

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: CARACTERIZAÇÃO  
DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES *cry* E EFEITO EM LARVAS  
DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)**

**Juliana Regina Rossi**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: CARACTERIZAÇÃO  
DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES *cry* E EFEITO EM LARVAS  
DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)**

**Juliana Regina Rossi**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

R831b Rossi, Juliana Regina  
*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: caracterização da região promotora de genes *cry* e efeito em larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) / Juliana Regina Rossi. -- Jaboticabal, 2007  
xii, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, Sérgio Antonio de Bortoli

Bibliografia

1. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1. 2. Região promotora. 3. Bioensaio. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.858:595.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES *cry* E EFEITO EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)

**AUTORA:** JULIANA REGINA ROSSI

**ORIENTADOR:** Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) pela Comissão Examinadora:

Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA

Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI

Data da realização: 13 de julho de 2007.

Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**JULIANA REGINA ROSSI** – nascida em 09 de dezembro de 1980, na cidade de Jaboticabal – SP, é Bióloga, graduada no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais) pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara – SP, título este concedido em março de 2004. Foi bolsista de Treinamento Técnico-I da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Instituição: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), no qual contribui para a Implantação do Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (BCCCenter), no período de 2000/2002, e bolsista de Iniciação Científica da FAPESP pela instituição (FCAV/UNESP), em 2003. Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da dissertação como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em 2006, realizou Estágio Docência junto ao Curso de Ciências Biológicas (FCAV/UNESP), ministrando aulas na disciplina de Genética Básica. É membro do grupo de pesquisa responsável pelo desenvolvimento do Projeto Temático intitulado “Manejo de pragas com a utilização de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*”, financiado pela FAPESP. Recentemente, foi aprovada no Curso de Doutorado na mesma área e instituição em que realizou o Mestrado, com início em agosto de 2007.

*“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende”.*

**(Guimarães Rosa)**

*“... ainda que eu falasse a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria ...”*

**(Renato Russo)**

## *À Deus*

Irmão, escuta o que eu vou cantar. Não fuja do que você tem que enfrentar. Se enfrentares lutas pelo teu caminho, não temas: tu não estarás sozinho, pois Jesus, o teu Senhor e Salvador, lutará por ti e estará em teu favor.

*Se não houver a luta, como pode haver vitória?  
Foi o Senhor que ensinou que é pelo Calvário  
que se chega à glória.*

Você vai ver, vai dar tudo certo, pois Jesus está sempre por perto. Tempestade já vai embora e a bonança virá sem demora. Você vai ver vai dar tudo certo, pois Jesus está sempre por perto. Não temas quando a prova aperta: com Jesus a vitória é certa.

O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem ao amanhecer. As lágrimas que até hoje você derramou um anjo recolheu e para o Senhor levou. De uma coisa você pode estar certo: Jesus não desampara, a sua benção está perto.

**Banda Louvor e Glória  
(Hino da Igreja católica)**

Aos meus pais, *Arlindo Rossi* e *Sônia Ap. Agostinho Rossi*,  
por serem tão presentes e por serem a minha história.  
Dedico este trabalho a vocês, verdadeiros tesouros da  
minha vida, exemplos de amor, honestidade, trabalho,  
caráter, generosidade e vida! Vencemos mais esta  
batalha juntos e neste momento só tenho a agradecer.  
Tudo que sou hoje é fruto de toda dedicação e amor  
incondicional de vocês. **AMO VOCÊS!!!**

Ao meu irmão, *André Luís Rossi*, por sempre me  
incentivar, apoiar e demonstrar por mim grande amor  
e amizade. **AMO VOCÊ DÉ!!!**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por iluminar meu caminho.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela orientação, amizade, confiança, disponibilidade, pelas oportunidades de crescimento profissional concedidas e pela sua preocupação em me ensinar Ciência de maneira ética, séria e honesta.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pela amizade, profissionalismo e apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos Ana Maria Guidelli Thuler e Irlan Leite de Abreu, pelas preciosas contribuições na elaboração do projeto e no desenvolvimento deste estudo, pelo profissionalismo e pela amizade. Muito obrigada dupla dinâmica!

Ao pesquisador Paulo Sarmanho da Costa Lima da EMBRAPA Meio Norte (Teresina-PI), pela elaboração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta pesquisa e pelas valiosas sugestões dadas no decorrer deste trabalho.

Ao Controle de Vetores e Zoonoses da Prefeitura Municipal de Jaboticabal -SP, pela cessão das larvas de *Aedes aegypti* utilizadas no bioensaio.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, pela amizade, profissionalismo e ajuda indispensável para a concretização deste trabalho.

Às doutorandas Elaine Silva Cícero e Juliana Regina Vieira da Costa, pelo auxílio primordial durante a realização do bioensaio e pela amizade. Obrigada meninas!

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa, pela disponibilidade em ajudar e pelo auxílio na interpretação das análises estatísticas.

À mestranda Camila Chiaradia Davolos pela valiosa colaboração nas análises estatísticas, pelas sugestões no aperfeiçoamento da redação deste trabalho (mesmo em seu dia de descanso....lembra-se como trabalhamos no feriado?), e pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e à Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, por permitirem o uso de equipamentos de seus respectivos laboratórios durante a execução dos experimentos, pelo profissionalismo e pela amizade.

Aos membros do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves e Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pela participação e sugestões científicas que muito contribuíram para esta dissertação.

Aos membros da Comissão Examinadora, Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva e Prof. Dr. Sérgio Antonio de Bortoli, pela disponibilidade, pelas valiosas sugestões e pelo esmero na correção deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) e aos docentes desta instituição, pelas disciplinas ministradas, pelo conhecimento intelectual adquirido, exemplo profissional e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rinaldo César de Paula, que coordenou o curso de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela disponibilidade, amizade e pelo auxílio sempre que precisei.

Ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (FCAV/UNESP), pela concessão do espaço físico e infra-estrutura de suas dependências para realização desta pesquisa.

À todos os amigos e colegas que atualmente fazem parte do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), Ana Maria, Eliane, Irlan, Marta, Juliana Costa, Janaína, Viviane, Larissa, Elaine, Camila, Michele, Paula, Vivian, Najara, Juliana Xavier, Sandra, Flávia, Rebeca, Suzana, Emeline, Fernanda, Lúcia, Daniel, Daiane, e por aqueles que já passaram por aqui, Maila, Mateus, Lucília, Cácia, Paulo Fenerich, Simone, Fernanda Rondon, Natália Leitão, Natália Saiyuri, Nidiane, Camila Fernandes, Liliam, Antônio Roberto, André, Maria Eliane, Rafael, Denise, Priscilla, Mônica, Fernanda, Daniela Rodrigues, Daniela Gomes, pela amizade, troca de conhecimentos e experiências e pelos momentos que passamos juntos.

À grande amiga Poliana Bento Bejo, pela amizade imediata e sincera, pela alegria e disposição diante de qualquer situação, pelas palavras de otimismo, orações, e pela torcida ao meu sucesso profissional. TE ADORO POLINHA!!!

Às amigas Daniela Oliveira, Maria das Graças Sant'Anna Ferreira dos Santos, Rafaela Josemara Barbosa Queiroz e Joseane Guadanhim, pela valiosa amizade, incentivo, carinho e torcida. E como diz a música: "*Amigo é coisa pra se guardar, do lado esquerdo do peito...*", saibam que vocês sempre estarão presentes no meu coração, independente da distância. **ADORO VOCÊS!!!**

Aos colegas do Grupo de Jovens Atuação da Matriz de São Benedito, em especial aos amigos: Pe. Paulo César Mazzi, Letícia Carregari, Matheus Vilhena Parenti, Alessandra Cristina Niero Ferreira, Tiago Máximo da Silva e Natali Elisa Sant'Anna Ferreira, pela amizade, atenção, torcida e orações.

Aos meus amigos de Graduação, Daniele Jovino, Júlio Bortolossi e Juliana Vantini, pela amizade, apoio e eventual ajuda. **VOCÊS SÃO AMIGOS ESPECIAIS!!!**

À TODOS os amigos e colegas de Pós-Graduação, pela amizade, troca de experiências, pelos ensinamentos e bons momentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial à Maria Lucina de Oliveira Moraes da Silva e Aldo Antônio de Souza pela amizade e paciência nos dias de limpeza.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela disponibilidade na prestação de serviços.

À toda minha família, pelo incentivo, carinho e por acreditarem nesse sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos sonhos e objetivos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar nossa vida e contribuir para nosso sucesso. Por isso, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho...

**MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS  
VALEU PESSOAL!!!**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	05
2.1. Dengue: aspectos gerais.....	05
2.2. A espécie <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) .....	07
2.3. O agente de controle biológico <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	12
2.4. A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (díptero-específico) .....	14
2.4.1. Toxinas inseticidas e seu modo de ação .....	16
2.5. Caracterização de bactérias entomopatogênicas.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1. Linhagens e isolado de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	27
3.2. Condições de cultivo das células bacterianas .....	28
3.3. Extração e quantificação do DNA genômico .....	28
3.4. Purificação do DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio com brometo de etídeo .....	30
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase da região promotora de genes <i>cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> .....	32
3.5.1. Síntese de oligonucleotídeos iniciadores específicos.....	32
3.5.2. Amplificação do DNA plasmidial com oligonucleotídeos iniciadores .....	33
3.6. Hibridização da região promotora dos genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry4Ba</i> e <i>cry11Aa</i> pela técnica de "Southern blotting" .....	34
3.7. Bioensaio com larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Separação do material genético de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> em gradiente de densidade de cloreto de cézio .....	40

4.2. Amplificação da região promotora dos genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry4Ba</i> e <i>cry11Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por PCR .....	43
4.3. Análise da região promotora de genes <i>cry</i> do isolado <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> SPS1 pelo método de "Southern blotting" .....	44
4.4. Avaliação do teste de patogenicidade em larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	49
5. CONCLUSÕES .....	56
6. REFERÊNCIAS .....	57

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES *cry* E EFEITO EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)**

**RESUMO** – Dentre os microrganismos empregados no controle de mosquitos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) se destaca por apresentar atividade tóxica contra insetos da ordem Diptera, na qual produz inclusões cristalinas compostas pelas proteínas Cry, que são codificadas por genes *cry* presentes em um único plasmídeo. A produção dessas proteínas em grande escala está relacionada a mecanismos transcricionais, como por exemplo, a expressão de um gene sob o controle de um promotor forte. Tendo em vista que a bactéria *Bti* SPS1 (Patente PI0200228-0) foi isolada do território brasileiro e que possui potencial para o controle de vetores por produzir uma maior quantidade de esporos/cristais em menor tempo, este trabalho teve por finalidade a caracterização da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* de *Bti* SPS1 pelas técnicas de PCR e “Southern blotting”. Em associação a estas técnicas, foi realizado bioensaio para a verificação da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*. Os resultados das análises moleculares indicaram homologia no perfil de hibridização da região promotora da linhagem padrão *Bti* T14-001 e do isolado *Bti* SPS1. A quantificação das suspensões em espectrofotômetro (DO<sub>600nm</sub>) e a leitura de esporos em câmara de Neubauer, revelaram que o isolado *Bti* SPS1 produz uma maior quantidade de esporos/cristais em relação à linhagem padrão *Bti* T14-001. O bioensaio apresentou elevados índices de mortalidade. Estes resultados tornam a bactéria *Bti* SPS1 uma fonte promissora para novas formulações visando o controle de vetores.

**Palavras-Chave:** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, bioensaio, controle biológico, “Southern blotting”

***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: CHARACTERIZATION OF THE *cry* GENES PROMOTOR REGION AND EFFECT ON *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE) LARVAE**

**SUMMARY** – Among the microorganisms used for mosquitoes' control the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) is frequently considered since it presents toxic activities' against Diptera, producing crystal inclusions including Cry proteins, which are coded by a sole plasmid borne set of genes. The production of these proteins in large scale is related to transcriptional mechanisms, as an example, a particular gene expression controlled by a strong promoter. Since the *Bti* bacterial isolate SPS1 (Patent PI0200228-0) was isolated within the Brazilian territory and exhibits potential for the control of vector insects due to a higher crystal production ability in shorter time period, this work had as objective the characterization of the promotion region for the genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* using PCR and "Southern blotting" techniques. Also some bioassays using *Aedes aegypti* larvae were carried out. The results from the molecular analysis have indicated homology for the hybridization profile from the promoter region from the type strain of *Bti* T14-001 and that of the SPS1 isolate. Spectrofotometric (OD<sub>600nm</sub>) and Neubauer chamber measures have revealed that the SPS1 isolate produces a higher amount of spore/crystal as compared to the *Bti* T14-001 strain. The bioassay presented higher mortality levels. These results seem to indicate that the isolate SPS1 is a promising bacterial strain to be used on formulations able to control insect vector pests.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, bioassay, biological control, "Southern blotting"

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença re-emergente que se tornou um grave problema de saúde pública, sendo responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade no Brasil, assim como em outras localidades do mundo. No entanto, a constante transmissão da doença aumentou a preocupação da opinião pública e das autoridades nos diferentes níveis de governo (TAUIL, 2002).

É uma arbovirose causada pelo vírus do gênero *Flavivirus*, do qual são conhecidos quatro sorotipos. A transmissão do agente etiológico ao homem suscetível se dá pela picada do mosquito da espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), principal vetor, infectado pelo vírus. É um mosquito de hábitos doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos (BRASIL, 2001).

A doença se apresenta clinicamente sob duas formas: dengue clássica e a dengue hemorrágica. O processo infeccioso desencadeado pelo vírus da dengue possui um amplo quadro clínico, podendo variar desde uma simples infecção inaparente (assintomática), até quadros mais graves, nos quais se verificam hemorragias, abrupto aumento da permeabilidade vascular e desenvolvimento de choque hipovolêmico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A eliminação de mosquitos e vetores de endemias é realizada na grande maioria das vezes, pela utilização de inseticidas sintéticos altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, que resulta em conseqüências graves ao ser humano e ao meio ambiente, além de causar o aparecimento de populações de insetos resistentes (VILARINHOS et al., 1998). Isto indica a necessidade de se reduzir o consumo destes produtos através do emprego de alternativas de controle mais eficazes e seguras. Com isso os agentes de controle biológico aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável.

Dentre os microrganismos empregados no controle biológico de mosquitos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se destaca por apresentar atividade tóxica contra insetos da ordem Diptera (culicídeos e simúlídeos), a qual possui vantagens como a especificidade em relação ao inseto-alvo, não polui o ambiente, não é nociva a fauna e a flora, e não apresenta toxicidade ao homem (LERECLUS et al., 1993).

É uma bactéria Gram-positiva, aeróbia e tem como característica principal a produção de inclusões protéicas bioinseticidas (proteínas Cry) durante a esporulação, o que confere a ela a característica entomopatogênica (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). As proteínas Cry desta espécie bacteriana são codificadas por genes *cry*, que estão presentes em um único plasmídeo de 72 MDa (LERECLUS et al., 1989).

