologia, Professor adjunto, Universidade Federal de Pelotas

* Bolsista PRODOC CAPES - PPG-PARASITOLOGIA

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos são considerados os mais preocupantes transmissores de doenças para o ser humano em escala mundial. O controle das populações destes insetos é dificultado pela enorme habilidade reprodutiva e flexibilidade genética que apresentam, e isso se manifestam através do desenvolvimento de resistência a inseticidas, levando a constante procura por novos produtos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O *Bacillus sphaericus* é uma bactéria patogênica para as larvas de mosquitos e a atividade se dá devido à síntese de uma toxina binária associada à esporulação a partir de genes reunidos em um operon, que consiste de dois componentes com pesos moleculares de aproximadamente 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) que é tóxica somente quando ambos os peptídeos estão atuando juntos (BROADWELL et al., 1990). A atividade inseticida é também causada em função de toxinas conhecidas como Mtx1, Mtx2 e Mtx3 que são sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo (THANABALU et al., 1991, THANABALU & PORTER, 1996).

A utilização destas bactérias tem sido feita para controlar larvas de mosquito em diferentes países, com algumas limitações, tais como, a sedimentação rápida do complexo esporo/cristal fora da zona de alimentação larval (KARCH & CHARLES 1987), inativação da toxicidade por luz UV (LACEY & SMITTLE 1985) e resistência do mosquito (RAO et al., 1995). Outro problema de grande importância na utilização destes bacilos é a instabilidade dos plasmídeos nativos onde estão os genes que codificam para as entomotoxinas. Em escala industrial estes plasmídeos vão se perdendo e a capacidade tóxica destes organismos é perdida.

Assim, a utilização de outros organismos para a expressão das proteínas mosquitocidas de *B. sphaericus* que superem estas dificuldades é uma alternativa no controle biológico de mosquitos. Dentre as possibilidades, podemos citar a utilização da levedura *Pichia pastoris*. Uma grande vantagem da utilização da

levedura *P. pastoris* está na estabilidade das construções já que o DNA de interesse é inserido no genoma da levedura, não mais necessitando de agentes seletivos para manutenção da expressão.

O alvo deste trabalho foi produzir as proteínas inseticidas de *B. sphaericus* em *Pichia pastoris* visando à utilização deste organismo em programas de controle de mosquitos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os genes das proteínas mosquitocidas de *B. sphaericus* foram amplificados com oligonucleotídeos iniciadores específicos, clonados fusionados (Figura 1A) em vetores de expressão intracitoplasmática (pPICZA-*binAB*) e transferidos para *Pichia pastoris*. A seleção das leveduras recombinantes foi realizada em meio seletivo contendo o antibiótico zeocina e por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com metanol e monitorada por SDS-PAGE, *western blot* e ensaios biológicos contra larvas de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus*. As leveduras recombinantes foram utilizadas em ensaios comparativos com uma cepa de *B. sphaericus*. Também, para estudar a atividade destas proteínas, os genes binários *binA* e *binB* foram clonados sequencialmente (Figura 1B) em vetor de expressão em *E. coli* (pAE-*binAB*).

A atividade larvicida das bactérias e leveduras recombinantes, contendo os genes das entomotoxinas de *B. sphaericus*, foi testada através de ensaios biológicos realizados em laboratório sob condições controladas de temperatura a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa superior a 85% e fotofase de 12 horas. Os bioensaios foram conduzidos segundo o protocolo descrito por Monnerat et al., (2001a) As larvas foram aplicadas em três copos descartáveis contendo cada um 100 mL de água destilada e 25 larvas de segundo ou terceiro estágio de *Culex quinquefasciatus*, totalizando 75 larvas por dose. Os bioensaios foram repetidos em três dias alternados, totalizando 675 larvas por clone recombinante estudado. Em cada bioensaio foram montados grupos-controle, sendo um sem a aplicação das amostras, um com o bacilo controle, um com a levedura contendo somente o plasmídeo e outro com a bactéria transformada contendo apenas o vetor. Após intervalos de 24, 48 e 72 horas, depois da aplicação, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas em cada copo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

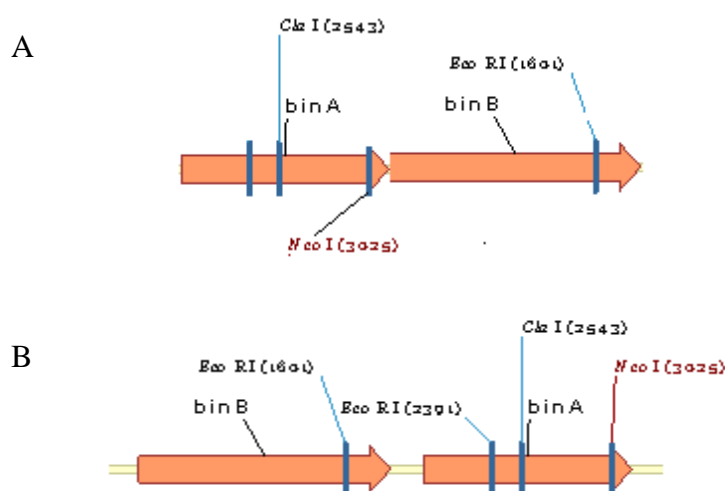


Figura 1: Organização gênica das construções em vetores de expressão em *P. pastoris* (A) e *E. coli* (B).