A patogenicidade e a especificidade de uma dada linhagem de *B. thuringiensis* é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, ou seja, a atividade inseticida da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* é resultante da ação de quatro genes principais (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cyt1Aa*), todos localizados em um único plasmídeo (CRICKMORE et al., 1998). É importante salientar que as toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* agem sinergisticamente, ou seja, quando isoladas têm seu efeito reduzido. Este número de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (BELTRÃO & SILVA-FILHA, 2007).

A bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 utilizada neste trabalho, foi isolada em território brasileiro e patenteada (Patente PI0200228-0) por LEMOS & SENA (2002) pois produz uma maior quantidade de esporos/cristais se comparada com outra

linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e apresenta atividade tóxica a insetos da ordem Diptera.

A produção em grande escala destas proteínas Cry pela bactéria *B. thuringiensis* está relacionada a mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Um dos mecanismos transcricionais envolvidos neste processo consiste na expressão de um gene, sob o controle de um promotor forte (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

Atualmente, vários estudos são desenvolvidos baseados nas técnicas de biologia molecular visando à caracterização de microrganismos, nos quais já são conhecidas várias aplicações da tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de insetos, sendo que a maioria dos exemplos provem de bactérias, principalmente empregando *B. thuringiensis* e espécies correlatas (AZEVEDO, 1998).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* é estudada principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e tem como característica a amplificação exponencial de uma determinada seqüência de ácido nucléico *in vitro*, através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores (MULLIS & FALLONA, 1987). Associada a esta, a técnica de "Southern blotting" é empregada visando à hibridização de genes que codificam o cristal tóxico (sondas), com o DNA em estudo, de modo a comparar, geneticamente, isolados pouco conhecidos de *B. thuringiensis*, além de identificar o potencial inseticida de uma determinada toxina (BROWN, 2003).

Em adição às técnicas moleculares, a verificação da atividade tóxica de linhagens de *B. thuringiensis* em insetos-alvo também é realizada por meio de testes de patogenicidade, onde uma população é infectada pelo patógeno e o efeito é avaliado através da morte ou pelo surgimento de sintomas (HABIB & ANDRADE, 1998).

Tendo em vista que a dengue é uma doença de grande importância mundial e que a procura por métodos mais eficientes e seguros de controle dos vetores desta é constante, tornam-se necessários a realização de estudos mais detalhados em relação a bactérias entomopatogênicas como o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (díptero-específico), visto que ele foi descrito e patenteado como sendo uma bactéria

que esporula mais rapidamente, ou seja, produz um número maior de células (esporo + cristal) quando comparada a outra linhagem já estudada.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* do isolado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 pelo emprego das técnicas de PCR e “Southern blotting”, e a realização do teste de patogenicidade (bioensaio) com larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar de *A. aegypti*, visando a comparação da eficiência das proteínas Cry presentes na linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e no isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Dengue: aspectos gerais

A dengue é hoje a arbovirose mais importante do mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto na Europa (TAUIL, 2002; CLARO et al., 2004). Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de se infectarem, principalmente em países tropicais onde as condições climáticas são favoráveis à proliferação do mosquito vetor (TAUIL, 2002).

Dentre as doenças virais de transmissão vetorial, ela é a que mais causa impacto em termos de morbidade e mortalidade na população mundial atualmente e também exige esforços e investimentos cada vez mais intensos dos serviços de saúde pública (GUBLER, 2002; TAUIL, 2002). É uma doença cujo agente infeccioso é um arbovírus (vírus assim denominado por ser transmitido por inseto), do Gênero *Flavivirus*, Família Flaviviridae, do qual são conhecidos quatro diferentes sorotipos (DEN - 1, 2, 3 e 4) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; BRASIL, 2001; TAUIL, 2001).

A doença se manifesta clinicamente sob duas formas: dengue clássica (DC), também descrita como febre da dengue (FD - “dandy fever”) e a dengue hemorrágica (DH) ou febre hemorrágica da dengue (FHD) (MORAIS, 1998). As características clínicas da dengue variam de acordo com a idade do paciente. Os jovens e as crianças

podem apresentar febre com sintomas não específicos e os adultos podem ter síndrome febril suave ou sintomas clássicos da doença que são: febre alta inicial abrupta, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores musculares e nas articulações e erupção cutânea. A dengue hemorrágica é uma complicação que pode levar a morte. Seus sintomas são a febre alta, fenômenos hemorrágicos, freqüentemente há a dilatação do fígado e, em casos severos, falhas na circulação. A doença normalmente começa com uma ascensão repentina da temperatura acompanhada de uma indisposição que começa com um aumento súbito da temperatura seguida por tremor facial e outros sintomas não específicos. A febre geralmente permanece por dois a sete dias, podendo a temperatura corporal atingir 40-41 °C, levando o indivíduo a convulsões febris e hemorragia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; BRASIL, 2001).

A dengue ocorre principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, predominantemente em áreas urbanas e semi-urbanas, e o agente patogênico se dissemina em um ciclo que envolve: homem → *A. aegypti* → homem (COSTA, 2001; BRASIL, 2002; OLIVEIRA, 2006).

Entre os fatores associados à emergência da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas estão o acelerado crescimento e as urbanizações populacionais, associados à insuficiência no controle do vetor e ao aumento do trânsito de pessoas entre os países. A urbanização, rápida e desordenada, associada a uma distribuição desequilibrada dos níveis de renda, conduz a uma proporção cada vez maior de pessoas vivendo em áreas onde o abastecimento de água, esgotamento sanitário e coleta de lixo são precários ou inexistentes (GUBLER & CLARK, 1994 e 1996; TAUIL, 2001). Como a água é indispensável à sobrevivência, a população que habita esses locais vê-se obrigada a armazenar água em depósitos domésticos, que servem como criadouros do vetor. Da mesma forma, como o acúmulo de lixo é incompatível com a vida, seu depósito em áreas peridomiciliares leva ao acúmulo de recipientes que servem de reservatórios do vetor, particularmente nos meses chuvosos do ano (CLARO et al., 2004).

## 2.2. A espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

A ordem Diptera compreende cerca de 130.000 espécies conhecidas, subdivididas em 125 famílias, agrupadas em duas subordens Brachycera e Nematocera, sendo que na segunda encontra-se a família Culicidae (mosquitos e pernilongos) com aproximadamente 3.000 espécies, na qual estão incluídos os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, principais vetores transmissores de patógenos de endemias no Brasil, causadores respectivamente da dengue e febre amarela, malária e filariose. Estes insetos possuem ampla distribuição estando presentes nos diferentes habitats: florestais, rurais e urbanos (MARCONDES, 2001).

No Brasil, o principal transmissor do agente etiológico da dengue é o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), pertencente ao Filo *Arthropoda*, Ordem *Diptera*, Família *Culicidae*, Gênero *Aedes* (Figura 1).



**Figura 1.** Adulto de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Fonte: LEONARD E. MUNSTERMANN. Yale University School of Medicine, 1995.

A espécie *A. aegypti* é originária da África e é considerada cosmopolita, pois atualmente encontra-se distribuída dentro de zonas isotermas de 20°C em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BRASIL, 2001). Acredita-se que o *A. aegypti* foi introduzido no Brasil no período colonial, provavelmente durante o tráfico de escravos provenientes de regiões onde o mosquito já existia (BELTRÃO, 2006).

Em território brasileiro este vetor foi erradicado na década de 1950, mas nas décadas de 60 e 70 ele voltou a colonizar o país, vindo dos países vizinhos que não haviam conseguido promover a sua total erradicação. O *A. aegypti* desenvolveu em sua trajetória evolutiva um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, sendo reconhecido entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (NATAL, 2002). Devido a sua importância como vetor da dengue (arbovirose de grande impacto em saúde pública), pesquisadores americanos seqüenciaram recentemente o genoma do mosquito *A. aegypti*, obtendo uma seqüência genômica com tamanho de aproximadamente 1,38 Gbp.

É um mosquito com ciclo de vida curto variando de 08 a 12 dias, e possui um ciclo biológico que compreende as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (BRASIL, 2001; FORATTINI, 2002) (Figura 2).

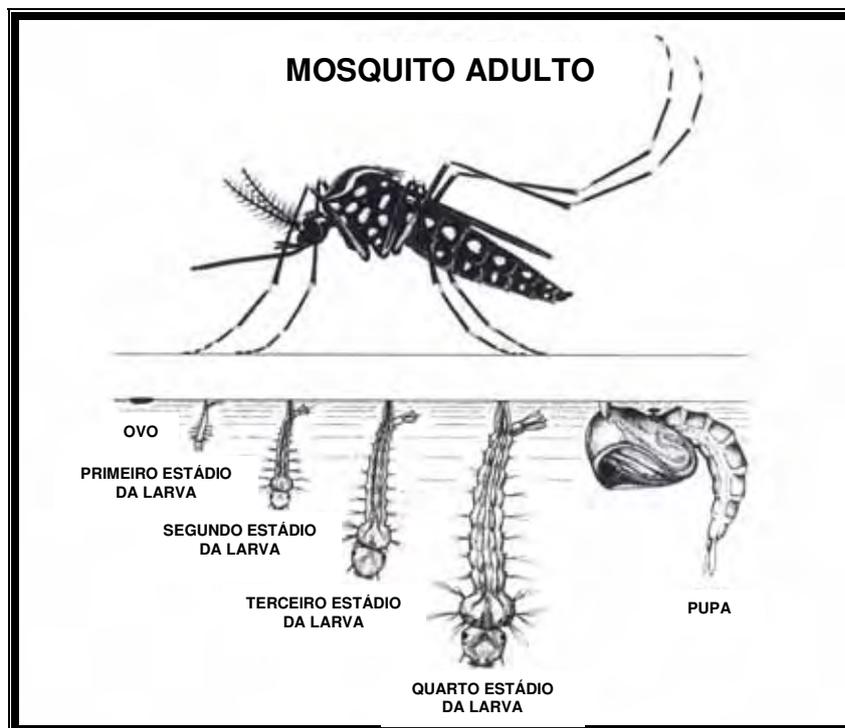
Os ovos do *A. aegypti* medem aproximadamente 1 mm de comprimento, possuindo formato alongado e fusiforme. São depositados pela fêmea, individualmente, nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à superfície da água. No momento da postura os ovos são brancos, mas rapidamente adquirem a cor escura brilhante (BRASIL, 2001).

Como o *A. aegypti* é um inseto holometabólico, a fase larval é um período de nutrição e desenvolvimento pelo qual as larvas passam a maior parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada nas laterais ou no fundo de recipientes. As larvas possuem quatro estádios evolutivos. A duração desta fase depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Elas são compostas por cabeça, tórax e abdômem. Possuem movimento em forma de serpente, movendo-se em S ao se deslocarem. São sensíveis a movimentos bruscos na água e sob feixe de luz deslocam-se com rapidez buscando refúgio no fundo do recipiente

(fotofobia). Para respirar as larvas vêm à superfície onde permanecem em posição vertical (BRASIL, 2001).

Já as pupas possuem o aspecto de vírgula e é nesta fase que elas cessam a alimentação, devido ao período de metamorfose do estágio larval para o adulto. São divididas em cefalotórax e abdômem. Normalmente ficam paradas na superfície da água e se movimentam ativamente quando perturbadas (BRASIL, 2001; MARCONDES, 2001).

O mosquito quando adulto é escuro com faixas brancas nas pernas e no corpo, em um desenho em forma de “lira” na parte dorsal do tórax. O adulto do *A. aegypti* é a fase reprodutora do inseto, sendo neste estágio dependente da ingestão de carboidratos para o aumento da atividade metabólica e conseqüente longevidade. As fêmeas são preferencialmente hematófagas, sendo que o repasto sangüíneo está intimamente relacionado à maturação dos ovos. Os machos alimentam-se de carboidratos extraídos dos vegetais (seiva) (BRASIL, 2001; MARCONDES, 2001).



**Figura 2.** Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*. Fonte: <<http://www.ohiomosquitocontrol.org/about.html>>. 10 maio 2007.

A transmissão do agente patogênico da dengue ao homem ocorre através da picada da fêmea de *A. aegypti* infectada com um dos quatro sorotipos do vírus (MONATH, 1994; DONALÍSIO & GLASSER, 2002). Depois de incubado por 8-10 dias, a fêmea infectada é capaz, durante o repasto sanguíneo, de transmitir o vírus a indivíduos suscetíveis. Uma vez infectados, os mosquitos podem transmitir o vírus durante todo o seu ciclo de vida, inclusive aos seus descendentes por transmissão vertical ou transovariana (JOSHI et al., 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Além da transmissão de doenças, os mosquitos causam grande incômodo e irritação tanto para o homem como aos animais, pelo fato das fêmeas serem hematófagas e, em alguns casos, antropofílicas (alimentam-se exclusivamente de sangue humano) (MARCONDES, 2001).

Este inseto possui hábitos domésticos, com atividade hematofágica diurna (SILVA et al., 2002; FORATTINI & BRITO, 2003). Vive e se reproduz em ambientes com água limpa próximos a habitação humana, embora tenha sido observado também em ambientes poluídos (CLEMENTS, 1999). Coloca seus ovos na parede de recipientes com água, como: vasos de plantas, tambores, pneus, caixas d'água, garrafas, e também em ambientes naturais como poças, lagoas, buracos em árvore, bromélias, internódios de bambu, entre outros (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; CLARO et al., 2004). O *A. aegypti* tem revelado grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Dentre os fatores que podem estar disseminando o vírus da dengue, cabe considerar: a intensificação das trocas comerciais entre os países; os movimentos migratórios; a alta densidade populacional nas áreas metropolitanas; o crescimento desordenado das cidades, onde o abastecimento irregular da água e a inadequada coleta e armazenamento do lixo facilitam a proliferação de mosquitos; a produção do sistema industrial moderno que resulta na fabricação de grande quantidade de recipientes descartáveis como plásticos, latas e outros materiais, cujo destino inadequado também contribuem para a disseminação do inseto transmissor do vírus (GUBLER, 1997; TAUIL, 2001).

Fatores extrínsecos como precipitação pluviométrica, temperatura, altitude, topografia e umidade relativa, condicionam a sobrevivência e reprodução desses vetores (FORATTINI, 2002; RIBEIRO et al., 2006). A incidência de *A. aegypti* eleva-se significativamente nos primeiros meses do ano, alcançando maior magnitude de março a maio, seguida de redução brusca destas taxas a partir de junho. Este padrão sazonal, que nem sempre é observado em outros países, tem sido explicado pelo aumento na densidade das populações do *A. aegypti* em virtude do aumento da temperatura e umidade, que são registradas em grandes extensões de nosso território, durante o verão e o outono (VILARINHOS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002).

Há vários anos a dengue é um dos mais sérios problemas de saúde pública do Brasil, causando preocupação no governo e na população de várias partes do país. A principal tática adotada para o combate do mosquito é o uso maciço e desordenado de produtos químicos (organofosforados, carbamatos e piretróides) (TUN-LIN et al., 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002) para o controle de adultos e larvas (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2006), bem como medidas sanitárias para eliminar as condições ambientais favoráveis à proliferação dos mosquitos vetores.

Devido ao seu amplo espectro de ação, os inseticidas atingem espécies não-alvo provocando um grande impacto ambiental. Entretanto, o uso intensivo de agentes químicos aumenta o custo de controle, pode afetar a saúde pública devido a sua toxicidade, causam desequilíbrio nos ecossistemas, contaminam alimentos, solo e água, e podem promover o desenvolvimento de populações de insetos resistentes (VILARINHOS et al., 1998), visto que a resistência de mosquitos a inseticidas químicos é atualmente uma questão de interesse mundial (SINA & AULTMAN, 2001). Diante deste cenário negativo, faz-se necessário a busca por agentes de controle de insetos mais eficazes e sobretudo seguros. Com isso os agentes de controle biológico aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável.

### 2.3. O agente de controle biológico *Bacillus thuringiensis*

Dentre os agentes de controle biológico, os microrganismos se destacam por apresentarem uma série de vantagens, tendo-se como uma das principais, o seu cultivo facilitado em larga escala (RUAS-NETO, 1984; ZINIU & LONGSHENG, 1990). As bactérias são os microrganismos que mais chamam a atenção de pesquisadores e industriais em todo o mundo, devido principalmente ao seu modo de ação e especificidade (FEITELSON et al., 1992). As principais bactérias entomopatogênicas pertencem às famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae (ARONSON et al., 1986).

Entre as bactérias de importância econômica, o agente entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* destaca-se dentre os organismos empregados no controle biológico, por apresentar atividade tóxica contra insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, estando nelas inclusas importantes pragas agrícolas como *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e vetores de doenças de importância mundial pertencente aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (LERECLUS et al., 1993), além de atingir outros organismos como nematóides (FEITELSON et al., 1992).

A primeira menção em doenças a insetos causada por este tipo de bactéria data de 1901, quando o biólogo S. Ishiwata, no Japão, isolou uma bactéria esporulante que causava mortalidade em bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), sendo esta denominada como “sotto-disease”. Em 1911, Berliner descreveu pela primeira vez um bacilo isolado a partir de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e, em 1915, o batizou de *B. thuringiensis*, nome concedido em homenagem à província da Thuringia (Alemanha) (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000).

É uma bactéria Gram-positiva, catalase positiva, aeróbia, podendo também crescer em anaerobiose (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000), quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é em torno de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (MORAES & CAPALBO,

1986). Suas células vegetativas possuem forma de bastonete, medindo cerca de 1,0 a 2,0  $\mu\text{m}$  de largura por 3,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Esta bactéria é geralmente móvel, possuindo flagelos peritríquios.

A espécie *B. thuringiensis* é um microrganismo encontrado em solos, insetos mortos, plantas, produtos armazenados, que se diferencia dos demais por produzir, durante o processo de esporulação, uma inclusão protéica (cristal) composta por subunidades com poder tóxico (proteínas Cry), tendo atividade contra mais de 300 espécies de insetos e ácaros pertencentes a 15 ordens, o que confere a esta bactéria a característica entomopatogênica (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Estes cristais quando solubilizados em condições específicas de pH atuam no sistema digestivo dos insetos e as pró-toxinas são convertidas em  $\delta$ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se de maneira irreversível a receptores específicos nas células colunares do intestino médio formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio (HOFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; COPPING & MENN, 2000).

As proteínas Cry por sua vez são codificadas por genes *cry*, que podem estar presentes tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (GONZÁLEZ et al., 1982; SANCHIS et al., 1988).

Os produtos à base de *B. thuringiensis* não são prejudiciais a mamíferos, não atingindo a fauna ou a flora, não sendo poluentes e, devido a sua grande especificidade, não atingem os inimigos naturais dos insetos-alvo (SMITS, 1997). Estes fatos propiciam sua utilização há mais de 40 anos em programas de controle biológico em todo o mundo. Atualmente, tais produtos representam mais de 90% de todo o controle biológico de insetos efetuado no mundo e cerca de 2% do mercado de agrotóxicos (VALADARES-INGLIS et al., 1998; DIAS et al., 2002).

#### **2.4. A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (díptero-específico)**

No início da década de 1970, a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* era usada exclusivamente no controle de insetos-praga na agricultura. Posteriormente, a descoberta em Israel de um isolado patogênico a dípteros, denominado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (DE BARJAC, 1978; BECKER, 2000) por GOLDBERG & MARGALIT (1977), iniciou o uso dessa bactéria no controle de vetores de doenças de importância mundial, pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Simulium* (LERECLUS et al., 1993; HABIB & ANDRADE, 1998; CAVADOS et al., 2001; REGIS et al., 2001; LUNA et al., 2004). A cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* foi isolada a partir do intestino de larvas moribundas de *Culex*, sendo posteriormente caracterizada pelo método do antígeno-H como sorovariedade H-14 (DE BARJAC, 1978). O *B. thuringiensis* var. *israelensis* é uma bactéria encontrada naturalmente no solo, em ambientes aquáticos e em cadáveres larvais de insetos (ALY et al., 1985).

O interesse comercial pelo desenvolvimento de produtos para o controle biológico de insetos teve início por volta de 1950, quando pesquisadores perceberam a possibilidade de manipular microrganismos causadores de epizootias em insetos suscetíveis, sem danificar espécies benéficas. Bactérias esporulantes podem ser utilizadas no desenvolvimento de produtos, inclusive em escala industrial, envolvendo as seguintes etapas: fermentação, recuperação do ingrediente ativo e formulação (MORAES et al., 1998).

Dentre os processos fermentativos empregados para *B. thuringiensis* var. *israelensis*, o comumente usado é o processo submerso descontínuo, onde utiliza-se o meio nutritivo líquido para suspender e propagar a biomassa bacteriana. Na etapa final da fermentação as fases de nutrientes se tornam limitantes, promovendo a esporulação e posterior liberação de cristais e esporos no meio de cultura (BRYANT, 1994). O passo seguinte consiste em recuperar o princípio ativo, podendo ser utilizados os métodos de centrifugação, micro filtração ou floculação visando a recuperação dos esporos e cristais protéicos que se encontram misturados no meio (LUNA et al., 2003).

A utilização desta bactéria no controle biológico de mosquitos tem se destacado entre as diversas estratégias que compõe os Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) do mundo, por apresentar diferentes modos de ação (STEVENS et al., 2004) devido à atuação dos produtos em mais de um processo bioquímico e/ou fisiológico, matando o inseto de diferentes maneiras, e também por possuir vantagens como a especificidade em relação ao inseto-alvo, não sendo nociva a flora e a fauna, além de não poluir o meio ambiente. Além disso, *B. thuringiensis* var. *israelensis* não é tóxica a humanos (LUNA et al., 2004), uma característica muito importante, pois os agentes de controle são geralmente aplicados em áreas urbanas, com pessoas próximas à aplicação (POLANCZYK et al., 2003).

Os produtos à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* possuem inúmeras formulações e são usados contra diversas espécies de mosquitos (NAYAR et al., 1999; BATRA et al., 2000), com um preço um pouco superior aos produtos tradicionalmente utilizados, mas competitivos quando considerados os custos sociais e ambientais do uso de inseticidas não seletivos em ecossistemas aquáticos (VILARINHOS et al., 1998).

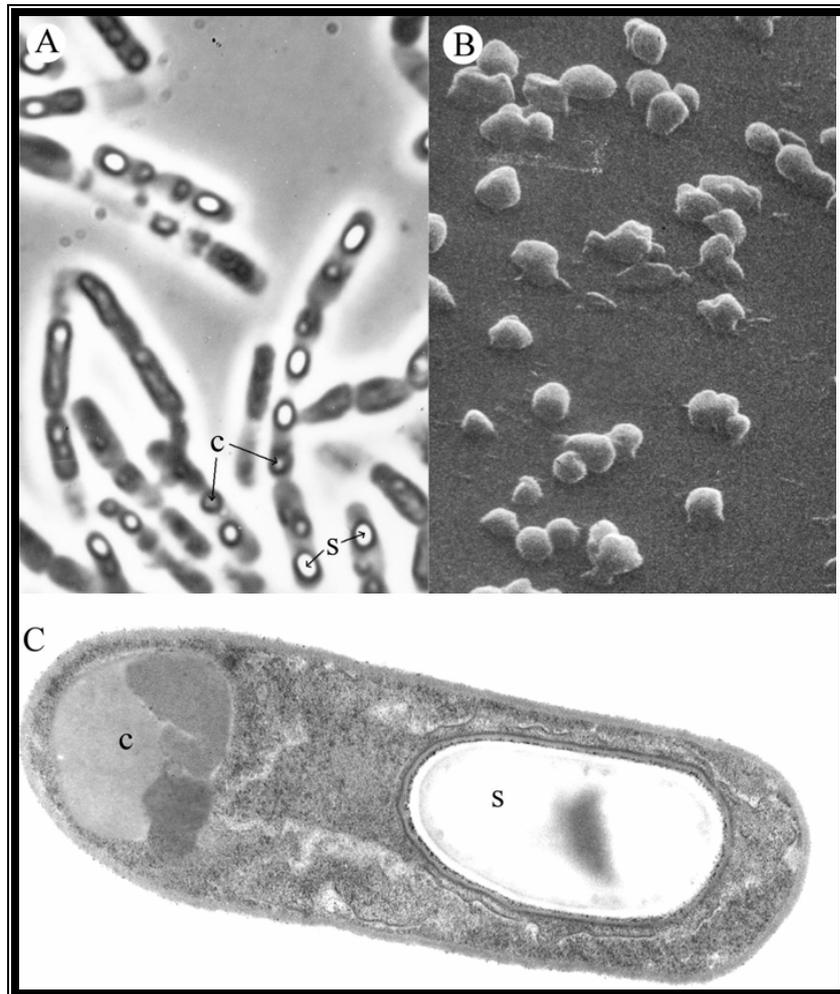
Atualmente, a bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* é comercializada em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos, e um grande número de produtos eficientes estão disponíveis no mercado. No Brasil o *B. thuringiensis* var. *israelensis* teve grande relevância pois este biolarvicida foi integrado no combate ao vetor da dengue no âmbito do “Programa de Controle do *A. aegypti*” (PCA), conduzido em vários municípios afetados pela doença (BRAGA et al., 2004). Nos estados do Rio de Janeiro, Ceará e Rio Grande do Norte foi recomendada a substituição do inseticida temephos (organofosforado) por biolarvicidas à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* considerado um dos agentes de controle biológico mais eficazes contra culicídeos (BRASIL, 2000). Segundo BECKER et al. (2000), o emprego desta bactéria no controle de *Aedes vexans*, *Culex pipiens* e outras espécies de mosquitos por mais de 15 anos na Alemanha, foi um modelo de grande sucesso. Tais formulações também têm sido utilizadas em programas de controle de países como França, Espanha, Hungria, Suíça, Rússia, Itália, Eslovênia, Iugoslávia e Estados Unidos (BECKER & MARGALIT, 1993).

### 2.4.1. Toxinas inseticidas e seu modo de ação

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui, sendo estes codificadores das proteínas Cry (LI et al., 1991).

A eficácia da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* no controle biológico depende da presença de proteínas situadas em corpos paraesporais (cristais) (CHARLES & NIELSEN-LEROUX, 2000; REGIS et al., 2001). Estes cristais são sintetizados na forma de pró-toxinas durante a fase estacionária, no final do crescimento da forma vegetativa, e constituídos por polipeptídeos que recebem a denominação de proteínas Cry. São acumulados na célula mãe esporulada (YAMAMOTO & DEAN, 2000), sendo liberados juntamente com os esporos no momento da lise celular (Figura 3). A atividade tóxica destas proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991). Resultante do processo de esporulação, além da produção das proteínas Cry, tem-se a presença de um endósporo dormente, que sob condições favoráveis pode germinar dando origem a uma célula vegetativa (MORAES et al., 1998).

O potencial inseticida da linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (díptero-específico) resulta da ação de quatro genes principais, sendo que três codificam para proteínas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa), e um codifica uma citolisina (Cyt1Aa - toxina com atividade citolítica e hemolítica) (CRICKMORE et al., 1998), todos localizados em um único plasmídeo de 72 MDa (GONZALEZ & CARLTON, 1984; LERECLUS et al., 1989). Estes plasmídeos são moléculas de DNA circular, extracromossômicos, que têm origem de replicação autônoma, encontrados em bactérias. Geralmente, eles são constituídos por genes que conferem vantagens adaptativas e são habitualmente empregados na engenharia genética, principalmente como veículos de clonagem (AZEVEDO, 2003).



**Figura 3.** Fotografia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) em microscópio. Microscopia de fase (**A**), microscopia eletrônica de varredura (**B**), microscopia eletrônica de transmissão (**C**). **A**) Células vegetativas em fase de esporulação. A multiplicação ocorre por divisão, formando assim uma longa cadeia de bactérias contendo esporos (s) e cristais (c). **B**) Cristais purificados. **C**) Bactéria em fase de esporulação e produção de inclusões cristalinas. Após a ruptura da célula, o esporo e o cristal são liberados no meio. O potencial larvicida de *Bti* advem das proteínas que constituem o cristal (visível pelos diferentes tons de cinza). Fonte: BOISVERT & LACOURSIÈRE (2004).

É interessante notar que as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* var. *israelensis* agem sinergisticamente, ou seja, quando isoladas têm menor efeito do que juntas (cristal nativo) (GILL et al., 1992; CRICKMORE et al., 1995; HUGHES et al., 2005; BELTRÃO & SILVA-FILHA, 2007). Em estudo realizado para avaliação da

toxicidade do *B. thuringiensis* var. *israelensis* para *Chironomus tepperi* (Skuse, 1889) (Diptera: Chironomidae), constatou-se que a toxicidade do cristal nativo era superior do que quando as frações tóxicas eram utilizadas separadamente (HUGHES et al. 2005). Esta ação sinérgica ocorre normalmente quando são usados mais de um agrotóxico (DELÉCLUSE et al., 2000). Este grande número de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (BECKER, 2000; WIRTH et al., 2000; REGIS et al., 2001).

As proteínas Cry4Aa e Cry4Ba são ativas contra dípteros (culicídeos e simulídeos). Os genes *cry4A* e *cry4B* foram isolados de estirpes de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e codificaram proteínas de 135 e 128 kDa, respectivamente, que se agregaram com o produto de 27 kDa de *cyt1A*, formando cristais complexos de forma ovóide (HÖFTE & WHITELEY, 1989) ou composta (esférica ou retangular) (LERECLUS et al., 1989). A forma do cristal é determinada pelo número de proteínas Cry presentes, e uma relação parcial entre a composição da proteína e sua estrutura molecular foi estabelecida por LERECLUS et al. (1993) e GLARE & O'CALLAGHAM (2000). As proteínas Cry4A e Cry4B apresentam similaridade de 40% entre suas porções N-terminal e são proteoliticamente convertidas a fragmentos tóxicos entre 53 e 78 kDa (BRAVO & QUINTERO, 1993; LERECLUS et al., 1993).