Após a confirmação dos clones recombinantes por PCR de colônia e *western blotting*, as bactérias e leveduras selecionadas foram submetidas a teste de

atividade inseticida contra larvas de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* Say como já descrito. Para o ensaio com as leveduras recombinantes, foram testados 9 clones recombinantes de *P. pastoris*. Não obstante, verificou-se que duas das colônias recombinantes tiveram ação contra larvas de *C. quinquefasciatus* após 24h, porém com menor mortalidade do que o controle positivo usando o *B. sphaericus* e diferente dos controles negativos usando a levedura ou água destilada (Figura 2). Já o clone isolado de *E. coli* *Artic express* apresentou letalidade semelhante ao encontrado para o controle positivo após 24 horas de contato. Também, a expressão em *E. coli* foi confirmada por *western blotting* (Figura 3).

Estudos precedentes têm mostrado a necessidade de adequação dos códons para a expressão de proteínas de bactérias em leveduras o que poderia explicar a ineficiência das construções neste organismo (GURKAN and ELLAR, 2003). Por outro lado, é de se espera que a expressão de genes oriundos de bactérias funcionasse melhor em *E. coli*, Já que possui uma maquinaria de expressão de proteínas semelhante ao do bacilo. Com base nestes resultados, será possível a purificação da proteína recombinante em *E. coli* propiciando a produção de anticorpos específicos que ajudem na confirmação da expressão das proteínas BinA e BinB em *Pichia pastoris*.

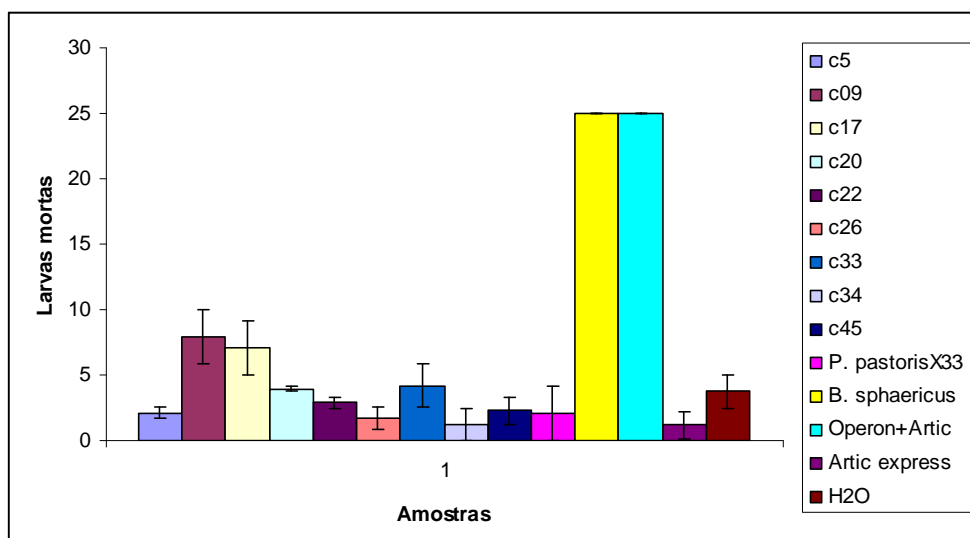


Figura 2: Teste dos clones recombinantes de *P.pastoris*. C5 a C45 *P. pastoris* transformada com a construção pPICZA-*binAB*. Operon+Artic refere-se a construção pAE-*binAB* na bactéria *E. coli* cepa Artic Express.



Figura 3. *Western Blotting* das proteínas recombinantes de *Escherichia coli* contendo a construção pAE-*binAB*. 1 *E. coli* Artic Express + pAE; *E. coli* Artic Express + pAE-*binAB* não induzida com IPTG; 3 *E. coli* Artic Express + pAE-*binAB* induzida com IPTG.

4. CONCLUSÕES

Sugere-se com esses resultados que o sistema de expressão desenvolvido utilizando *P.pastoris* recombinante com o gene *binAB* não foi satisfatório em produzir o complexo binário recombinante (rBinAB) de forma semelhante ao *B. sphaericus*. Por outro lado, a transformação realizada na bactéria *E. coli*, cepa Artic Express recombinante, foi realizada com sucesso. Esta bactéria não patogênica poderá ser usada na produção de anticorpos específicos anti-BinA e BinB e no estudo da atividade específica de cada proteína.

Estudos posteriores de cultivo em fermentador serão realizados visando à comparação entre a levedura recombinante e o *B. sphaericus* para a determinação do potencial real de utilização em programas de controle biológico. Inclusive, transformação da levedura com o gene não fusionado, semelhante ao realizado com a bactéria será desenvolvido visando a produção da proteína recombinante de forma semelhante ao que acontece em *B. sphaericus*. APOIO: CAPES, FAPERGS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROADWELL AH, Baumann L, Baumann, P. Larvicidal properties of the 42 and 51 Kilodalton *Bacillus sphaericus* proteins expressed in different bacterial hosts: evidence for a binary toxin. J Bacteriol. 172: 2217-2223. 1990.
- CONSOLI, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 2.ed.Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998, 228p.
- KARCH, S. & CHARLES, J. F., Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore crystal complex used in field. Annals of Institute Pasteur/Microbiology, 138: 485-492. 1987.
- LACEY, L. A. and B. Smittle . The effects of gamma radiation on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Bull Soc Vect Ecol; 10: 98–101. 1985.
- RAO, D. R. , T. R. Mani , R. Rajendran , A. S J. Joseph , and A. Gajanana . Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J. Am. Mosq. Control Assoc, 11:1–5. 1995.
- THANABALU, T., and A. G. Porter. *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel class of mosquitocidal toxin with homology to *Clostridium* and *Pseudomonas* toxins. Gene 170: 85–89. 1996.
- THANABALU, T., J. Hindley, J. Jackson-Yap, and C. Berry. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J. Bacteriol. 173: 2776–2785. 1991.