Apenas uma proteína da classe Cry10 (Cry 10Aa) que tem atividade contra dípteros é conhecida. Esse gene foi isolado da estirpe de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e codificou uma proteína de 78 kDa. Semelhante a Cry10, os genes codificantes das proteínas Cry11Aa e Cry11Ba também foram isolados a partir de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e codificaram proteínas respectivamente de 72 e 81 kDa que são ativas contra dípteros (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

A produção em grande escala das proteínas Cry pela bactéria *B. thuringiensis* está relacionada a mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Um dos mecanismos transcricionais consiste na expressão de um gene, sob o controle de um promotor forte, em uma célula que não sofrerá nenhum tipo de divisão. Em *B. thuringiensis*, as proteínas Cry são sintetizadas durante a fase de esporulação e a

maioria dos genes *cry* está sob o controle de promotores ativados nesta fase (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

Estudos da regulação gênica de *Bacillus subtilis* revelaram que o processo de esporulação é controlado espacial e temporalmente pela ativação sucessiva de 6 fatores sigma ( $\sigma$ ) (ADAMS et al., 1991). O primeiro fator sigma a ser ativado é  $\sigma A$ , específico da fase vegetativa. Os demais fatores expressos na fase de esporulação são chamados de  $\sigma H$ ,  $\sigma F$ ,  $\sigma E$ ,  $\sigma G$  e  $\sigma K$ , apresentados de acordo com a ordem de ativação (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Os genes *cry4A*, *cry4B* e *cry11A*, assim como o gene *cyt1A*, também são transcritos por promotores múltiplos e ativados pelos fatores  $\sigma 28$  e  $\sigma 35$  (BROWN & WHITELEY, 1990; DERVYN et al., 1995).

Um fator pós-transcricional regulando a expressão de genes *cry* foi observado em *B. thuringiensis* var. *israelensis*. ADAMS et al. (1989) observaram que a presença de um fragmento de 0,8 kb “upstream” ao gene *cyt* era essencial para sua elevada expressão. Análises deste fragmento revelou a presença de uma ORF (“Open Reading Frame”) que codifica para uma proteína de 20 kDa. A presença desta região, tanto em *cis* como em *trans*, promoveu um aumento na quantidade de proteína Cyt produzida, entretanto, não houve aumento significativo no seu RNA mensageiro, indicando que o efeito da proteína de 20 kDa é pós-transcricional. Estes autores detectaram ainda que o início da transcrição da proteína de 20 kDa ocorre 2 horas antes da transcrição da proteína Cyt e que a partir deste ponto ambas as proteínas são produzidas (SALLES & BALDANI, 1998).

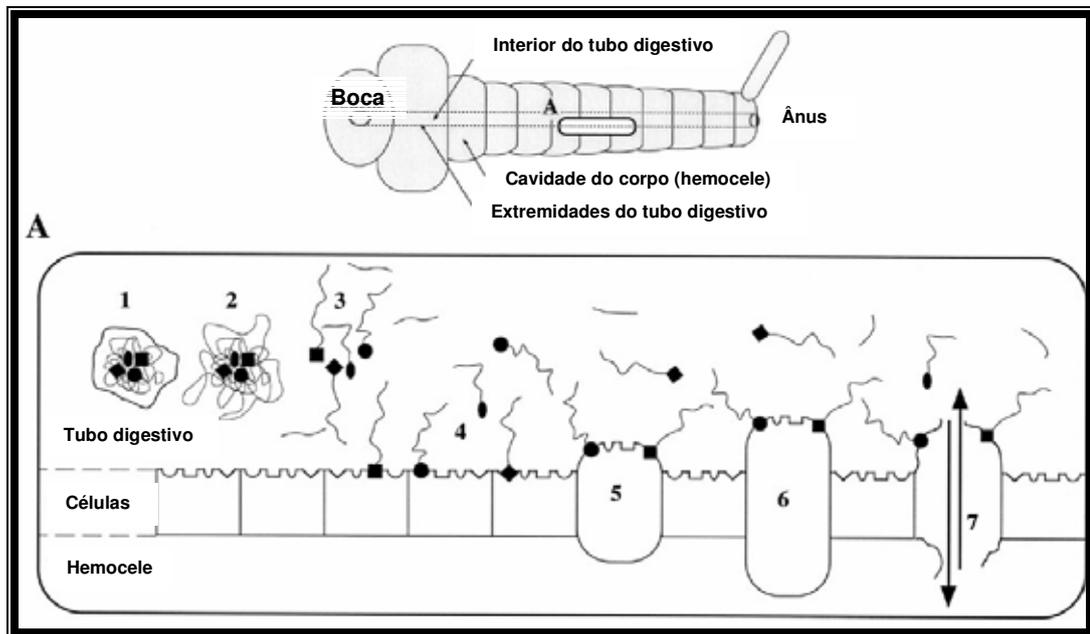
O número de cópias de um gene também influencia a sua expressão. Desta forma, genes localizados em plasmídeos são normalmente expressos em maior quantidade devido ao elevado número de cópias destas estruturas na célula. Em *B. thuringiensis*, o número de plasmídeos pode variar de 1 a 16, sendo que eles ainda variam quanto ao tamanho. A maioria dos genes *cry* estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular de baixo número de cópias. A estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* possui 2 cópias do gene *cry1Ab*, uma cópia localizada em um plasmídeo de 45 MDa e outra no cromossomo. Já os genes *cry1C* e *cry1D* estão próximos e localizados no cromossomo, assim como o gene *cry1Aa* (LERECLUS et al., 1989). Ao

contrário desta, a estirpe de *B. thuringiensis* var. *israelensis* contém todos os genes localizados em um plasmídeo de 72 MDa. Outra característica que deve ser mencionada é a associação existente entre os genes *cry* e os elementos genéticos móveis, como exemplo, as seqüências de inserção (IS) e transposons, o que pode justificar em parte a diversidade e complexidade do espectro de atividade de *B. thuringiensis* (LERECLUS et al., 1993).

Em relação ao mecanismo de atuação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sabe-se que os polipeptídeos de 72 kDa, chamados de pró-toxinas, sofrem transformações em pH alcalino, típico do estômago e intestino dos insetos-alvo, pela ação de proteases, transformando-se em toxinas de aproximadamente 30 a 35 kDa (PFANNENSTIEL et al., 1986).

A ação do *B. thuringiensis* var. *israelensis* envolve inicialmente a ingestão dos cristais, em suspensão na água, pelas larvas aquáticas de mosquitos. Após a ingestão, os cristais são solubilizados em meio alcalino do intestino médio e as pró-toxinas são liberadas, quando ainda não exibem atividade biológica e a ativação proteolítica necessária. As proteases do intestino desdobram as pró-toxinas e produzem uma proteína ativada de menor tamanho. Os fragmentos resultantes desta clivagem variam de 40-44 KDa para os polipeptídeos de 125-135 kDa, 30-35 kDa para os de 68 kDa, e 25 kDa para os de 28 kDa (ANGSUTHANASOMBAT et al., 1992). Esta toxina tem que passar pela membrana peritrófica para ser reconhecida por receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio. Após a ligação com o receptor, a toxina cria poros que interferem no sistema de transporte de íons pela membrana do tecido. Este processo causa lise do epitélio do intestino médio e/ou interrompe a secreção normal, baixando o pH do lúmen, favorecendo a germinação dos esporos que acarretará na septicemia e morte do inseto (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). A inibição da alimentação pode ocorrer logo após a ingestão do esporo e da toxina do *B. thuringiensis*, provocando a morte do inseto (HOFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; COPPING & MENN, 2000; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000) (Figura 4).

O tempo requerido para a expressão máxima é de 24 horas de exposição das larvas ao *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo que estudos sobre a sua toxicidade destacam a susceptibilidade do *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) e do *A. aegypti*, bem como sua inocuidade para a fauna não alvo encontrada nos criadouros destas espécies (GARCIA et al., 1980).



**Figura 4.** Representação esquemática do modo de ação dos cristais de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no intestino da larva do mosquito (**A**). Após a ingestão, os cristais são dissolvidos no líquido alcalino do tubo digestivo (1), liberando longas cadeias de proteínas (2), que são seguidamente separadas por enzimas para produzir os fragmentos tóxicos (3). Estas toxinas fixam-se sobre receptores específicos localizados na membrana das células contidas na parede do tubo digestivo (4). Provocado pelo desequilíbrio bioquímico induzido pela atividade das toxinas, as células afetadas inflam-se (5 e 6) se rompem (7) causando a perfuração da parede do tubo digestivo. Isto provoca a passagem do suco digestivo para a hemocele (cavidade do corpo) (↓) e o movimento oposto da hemolinfa – o sangue do inseto (↑). O rompimento do tubo digestivo causa a morte do inseto. Fonte: BOISVERT & LACOURSIÈRE (2004).

Devido ao seu modo de ação, *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresenta uma potência biológica alta quando comparado aos inseticidas químicos. FEITELSON et al. (1992) estimaram que *B. thuringiensis* var. *israelensis* aplicado em proporções da ordem de  $25 \times 10^{20}$  moléculas/ha é 300 vezes mais potente que piretróides sintéticos e 80 000 vezes mais potente que organofosforados. Segundo SEBESTA & HORSKA (1970), as proteínas presentes nestes cristais também afetam os insetos durante suas metamorfoses, impedindo a pupação e também, em alguns casos, causando o envenenamento de insetos adultos. De acordo com LECADET & MARTOURET (1967), a susceptibilidade de insetos-alvo depende da suas habilidades em pré-digerir (ativar) as toxinas em questão, além do fato das atividades destas toxinas variarem quantitativa e qualitativamente, de acordo com a linhagem que dará origem ao biocida.

Estudos realizados com a estrutura tridimensional das moléculas das toxinas Cry1Aa (ativa para lepidópteros), Cry3A (ativa para coleópteros) e Cry2Aa (ativa para dípteros e lepidópteros) demonstraram semelhanças significativas entre elas. As toxinas apresentam três domínios: domínio I (relacionado à inserção e formação de poros na membrana), domínio II (responsável pelo reconhecimento do receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto) e domínio III (envolvido com as funções dos domínios I e II, além de ser responsável pela estabilidade da toxina) (DE MAAGD et al., 2003).

Trabalhos desenvolvidos com as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba de *B. thuringiensis* var. *israelensis* mostraram que esses três domínios encontram-se em regiões de alta homologia de aminoácidos entre as proteínas Cry: o domínio I consiste de uma região formada por sete  $\alpha$  hélices correspondentes à região N-terminal; o domínio II é formado por folhas  $\beta$  e uma alfa hélice; e o domínio III apenas por folhas  $\beta$ , correspondendo à região C-terminal da toxina (REVINA et al., 2004). As estruturas tridimensionais das pró-toxinas Cry4Aa e Cry4Ba foram descritas recentemente e evidenciou-se a presença dos mesmos domínios estruturais, confirmando assim uma estrutura típica de toxinas que agem via reconhecimento de receptores nos insetos-alvo (ANGSUTHANASOMBAT et al., 2004; BOONSERM et al., 2005). No caso da toxina Cry11Aa a hélice  $\alpha$ -8 do domínio II é um importante epítipo envolvido no reconhecimento do receptor, sendo

isso responsável pela seletividade (FERNÁNDEZ et al., 2005). O receptor Cry11Aa foi recentemente caracterizado a partir do intestino de *A. aegypti* como sendo uma fosfatase alcalina de 65 kDa (FERNÁNDEZ et al., 2006).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (díptero-específico) foi isolada em território brasileiro, sendo posteriormente patenteada (Patente PI0200228-0) (LEMOS & SENA, 2002) por produzir uma maior quantidade de esporos/cristais em menor tempo, se comparada com a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Este isolado encontra-se armazenado na coleção de *Bacillus* entomopatogênicos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), UNESP, Jaboticabal-SP.

## 2.5. Caracterização de bactérias entomopatogênicas

O estudo qualitativo e quantitativo de caracteres que definem um microrganismo denomina-se caracterização. A caracterização de um microrganismo pode ser realizada para a identificação de caracteres morfológicos, fisiológicos, comportamentais e genéticos (SOSA-GÓMEZ et al., 1998). Muitas vezes esta metodologia também auxilia no processo de reconhecimento, a nível específico, quando uma dada linhagem não está bem definida (FRUTOS et al., 1994).

As técnicas de diagnóstico molecular foram inicialmente utilizadas na taxonomia de microrganismos e têm sido intensamente aplicadas em programas de melhoramento genético. Além disso, tem por objetivo revelar a variabilidade ao nível de DNA e, conseqüentemente, detectar diferenças entre indivíduos (MARQUES et al., 2002).

Atualmente, já são conhecidas várias aplicações da tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de insetos, sendo que a maioria dos exemplos provem de bactérias, principalmente empregando *B. thuringiensis* e espécies correlatas (AZEVEDO, 1998). Com a caracterização é possível discriminar os diversos isolados de *B. thuringiensis* através do conhecimento de seus padrões de comportamento e do seu genoma (distribuição dos genes *cry*) (FRUTOS et al., 1994).

Avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar cepas e isolados, podendo também ser empregados na determinação da presença/ausência de certos genes *cry* (POLANCZYK & ALVES, 2003). Segundo ARANTES et al. (2002), a evolução no conhecimento da genética molecular de *B. thuringiensis* na década de 1980, permitiu a diversificação das estratégias de sua utilização no controle biológico.

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A tecnologia da PCR foi desenvolvida por Kary Mullis, em meados da década de 80 (MULLIS & FALLONA, 1987; MULLIS, 1990), e tem como característica a amplificação exponencial de uma determinada seqüência de ácido nucléico *in vitro*, através da utilização de oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores). Os passos essenciais para a realização de uma PCR são: 1) desnaturação do DNA a amplificar; 2) hibridação dos dois oligonucleotídeos iniciadores (pequenas moléculas de DNA de fita simples) a cada uma das cadeias de DNA desnaturado; e 3) extensão dos oligonucleotídeos iniciadores mediante um DNA polimerase estável (DUCASSE, 1999).

Esta técnica apresenta aplicações tais como: a determinação da persistência da bactéria no ambiente, que segundo BOURQUE et al. (1993), pode ser evidenciada pela presença de genes *cry*, detectada por iniciadores específicos a partir de insetos mortos provenientes de culturas tratadas com bioinseticidas e a predição da atividade tóxica de uma linhagem pela determinação do tipo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e direcionando os trabalhos de bioensaio (CAROZZI et al., 1991; KALMAN et al., 1993; CHAK et al., 1994; CÉRON et al., 1995; BRAVO et al., 1998; VILAS-BÔAS et al., 2000; LIMA et al., 2002; VILAS-BÔAS, 2002).

Vários trabalhos que utilizam a técnica de PCR, diretamente ou de técnicas dela derivadas, foram publicados desde a sua descoberta (SCHEINERT et al., 1996; CHEN & TSEN, 2002; LIMA et al., 2002; PORCAR & JUÁREZ-PÉREZ, 2003). Tais trabalhos permitiram avanços significativos tanto em áreas básicas, que procuram o entendimento

de processos biológicos fundamentais, como também em áreas aplicadas, na identificação de genótipos, no diagnóstico de doenças, em estudos filogenéticos, no melhoramento genético de microrganismos, plantas e animais (ANDERSON & STASOVSKI, 1992; OUELLET & SEIFERT, 1993).

A técnica de PCR tem sido ainda empregada em combinação com a técnica de hibridização por “Southern blotting” (SOUTHERN, 1975), visando a hibridização de genes que codificam o cristal tóxico (sondas), com o DNA em estudo, de modo a comparar, geneticamente, isolados pouco conhecidos de *B. thuringiensis*, além de identificar o potencial inseticida de uma determinada toxina (VISSER, 1989; BROWN, 2003).

A metodologia de “Southern blotting” foi desenvolvida baseada nas propriedades de hibridação dos ácidos nucléicos, visando a detecção e isolamento de seqüências específicas destas moléculas. Nesta técnica, o DNA é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por eletroforese num gel de agarose. Os fragmentos de DNA dupla fita são visualizados por coloração com brometo de etídeo, desnaturados e transferidos para uma membrana por capilaridade. Tais condições permitem que o DNA seja retido na membrana no ponto de contacto entre o gel e a membrana, criando uma réplica do gel. O DNA é covalentemente ligado à membrana usando-se calor ou luz ultravioleta. Sondas de ácidos nucléicos podem ser utilizadas para hibridizar com o DNA fixado na membrana e a posição na qual a ligação específica ocorrer pode ser detectada no momento da revelação, pelo uso de marcação com sonda quente (materiais radioativos) ou por marcação com sonda fria (reagentes quimioluminescentes) (MICKOLS et al., 2005).

Em adição às técnicas de PCR e “Southern blotting”, outras metodologias como ensaios de patogenicidade (bioensaios) têm sido utilizadas para análise de genes *cry* e suas toxinas. Dessa forma, a determinação da patogenicidade de um microrganismo ou do nível de suscetibilidade de uma população de insetos a um determinado agente patogênico é realizada, na maioria das vezes, através de bioensaios em laboratório, onde uma população é infectada pelo patógeno e o efeito é avaliado, normalmente,

através da morte, ou então através do surgimento de outros sintomas (HABIB & ANDRADE, 1998).

Diversos estudos têm sido realizados para encontrar a ação sinérgica combinadas entre patógeno-patógeno ou patógeno-inseticida para controlar insetos-praga, em especial utilizando-se o *B. thuringiensis* (GOVINDARAJAM et al., 1976; RICHTER & FUXA, 1984; LIU & TABASHNIK, 1997; BRODERICK et al., 2000; BRICKLE et al., 2001). A verificação da atividade tóxica em insetos-alvo também é utilizada quando se pretende desenvolver produtos à base de *B. thuringiensis*, sendo que o bioensaio deve ser feito para garantir a qualidade do produto final, servindo como parâmetro para a continuidade das etapas posteriores do processo (HABIB & ANDRADE, 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos do presente estudo foram realizados no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP.

#### 3.1. Linhagens e isolado de *Bacillus thuringiensis*

Para a realização das análises moleculares e bioensaio foram utilizadas as linhagens padrão de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo) (díptero-específico) e de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) (controle negativo) (lepidóptero-específico) e o isolado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (Patente PI0200228-0) (díptero-específico). As linhagens e o isolado empregados neste estudo pertencem à coleção do LGBBA, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

### 3.2. Condições de cultivo das células bacterianas

As linhagens e o isolado de *B. thuringiensis* deste trabalho estão estocados na forma de fitas de papel filtro impregnadas com suspensões de esporos e mantidas em BOD a 10°C. Para o início dos experimentos, fitas foram submersas em tubos com tampa de rosca contendo água Milli-Q estéril no dia anterior à repicagem, obtendo-se uma suspensão de esporos (solução trabalho), que foram mantidas em BOD a 10°C.

Para o cultivo das células bacterianas, uma alíquota da solução trabalho foi adicionada em placas de Petri contendo meio de cultura “Nutriente Agar” (NA) (extrato de carne 3 g/L; peptona bacteriológica 5 g/L e ágar 15 g/L) (GORDON et al., 1973) e semeada com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada, sendo posteriormente incubadas em estufa a 30°C por 16 h. As colônias obtidas foram inoculadas com auxílio de uma alça de platina estéril em 50 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) Biobrás® (peptona 10 g/L; glicose 2 g/L; cloreto de sódio 5 g/L e fosfato dissódico 2,5 g/L) e submetidas a agitação a 200 rpm, por 4 h e 30 min, a 30°C.

### 3.3. Extração e quantificação do DNA genômico

A metodologia utilizada para extração do DNA genômico das linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, seguiu o protocolo descrito por MARMUR (1961).

As culturas bacterianas provenientes de 50 ml de meio BHI foram centrifugadas a 7.740 x g, por 15 min, a 20°C. Os precipitados bacterianos obtidos por centrifugação pesavam em média 0,5 g, os quais foram ressuspensos em 6 ml de solução salina [0,15 M NaCl; 0,1 M EDTA, (pH 8,0)] adicionada de lisozima (20 mg/ml), e incubados por 1h e 30 min, a 37°C. Em seguida, adicionou-se 500 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 25% agitando-se suavemente as preparações. Posteriormente acrescentou-se acetato de sódio 2,5 M até a concentração final de 1 M.

As desproteinizações foram feitas utilizando-se clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v) e em seguida foram centrifugadas a 9.800 x g, por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados após a centrifugação e em seguida foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado. Os precipitados obtidos por centrifugação a 12.100 x g, por 15 min, a 4°C foram dissolvidos em TE [10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA (pH 7,4)], ao qual foi adicionado 25 µl de RNase (10 mg/ml) e incubados por 1h, a 37°C. As amostras de DNA foram submetidas novamente ao tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v), e em seguida foram reprecipitadas com 2 volumes de etanol absoluto, sendo após ressuspendidas em 1 ml de TE e estocadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras contendo DNA genômico foram quantificadas em espectrofotômetro BECKMAN® (modelo DU-640B), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 nm calculada. Para estimar a concentração do DNA total obtido, foi utilizado o padrão em que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por ml de solução. A razão entre a leitura a 260 nm e 280 nm ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) demonstra uma estimativa de pureza da preparação de ácido nucléico. Preparações puras de DNA têm valores para este coeficiente no intervalo de 1,8 a 2,0 (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Para análise da qualidade dos ácidos nucléicos, uma alíquota das amostras foi misturada com 3 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) e aplicada em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), sendo submetida à eletroforese com tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM (pH 8,3)], a 70 V, por 2 horas, e após visualizadas sobre luz UV e fotodocumentadas em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do *software Quantity-one*. Em todas as eletroforeses foi utilizada uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb Plus DNA ladder” produzida pela INVITROGEN®, servindo como referência de migração eletroforética.

### **3.4. Purificação do DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο com brometo de etídeo**

A separação do DNA plasmidial e cromossômico foi realizada de acordo com o protocolo proposto por SAMBROOK & RUSSEL (2001). Para a realização do método de ultracentrifugação por gradiente de cloreto de céσιο e brometo de etídeo, foram utilizadas as amostras de DNA genômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 extraídas pelo protocolo de MARMUR (1961), como descrito no item 3.3, na qual obtiveram uma quantificação em torno de 1500 ng/ $\mu$ l de DNA.

Para a preparação das amostras, adicionou-se 1 ml de DNA, 840  $\mu$ l de água Milli-Q estéril, 160  $\mu$ l de solução de brometo de etídeo (10 mg/ml) e 2 g de CsCl<sub>2</sub> sólido, perfazendo um volume de 2 ml de uma solução de DNA/cloreto de céσιο. A densidade final da solução deve ter 1,55 g/ml e a concentração de brometo de etídeo deve-se aproximar a 740  $\mu$ g/ml. Em seguida as amostras foram colocadas em tubos plásticos de ultracentrífuga Beckman<sup>®</sup> (TL-100) e centrifugados em um rotor TLA-100.3 a 264.000 x g, por 20 h, a 20°C.

Após a ultracentrifugação foi possível visualizar através de luz ultravioleta a presença de duas bandas, sendo a superior referente ao DNA cromossômico e a inferior ao DNA plasmidial. Para a visualização das bandas obtidas neste procedimento de centrifugação, foram utilizados equipamentos como óculos e placa de proteção à luz UV. Posteriormente realizou-se a coleta das bandas de DNA com auxílio de uma micropipeta, sendo que estas foram colocadas em tubos do tipo “ependorf” separadamente.

Em seguida foram realizadas lavagens sucessivas para a retirada do brometo de etídeo, nas quais utilizaram-se volumes de N-butanol 1 (saturado com água ou álcool isoamílico) que, após foram misturadas rapidamente em agitador do tipo “vortex” e submetidas a centrifugação a 239 x g, por 3 min, à 25°C.

A remoção do cloreto de céσιο das amostras foi realizada através de lavagens no qual adicionou-se 3 volumes de água Milli-Q estéril e 2 volumes de etanol absoluto a

4°C, que após foram suavemente homogeneizadas e centrifugadas a 10621 x g, por 15 min, a 4°C. Posteriormente, os plasmídeos foram ressuspensos em 30 µl de TE [10mM Tris HCl, 1 mM EDTA (pH 7,4)] e os cromossomos em 50 µl do mesmo tampão.

As amostras contendo DNA plasmidial e cromossômico foram quantificadas em espectrofotômetro BECKMAN® (modelo DU-640B), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo a relação 260/280 nm calculada (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Para verificação da integridade das amostras de plasmídeo e cromossomo e de seus respectivos perfis, uma alíquota de DNA destes foi adicionada em 3 µl de tampão de amostra ("loading buffer" - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) e aplicada em gel de agarose 0,7% "Low Melting Point" contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), sendo posteriormente submetida à eletroforese com tampão TAE 1X [40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA (pH 8,3)], a 24 V, por 12 horas, sendo posteriormente visualizadas sobre luz UV e fotodocumentadas em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do *software Quantity-one*. Para estas eletroforeses foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb "1kb Plus DNA ladder" (INVITROGEN®), servindo como referência de migração eletroforética e também aplicou-se uma amostra de DH5α como padrão de banda cromossômica.

### 3.5. Reação em Cadeia da Polimerase da região promotora de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

#### 3.5.1. Síntese de oligonucleotídeos iniciadores específicos

Para a síntese dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizou-se as seqüências FASTA referentes à região promotora dos genes: *cry4Aa* (YOSHISUE et al., 1993a e YOSHISUE et al., 1997), *cry4Ba* (YOSHISUE et al., 1993b) e *cry11Aa* (DERVYN et al., 1995). Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados por LIMA (2006)\* (comunicação pessoal), de acordo com os seguintes parâmetros: diminuição da concentração de A e T, presença de GC nas extremidades 5’ e 3’, TM dos “primers” a 60 °C (MITSUHASHI, 1996; DIEFFENBACH & DVEKSLER, 2003). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa BIONEER®. Os oligonucleotídeos iniciadores e suas seqüências encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*.

Iniciadores	Seqüências	Produto (pb)
<i>pcry4Aa</i>	5’ GCTGGTTGATTGTCAAAAAATGACGC 3’(d) 5’ TGTTCTCCATACTCAATTTAGATAC 3’(r)	447
<i>pcry4Ba</i>	5’ CCACTAACGATATGTATGGAAAATTAT 3’(d) 5’ CTCCCATATTACATTGGATACAATC 3’(r)	400
<i>pcry11Aa</i>	5’ GTTTTTTTAGTCAAAGATACATT 3’(d) 5’ CCACCTTTTATTGAATTTTTTTAT 3’(r)	805

(d): direito; (r): reverso

\* LIMA, P. S. C. (2006): Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio Norte, Teresina – PI.

### 3.5.2. Amplificação do DNA plasmidial com oligonucleotídeos iniciadores

Para as reações de PCR utilizou-se como DNA molde para as amplificações, o DNA plasmidial da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo) e o DNA genômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) (controle negativo).

As reações de amplificação para os distintos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*pcry4Aa*, *pcry4Ba* e *pcry11Aa*) foram conduzidas em um volume de 20  $\mu$ l contendo: 30 ng de DNA molde; 250  $\mu$ M de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>); 2  $\mu$ l da solução tampão para a reação de PCR (10X) [200 mM Tris; 500 mM KCl (pH 8,4)] e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 $\mu$ l). Em todos os lotes de reação foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água Milli-Q, previamente esterilizada. Para as reações de PCR foi realizada uma mistura, onde se multiplica a quantidade, em microlitros, de cada reagente, com exceção do DNA, pelo número de amostras. Os reagentes foram misturados até completa homogeneização e 17  $\mu$ l da mistura foram distribuídos em cada um dos tubos para PCR, e em seguida 3  $\mu$ l das amostras de DNA foram adicionados nos tubos.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, Inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5 min a 95°C e 31 ciclos consistindo de um passo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento dos oligonucleotídeos a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 min. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 13°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após a realização das amplificações, adicionou-se às amostras 3  $\mu$ l de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%). Um volume

de 15 µl de cada amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetido à eletroforese, por 2 h, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM (pH 8,3)]. Em todas as eletroforeses realizadas foi adotado o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder”, produzida pela Invitrogen®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad®), através do *software* *Quantity-one*.

### **3.6. Hibridização da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* pela técnica de “Southern blotting”**

As amostras de DNA plasmidial e cromossômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 foram submetidas a digestão com a enzima de restrição do tipo I *EcoRI*.

As preparações foram feitas em um volume total de 10 µl, sendo que para os plasmídeos foram utilizados: 230 ng do DNA, 10% do volume total da reação de tampão da enzima, 10 U de enzima de restrição *EcoRI* e o volume restante foi completado com água Milli-Q estéril. Para as reações com cromossomo, utilizou-se 150 ng do DNA, 10% do volume total da reação de tampão da enzima, 10 U de enzima de restrição *EcoRI* e volume foi completado com água Milli-Q estéril. As reações foram incubadas a 37°C, durante 2 h e 30 min, em aparelho termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.).

Posteriormente, foram adicionados às reações 3 µl de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) e após aplicados em gel de agarose a 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), o qual foi submetido à eletroforese, por 2 horas, a 50 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM (pH 8,3)], adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Foi

adotado o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb “1kb DNA ladder”, produzida pela Invitrogen<sup>®</sup>, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Utilizou-se também uma amostra de DNA  $\lambda$  (“DNA control”) pertencente ao Kit “Gene Images<sup>™</sup> AlkPhos Direct<sup>™</sup> labelling and detection system” (Amersham Biosciences<sup>®</sup>), como controle negativo e o DNA cromossômico das amostras como fonte para comparações. Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad<sup>®</sup>), através do *software Quantity-one*.

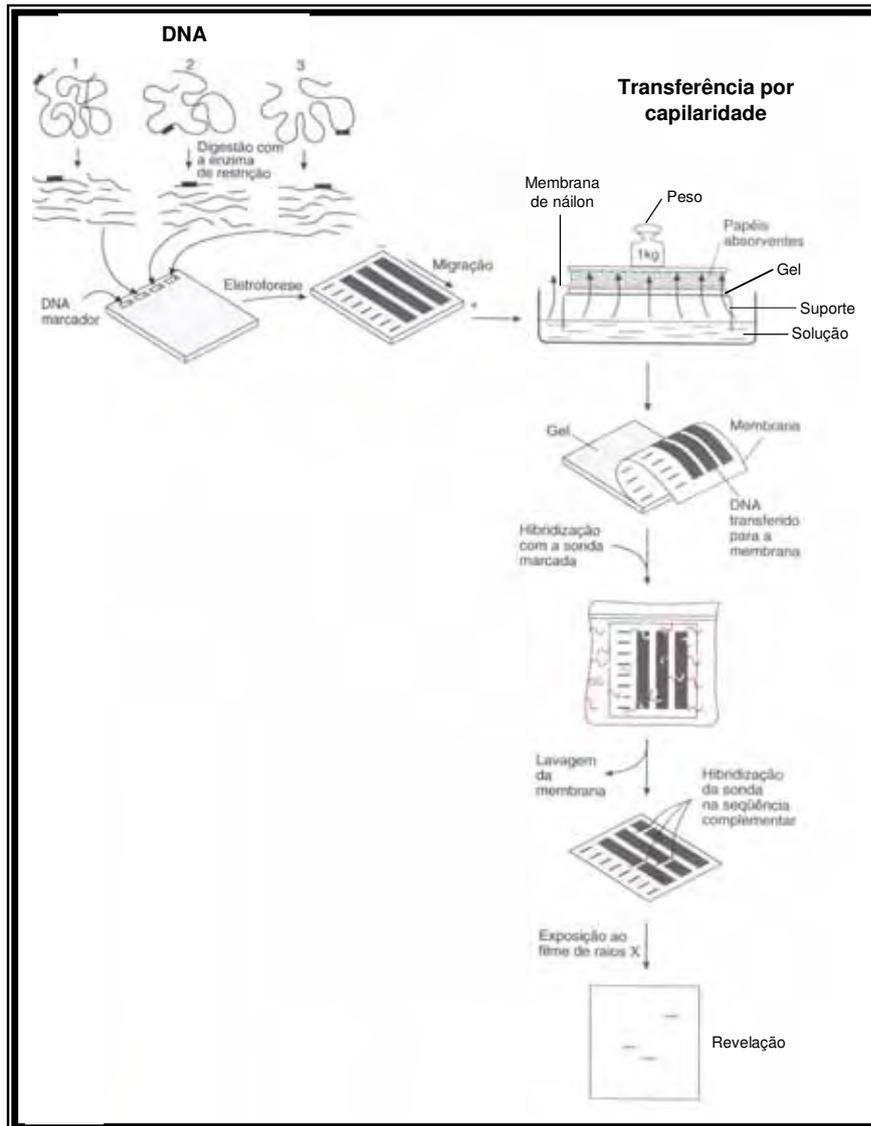
Em seguida, o gel foi desnaturado em 100 ml da solução de desnaturação (765  $\mu$ l HCl 0,25N, 100 ml água Milli-Q) por 15 min. Transcorrido este período, o gel foi rapidamente lavado com água Milli-Q e neutralizado com 100 ml de solução de neutralização (10 g NaOH, q.s.p. 1 L água Milli-Q) por 30 min.

A transferência dos DNA plasmidiais e cromossômicos contidos no gel de agarose ocorreu por capilaridade em uma membrana de náilon carregada positivamente Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences<sup>®</sup>), sendo as hibridizações conduzidas conforme protocolo descrito por SOUTHERN (1975) e SAMBROOK & RUSSEL (2001) (Figura 5).

Os fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA plasmidial da linhagem padrão de *B. thuringiensis var. israelensis* T14-001 por PCR com a utilização dos primers *pcry4Aa*, *pcry4Ba* e *pcry11Aa*, foram utilizados separadamente como sondas frias em uma concentração de 100 ng/ $\mu$ l, feita a partir do Kit “Gene Images<sup>™</sup> AlkPhos Direct<sup>™</sup> labelling and detection system” (Amersham Biosciences<sup>®</sup>) que é baseado no sistema de quimioluminescência, e contém o reagente de detecção quimioluminescente “CDP-Star<sup>™</sup>”.

As amplificações contendo diferentes “primers” foram transferidas para tubos do tipo “eppendorf” e desnaturadas por 5 min a 95°C em aparelho termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.). Imediatamente após a desnaturação, os DNAs foram resfriados em gelo por 5 min. Um volume de 10  $\mu$ l do tampão de reação, 2  $\mu$ l do reagente de marcação e 10  $\mu$ l da solução “cross-linker” (Kit “Gene Images<sup>™</sup> AlkPhos Direct<sup>™</sup>”).

labelling and detection system” (Amersham Biosciences®) foram então adicionados aos tubos contendo DNA e estes foram gentilmente misturados. Após incubação por 30 min a 37°C em aparelho termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.), a sonda foi utilizada para hibridização.



**Figura 5.** Método de “Southern blotting”. O DNA é extraído, digerido com enzimas de restrição e os fragmentos são separados por eletroforese. O material do gel é transferido para membrana e hibridizado com a sonda marcada. Após a revelação as bandas são observadas. Fonte: FARAH (2007).

Após este período, as membranas de náilon juntamente com o tampão de hibridização foram transferidas para garrafas de hibridização e submetidos ao aquecimento a 58°C. Em seguida, as sondas marcadas foram adicionadas às garrafas de hibridização, e estas permaneceram a 58°C por 12 h em forno de hibridização (Fisher Biotech® - modelo FBHI10), sob agitação lenta.

Transcorrido o período de hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem primário, pré-aquecido a 58°C, por um período de 10 min em cada lavagem. Em seguida, as membranas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem secundário à temperatura ambiente, sendo a primeira lavagem realizada por 10 min, e a segunda por 30 min. As soluções foram preparadas de acordo com instruções do fabricante (“Gene Images™ AlkPhos Direct™ labelling and detection system” (Amersham Biosciences®).

Após as lavagens, as membranas foram transferidas para um recipiente plástico onde foram adicionados 40 µl/cm<sup>2</sup> do reagente de detecção “CDP-Star™” (Kit “Gene Images™ AlkPhos Direct™ labelling and detection system” (Amersham Biosciences®) sobre toda à superfície da membrana. Após 20 min em contato com este reagente, as membranas foram envolvidas em filme plástico e, juntamente com o filme de raio-X (Kodak Scientific Imaging Film - Kodak®), foram fixadas em um cassete de revelação, sendo após levadas para uma sala escura. Após 12 h os filmes foram revelados.

### **3.7. Bioensaio com larvas de *Aedes aegypti***

A verificação da eficiência das proteínas Cry presentes nas linhagens padrão e no isolado deste estudo foi realizada através do teste de patogenicidade em larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar de *A. aegypti*. O bioensaio foi conduzido no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (FCAV/UNESP - Jaboticabal). As larvas de *A. aegypti* utilizadas no bioensaio foram obtidas junto ao Controle de Vetores e Zoonoses da Prefeitura Municipal de Jaboticabal, SP.

Para o preparo das suspensões de esporos/cristais, as linhagens padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) e o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 foram previamente inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Nutriente Agar (GORDON et al., 1973) e incubados a 30 °C por 12 h.

Posteriormente, foram feitas as pré-culturas onde colônias isoladas foram inoculadas em tubo Falcon<sup>®</sup> (50 ml) esterilizado contendo 10 ml de meio C<sub>2</sub> [glicose 1%, peptona 0,2%, caseína hidrolisada 0,5%, extrato de levedura 0,2%, 15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 23 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 600 µM CaCl<sub>2</sub>, 250 µM MnCl<sub>2</sub>, 17 µM ZnSO<sub>4</sub>, 17 µM CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 µM FeSO<sub>4</sub> (pH 7,0)] com auxílio de pinça e palito estéreis e submetidas a agitação a 200 rpm, por 12 h, a 30 °C.

Após o crescimento bacteriano, quantificou-se a densidade óptica 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) das amostras em espectrofotômetro BECKMAN<sup>®</sup> (modelo DU-640B), igualando-as a uma mesma DO<sub>600nm</sub>, que em seguida foram inoculadas em 200 ml de meio C<sub>2</sub> e submetidas a agitação a 200 rpm, por 5 dias, a 30 °C, para completa esporulação. Posteriormente, as culturas bacterianas foram quantificadas na DO<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro BECKMAN<sup>®</sup> (modelo DU-640B) e pela leitura de esporos em câmara de Neubauer, de modo que as suspensões fossem padronizados a uma concentração de 3 x 10<sup>6</sup> esporos/ml (ALVES & MORAES, 1998).

Em *B. thuringiensis* existe uma relação em que a produção de um esporo no citoplasma da célula corresponde à respectiva produção de um cristal. Dessa forma, a concentração de esporos permite inferir a existência equivalente de inclusões cristalinas na biomassa, resultando na atividade inseticida.

Para o bioensaio foram utilizados os seguintes tratamentos: (1) *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo), (2) *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, (3) suspensão contendo igual proporção entre *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, (4) *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (controle negativo) e (5) água mineral (testemunha). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo constituído de 5 tratamentos e 4 repetições, com 20 larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> instar de *A. aegypti* por repetição, totalizando 80 larvas por tratamento.

O bioensaio foi realizado em uma sala com temperatura a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . As larvas de *A. aegypti* foram acondicionadas com auxílio de pipeta Pasteur em copos plásticos descartáveis (com capacidade de 200 ml) contendo água mineral e após ambientalização no recipiente, foram adicionadas as suspensões totalizando um volume de 100 ml (água mineral + suspensão). A primeira avaliação de mortalidade das larvas foi iniciada após 30 min da aplicação das suspensões. Avaliações sucessivas foram realizadas a cada 30 min perfazendo um total de 2 h. A mortalidade média das larvas foi submetida ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância pelo *software* ESTAT\*.

\* ESTAT – Sistema de Análise Estatística. Departamento de Ciências Exatas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Separação do material genético de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em gradiente de densidade de cloreto de céσιο

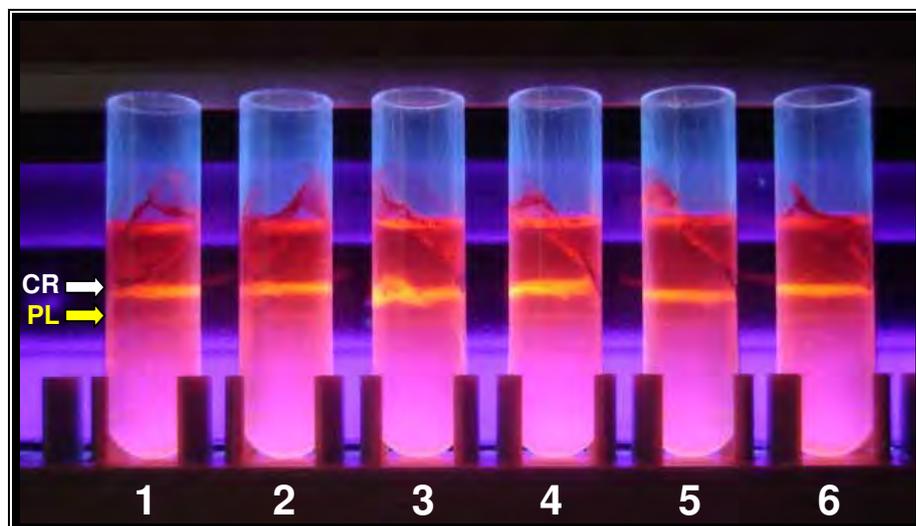
Os ácidos nucléicos são extraídos das células dos microrganismos por diferentes métodos de extração. Quando o interesse está na separação de partículas com diferentes densidades, como é o caso do DNA cromossômico e plasmidial, o método que resulta em amostras de qualidade é a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl), conhecida também como ultracentrifugação isopícnic. Quando o DNA genômico de determinado organismo é submetido a esta metodologia, as moléculas de DNA presentes movem-se em um gradiente até encontrarem o ponto isopícnic, flutuando em um “colchão” formado pelo gradiente de CsCl. Este ponto de flutuação, denominado também como densidade boiante, é a razão entre a densidade da molécula e a densidade do CsCl (AZEVEDO, 2003).

O DNA plasmidial e cromossômico apresentam densidades de flutuação próximas e por isso não podem ser separados facilmente. Com isso, é necessária a

adição do brometo de etídeo (EtBr) à solução de CsCl. O EtBr é um análogo de base que se intercala à dupla fita de DNA emitindo fluorescência quando este é excitado com luz ultravioleta (UV) (GITAHY et al., 2005).

A realização da técnica de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério com brometo de etídeo teve como objetivo a purificação do material genético da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 para posterior utilização nas técnicas de PCR e “Southern blotting”.

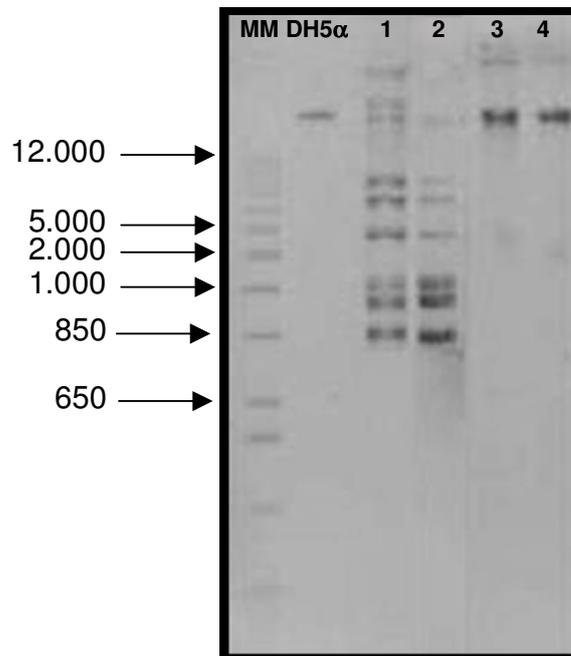
A purificação do DNA genômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 resultou na separação de duas bandas, sendo a superior referente ao DNA cromossômico e a inferior referente ao DNA plasmidial. Na Figura 6 é possível, com auxílio do transiluminador, a visualização dos tubos de ultracentrífuga contendo as duas bandas de DNA, que foram ultracentrifugadas em gradiente de cloreto de cério e coradas com brometo de etídeo.



**Figura 6.** Visualização da separação do material genético da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (tubos 1, 2 e 3) e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 (tubos 4, 5 e 6) por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério com brometo de etídeo. As setas indicam: seta superior (CR) refere-se à banda de DNA cromossômico e a seta inferior (PL) corresponde à banda de DNA plasmidial.

Estes dados estão de acordo com os obtidos por GITAHY et al. (2005), que purificaram as estirpes de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) e de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (S76) por este mesmo método e também obtiveram a formação de 2 bandas distintas.

As bandas de DNA obtidas pela ultracentrifugação foram coletadas separadamente com o auxílio de uma micropipeta de modo que não houvesse nenhuma contaminação entre plasmídeos e cromossomo. Após os procedimentos de retirada do brometo de etídeo e do cloreto de cério, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, sendo que os plasmídeos apresentaram uma concentração em torno de 200 ng/μl e os cromossomos em torno de 2500 ng/μl. Em seguida, uma alíquota destes materiais foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,7% “Low Melting Point” e sob uma corrente de 24 V por 12h, na qual pode-se verificar o perfil plasmidial e cromossômico da linhagem padrão e do isolado (Figura 7).

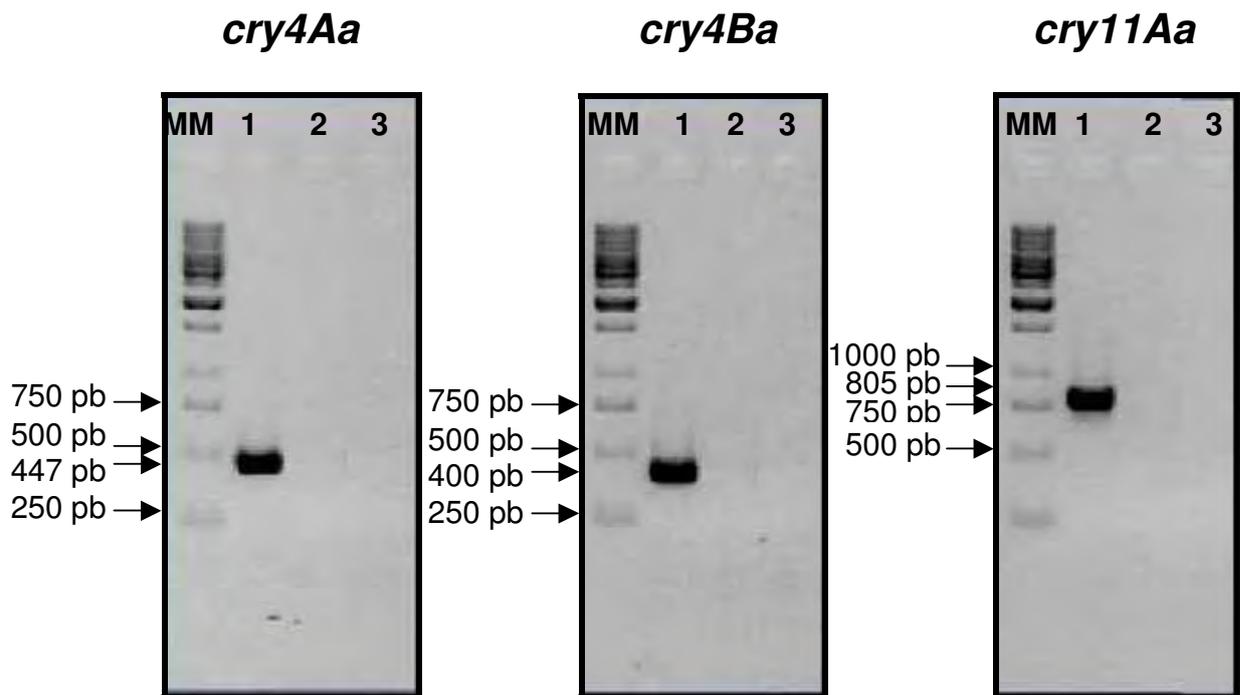


**Figura 7.** Perfil plasmidial e cromossômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1. Canaleta 1: plasmídeo de *Bti*; 2: plasmídeo de *Bti* SPS1; 3: cromossomo *Bti*; 4: cromossomo *Bti* SPS1. MM - marcador molecular (1kb Plus DNA Ladder<sup>®</sup>); DH5α - referência de banda cromossômica.

A análise das amostras de DNA plasmidial e cromossômico por eletroforese demonstrou que a linhagem padrão e o isolado utilizados apresentam perfis plasmidiais semelhantes.

#### 4.2. Amplificação da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* de *B. thuringiensis* var. *israelensis* por PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores elaborados a partir da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* da linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e utilizados nas reações de PCR, resultaram na amplificação de fragmentos únicos (amplicons) com tamanhos esperados (Tabela 1). As amplificações com os diferentes oligonucleotídeos iniciadores estão representadas na Figura 8.



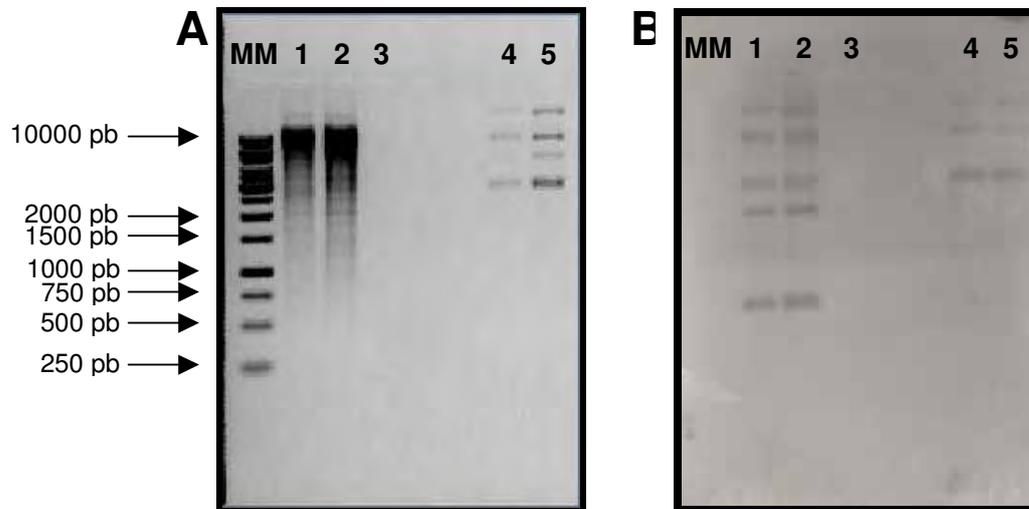
**Figura 8.** Eletroforograma dos produtos de amplificação da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* de *B. thuringiensis* var. *israelensis* obtidos por PCR. Canaleta 1: DNA plasmidial da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001; 2: DNA genômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) (controle negativo); 3: CN (controle negativo da reação). MM - marcador molecular (1kb DNA Ladder®).

#### **4.3. Análise da região promotora de genes *cry* do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 pelo método de “Southern blotting”**

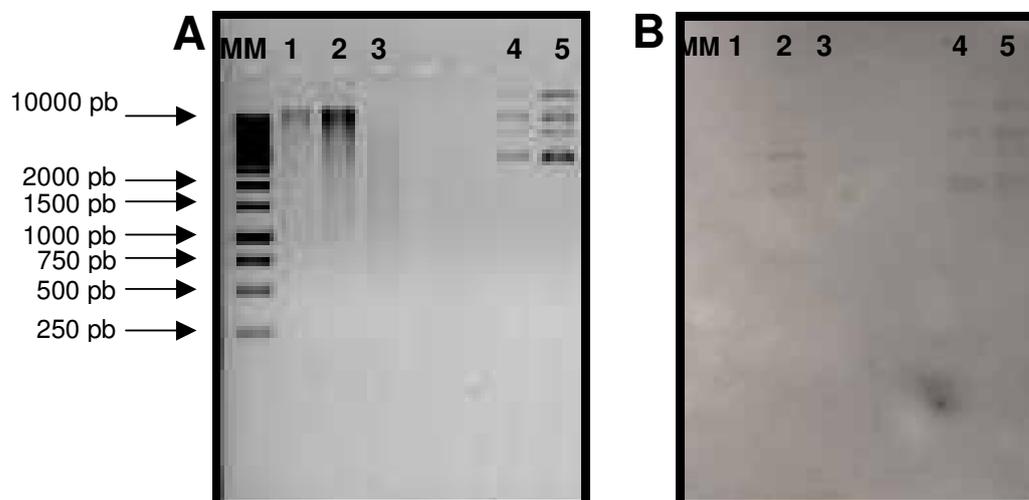
A técnica de “Southern blotting” foi realizada com o DNA plasmidial e cromossômico da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo) e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, visando a comparação da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* de ambas as estirpes, sendo estes genes encontrados no plasmídeo destas bactérias. Como controle negativo utilizou-se uma alíquota de DNA lambda pertencente ao Kit “Gene Images<sup>TM</sup> AlkPhos Direct<sup>TM</sup> labelling and detection system” (Amersham Biosciences<sup>®</sup>).

O DNA plasmidial e cromossômico da linhagem padrão e do isolado citados acima foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* de modo a gerar fragmentos pequenos que fossem facilmente transferidos para a membrana de náilon. Após a corrida eletroforética do material digerido, realizou-se o “blotting”, transferindo-se o DNA clivado presente no gel de agarose para a membrana de náilon, que após foram hibridizadas com as sondas. Foram utilizadas como sondas os produtos obtidos através das reações de PCR realizadas com o DNA plasmidial da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001, sendo que estas foram marcadas com o reagente quimioluminescente “CDP-Star<sup>TM</sup>” do kit “Gene Images<sup>TM</sup> AlkPhos Direct<sup>TM</sup> labelling and detection system” (Amersham Biosciences<sup>®</sup>).

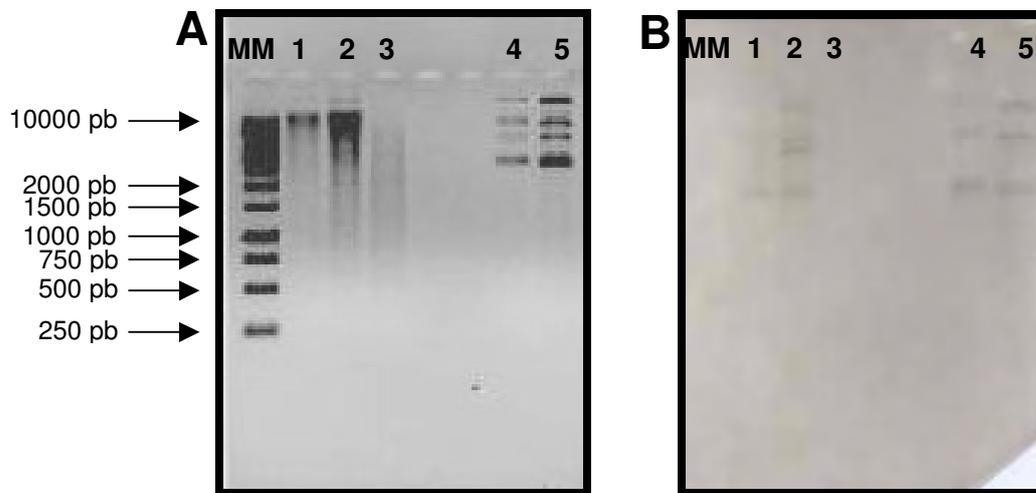
Os fragmentos gerados na digestão com a enzima *EcoRI* foram hibridizados com as sondas separadamente e posteriormente revelados. As Figuras 9, 10 e 11 ilustram as digestões e os resultados obtidos nas hibridizações por “Southern blotting” realizadas com as sondas da região promotora dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa*, sendo possível a verificação de várias bandas tanto no DNA plasmidial como também no cromossômico.



**Figura 9.** Análise eletroforética da digestão do material genético com a enzima *EcoRI* (A) e resultado da hibridização por Southern blotting com a sonda da região promotora do gene *cry4Aa* (B). Canaleta 1: DNA cromossômico da linhagem *Bti*; 2: DNA cromossômico do isolado *Bti* SPS1; 3: DNA lambda; 4: DNA plasmidial da linhagem *Bti*; 5: DNA plasmidial do isolado *Bti* SPS1. MM - marcador molecular (1kb DNA Ladder<sup>®</sup>).



**Figura 10.** Análise eletroforética da digestão do material genético com a enzima *EcoRI* (A) e resultado da hibridização por Southern blotting com a sonda da região promotora do gene *cry4Ba* (B). Canaleta 1: DNA cromossômico da linhagem *Bti*; 2: DNA cromossômico do isolado *Bti* SPS1; 3: DNA lambda; 4: DNA plasmidial da linhagem *Bti*; 5: DNA plasmidial do isolado *Bti* SPS1. MM - marcador molecular (1kb DNA Ladder<sup>®</sup>).



**Figura 11.** Análise eletroforética da digestão do material genético com a enzima *EcoRI* (**A**) e resultado da hibridização por Southern blotting com a sonda da região promotora do gene *cry11Aa* (**B**). Canaleta 1: DNA cromossômico da linhagem *Bti*; 2: DNA cromossômico do isolado *Bti* SPS1; 3: DNA lambda; 4: DNA plasmidial da linhagem *Bti*; 5: DNA plasmidial do isolado *Bti* SPS1. MM - marcador molecular (1kb DNA Ladder®).

A hibridização do DNA cromossômico com as sondas produzidas a partir do DNA plasmidial dos genes *cry* está relacionada a presença de plasmídeos abertos no material cromossômico. Estes resultados confirmam os relatos feitos por PRIMROSE & TWYMAN (2006), que descreveram uma purificação realizada com DNA de *Escherichia coli*, pelo método de centrifugação isopícnica em gradiente de cloreto de céσιο, da qual foi possível a obtenção de duas bandas distintas, sendo a banda superior relativa ao DNA cromossômico juntamente com plasmídeos abertos (forma linear), e a banda inferior composta por DNA plasmidial circular (forma fechada), sugerindo que esta metodologia não separa totalmente plasmídeos de cromossomo (Figura 12).



**Figura 12.** Ilustração da purificação do DNA plasmidial de Col E1 *Kan<sup>R</sup>* por centrifugação isopícnica em gradiente de CsCl-EtBr. Fonte: PRIMROSE & TWYMAN (2006).

Em relação aos resultados obtidos na hibridização das sondas com o DNA plasmidial pode-se afirmar que os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* estão localizados tanto no plasmídeo da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 como também no DNA plasmidial do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, e que a hibridização da região promotora deles com vários fragmentos resultantes da digestão do material plasmidial com a enzima *EcoRI* deve-se ao fato da presença de várias cópias do plasmídeo na célula bacteriana e conseqüentemente a existência de vários promotores neste material genético, os quais são necessários para a expressão dos genes. Dessa forma, pode-se afirmar que a região promotora da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 possui homologia em relação à seqüência de nucleotídeos dos promotores que constituem cada um deles, pelo fato de ambos terem hibridizado a mesma região.

BERRY et al. (2002) buscando o conhecimento da seqüência completa e organização de um megaplasmídeo (pBtoxis) presente na linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* 4Q2-72, desenvolveram estudos utilizando as técnicas de separação por gradiente de cloreto de céσιο com brometo de etídeo, seqüenciamento, análises de comparação de seqüências em banco de dados e PCR. Como resultado desta pesquisa, os autores identificaram uma série de seqüências vinculadas às diversas funções da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* e dentre estas, várias seqüências relacionadas a transcrição dos genes *cry*, ou seja, dos seus promotores.

Em *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, dois pontos de iniciação da transcrição do gene *cry1A(a)* mapeados por WONG et al. (1983) foram definidos como dois promotores com seqüências sobrepostas e que são ativados de maneira seqüencial. O primeiro promotor (BTI) é utilizado a partir do estágio II da esporulação e é reconhecido pela RNA polimerase associada ao  $\sigma^{35}$  (BROWN & WHITELEY, 1988). Já o BTII é reconhecido pelo complexo  $E\sigma^{28}$  a partir do III estágio da esporulação (BROWN & WHITELEY, 1990).

ADAMS et al. (1991) através da clonagem e seqüenciamento dos genes que codificam os fatores sigmas abordados acima, obtiveram seqüências de nucleotídeos com homologia de 88% e 85% em relação aos fatores  $\sigma^E$  e  $\sigma^K$  de *B. subtilis*, respectivamente. O alto grau de similaridade e habilidade em realizar a transcrição a partir destes promotores de *B. subtilis* indicam uma homologia funcional entre os respectivos pares de fatores sigma ( $\sigma^E$ ,  $\sigma^{35}$ ,  $\sigma^K$ ,  $\sigma^{28}$  e  $\sigma^A$ ).

Regiões similares contendo os dois tipos de promotores anteriormente mencionados são encontradas “upstream” aos genes *cry1*, *cry2*, *cry4* e *cyt*. O alto nível de expressão, em perfeita coordenação com a esporulação, faz da bactéria *B. thuringiensis* um modelo notável da regulação gênica em bactérias Gram-positivas capazes de esporular (HABIB & ANDRADE, 1998).

#### 4.4. Avaliação do teste de patogenicidade em larvas de *A. aegypti*

A eficiência das proteínas Cry contra larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar de *A. aegypti* foi obtida através do desenvolvimento de bioensaio utilizando-se a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo) e o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, ambos díptero-específicos. A linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) foi utilizada como controle negativo por ser uma linhagem lepidóptero-específico e utilizou-se como testemunha água mineral.

Visando a comparação dos padrões de crescimento da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001, do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), inoculou-se igual quantidade de células bacterianas em meio C<sub>2</sub> para o preparo das pré-culturas, que após o crescimento, foram monitoradas por determinação da densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>). Após este procedimento, a DO<sub>600nm</sub> das pré-culturas foram igualadas a 1,17 Abs, por meio do acréscimo de meio C<sub>2</sub> estéril. Em seguida, estas foram inoculadas novamente em meio C<sub>2</sub> para o preparo das suspensões bacterianas do bioensaio, como mencionado no item 3.7. Posteriormente, quantificou-se a DO<sub>600nm</sub> dos inóculos e, concomitantemente, realizou-se a quantificação dos esporos presentes nas culturas bacterianas através da leitura em câmara de Neubauer, sendo estes valores listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Quantificação das suspensões bacterianas em espectrofotômetro e em câmara de Neubauer.

<b>Linhagem / Isolado</b>	<b>DO<sub>600nm</sub></b>	<b>N<sup>o</sup> de esporos</b>
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> T14-001	0.8140 Abs	824
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> SPS1	1.1266 Abs	1681
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1	1.2512 Abs	2354

(Abs): absorvância

Os resultados obtidos com a quantificação em espectrofotômetro e pela leitura de esporos em câmara de Neubauer indicaram que o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 produz uma maior quantidade de esporos/cristais em relação a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001. Estes dados corroboram com os obtidos por LEMOS & SENA (2002) (Patente PI0200228-0), no qual relataram que a quantidade de esporos/cristais obtida para o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 foi maior que a da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, obtidas em iguais condições de cultivo e análise. Além desta, foram realizadas observações no que diz a respeito à esporulação destas bactérias, concluindo-se que o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 parece esporular mais rapidamente que a linhagem padrão, resultando num maior número de células e conseqüentemente, maior produção de proteína cristal em menor tempo.

O bioensaio foi realizado através da aplicação dos seguintes tratamentos sobre as larvas de *A. aegypti*: (1) *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 (controle positivo), (2) *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, (3) suspensão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 com *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1, (4) *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) (controle negativo) e (5) testemunha (Figura 13). Todas as suspensões foram padronizadas a uma concentração de  $3 \times 10^6$  esporos/ml e realizou-se as avaliações de mortalidade das larvas em diferentes momentos (Tabela 3).



**Figura 13.** Bioensaio com larvas de 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ínstar de *Aedes aegypti* submetidas aos tratamentos com linhagens e isolado de *Bacillus thuringiensis*.

A primeira avaliação foi realizada após 30 min da exposição das larvas de *A. aegypti* aos diferentes tratamentos. Nesta avaliação, constatou-se que a maior mortalidade foi causada pela suspensão contendo igual proporção da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 com o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1. A média referente a esse tratamento diferiu significativamente das demais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

Para a avaliação realizada aos 60 min pode-se observar que os tratamentos constituídos por *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001, *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e pela suspensão composta por *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%, mostrando que a aplicação em conjunto do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* é viável para o controle de larvas em um curto período (controle imediato).

Na terceira avaliação (90 min) pode-se observar aumento da mortalidade nos tratamentos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001, *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e da suspensão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 com *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 quando comparados com a segunda avaliação (60 min). No entanto, essas médias não foram significativamente diferentes entre si quando submetidas ao mesmo teste, mostrando que a atuação das suspensões de esporos/cristais ocorre logo após a aplicação.

A quarta avaliação (120 min) mostrou um perfil idêntico à terceira, indicando que a mortalidade das larvas de *A. aegypti* estabilizou-se aos 90 minutos posteriores da aplicação dos tratamentos. A mortalidade total (100%) das larvas de *A. aegypti* foi alcançada, decorridas 12 horas a partir da quarta avaliação, tanto para os tratamentos com a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 como para a suspensão contendo a mistura de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1.

Além dos tratamentos com *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001, *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e a suspensão contendo *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 foram empregados outros dois tratamentos, o tratamento 4 representado pela linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *kurtaki* (HD-1) e o tratamento 5 constituído da testemunha. Ambos apresentaram resultados satisfatórios, pois não foi constatada mortalidade de nenhuma larva de *A. aegypti*. Portanto, as médias representadas por esses, diferiram significativamente das demais em todas as avaliações pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

Juntamente a análise estatística descrita anteriormente foi realizada uma análise que relacionou a mortalidade de larvas em função do tempo. Para isto o tratamento primário ficou definido como sendo as suspensões de *B. thuringiensis* e o tratamento secundário constituiu-se dos diferentes tempos de avaliação que foram realizadas após a aplicação das suspensões. Nesta análise pode-se verificar que apenas o primeiro tratamento secundário (30 min) foi estatisticamente diferente dos demais (60 min, 90 min e 120 min), sendo que isto ocorreu para todos os tratamentos primários (Tabela 3).

**Tabela 3.** Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após a aplicação das linhagens e isolado de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamentos	Mortalidade Média (%)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
1- <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> T14-001	43,75 Bb	98,75 Aa	98,75 Aa	98,75 Aa
2- <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> SPS1	37,50 Bb	93,75 Aa	97,50 Aa	97,50 Aa
3- <i>Bti</i> T14-001 + <i>Bti</i> SPS1	72,50 Ab	96,25 Aa	97,50 Aa	97,50 Aa
4- <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (HD-1)	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
5- Testemunha	0,00 Ca	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
Coeficiente de variação da parcela (%)	13,70			
Coeficiente de variação da subparcela (%)	8,99			
Erro padrão da média do tratamento principal	0,31			
Erro padrão da média do tratamento secundário	0,21			

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas linhas (tratamentos) e minúscula nas colunas (tempo), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 5\%$ ).

No decorrer do bioensaio, algumas mudanças foram observadas em relação ao comportamento das larvas tais como: redução gradativa dos movimentos quando comparadas aos grupos-controle; mudança na coloração corporal, sendo que as larvas ficaram mais escuras; e diminuição do tamanho larval.

Segundo HABIB & ANDRADE (1998), a morte das larvas aquáticas de Diptera (culicídeos e simulídeos), ocorre rapidamente (vinte minutos à três horas) quando ingerem a bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14, fenômeno este diferente do observado em larvas da ordem Lepidoptera quando infectadas por *B. thuringiensis* H-3a:3b, cuja morte ocorre dois a três dias após a infecção. Estes autores mencionam ainda, como exemplo, as larvas de *Culex declarator* (Dyar & Knab, 1906) (Diptera: Culicidae) que ao ingerirem o patógeno *B. thuringiensis* var. *israelensis* perdem gradativamente sua agilidade, sendo constatada também a redução rápida nos movimentos das peças bucais, que revelam a perda de apetite ou dificuldade de alimentação, resultando na parada total da ingestão. Paralelamente, convulsões esporádicas ocorrem no início do processo, sendo que seu ritmo aumenta gradativamente, indicando possíveis efeitos no sistema neuromuscular da larva. A velocidade destes sintomas está relacionada com a dosagem do patógeno, idade e grau de suscetibilidade do inseto infectado.

Em estudos realizados com larvas de quarto estágio de *C. declarator*, HABIB (1982) observou que após 30 min da infecção as larvas começam a perder sua capacidade de flutuação, podendo, porém, retornarem à superfície. À medida que a doença avança, as larvas perdem a capacidade de flutuação, permanecendo por mais tempo no fundo do recipiente. Contudo, larvas maiores morrem sempre no fundo do recipiente, enquanto que as pequenas morrem flutuando com o sifão emerso (peso menor) e afundam facilmente a qualquer toque ou movimento na água.

Em relação ao envolvimento da toxemia, os sintomas desta indicam uma alta possibilidade da morte das larvas de *C. declarator* ser também devido a asfixia e não apenas pela ação letal das  $\delta$ -endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Sabe-se que as larvas de pernilongo respiram o ar atmosférico através do sifão. Quando uma toxina afeta o sistema nervoso e o muscular destas, incapacita as mesmas de permanecerem junto à superfície da água com o sifão projetado para fora, onde estas larvas irão afundar e morrer por falta de O<sub>2</sub> e excesso de CO<sub>2</sub> e ácido carbônico nos tecidos (HABIB, 1982 e 1983).

RUIZ et al. (2004) em estudos realizados com larvas de *A. aegypti*, *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820) (Diptera: Culicidae) e *C. quinquefasciatus* expostas à toxina Cry11Bb de *B. thuringiensis* var. *medellin*, descreveram sérias mudanças histopatológicas como vacuolização do citoplasma, hipermetrofia das células epiteliais e de seus núcleos, desintegração celular e formação de vesículas apicais que liberavam seu material no lúmen intestinal.

Ensaio realizado por BARRETO et al. (2006) mostrou a princípio uma redução da mobilidade de larvas de *A. aegypti* submetidas à atividade larvicida do extrato etanólico, extraído a partir da casca do fruto de *Sapindus saponaria*, sendo posteriormente analisadas por microscopia, das quais resultaram em alterações morfo-histológicas, tais como: destruição total ou parcial de células; alta vacuolização do citoplasma; hipersecreção das células epiteliais e pavimentação do epitélio. Foram feitas também observações em relação aos movimentos larvais, sendo que estas começaram a apresentar movimentos mais lentos após 30 minutos do início dos testes e tornaram-se lentas ou imóveis após 3 h.

Os resultados obtidos neste bioensaio revelam que a utilização de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 no controle de larvas de vetores importantes em saúde pública é muito promissora, pois foi comprovado através deste trabalho que essa bactéria promove um controle rápido e eficaz e que possui um grande potencial por produzir uma maior quantidade de esporos/cristais que a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001. Diante destes resultados, torna-se necessário a realização de estudos mais detalhados sobre a toxicidade deste isolado, visto que a implantação do mesmo como um bioinseticida implica em reduções no custo de aplicação devido a sua eficácia anteriormente citada, além de não provocar impactos ambientais nos locais onde são empregados e também em relação aos organismos que ali habitam.

## 5. CONCLUSÕES

- \* A linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 e o isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 são semelhantes no padrão de bandas;
- \* As regiões promotoras dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* do isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e da linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 apresentam alta similaridade genética;
- \* O isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 produz uma maior quantidade de esporos/cristais que a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001;
- \* O isolado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* SPS1 e a linhagem padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* T14-001 causam índices excelentes de mortalidade para larvas de *Aedes aegypti* após 60 minutos da aplicação;

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS, L. F.; VISICK, J. E.; WHITELEY, H. R. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 1, p. 521-530, 1989.

ADAMS, L. F.; BROWN, K. L.; WHITELEY, H. R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 12, p. 3846-3854, 1991.

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995.

ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-778.

ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICO, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 46, n. 3, p. 251-258, 1985.

ANDERSON, J. B.; STASOVSKI, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, Bronx, v. 84, n. 4, p. 505-516, 1992.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, V.; ELLAR, D. J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 63-68, 1992.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; UAWITHYA, P.; LEETACHEWA, S.; PORNWIROON, W.; OUNJAI, P.; KERDCHAROEN, T.; KATZENMEIER, G. R.; PANYIM, S. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Yeoksam-dong, v. 37, n. 3, p. 304-313, 2004.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. p. 269-293.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUM, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, n. 1, p. 1-24, 1986.

AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 239-268.

AZEVEDO, M. O. Centrifugação. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A.; DE-SOUZA, M. T. (Ed.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: UnB, 2003. p. 21-34.

BARRETO, C. F.; CAVASIN, G. M.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (SAPINDACEAE). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.

BATRA, C. P.; MITTAL, P. K.; ADAK, T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 16, n. 4, p. 321-323, 2000.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J. F. DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 383-398.

BECKER, V.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Londres: John Wiley & Sons, 1993. p. 147-169.

BELTRÃO, H. B. M. **Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 163-169, 2007.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.

BOISVERT, J.; LACOURSIÈRE, J. **Le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec**. Quebec: Ministère de l'Environnement, 2004. 101 p. (Document l'Environnement - ENV/2004/0278).

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.

BOURQUE, S. N.; VALERO, J. R.; MERCIER, J.; LAVOIE, M. C.; LEVESQUE, R. C. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 2, p. 523-527, 1993.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B.; SOARES, S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do país.** Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor:** manual de normas técnicas. 3. ed. Brasília, 2001. 84 p. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsasv/p/fulltext/manual/manual.pdf>>. Acesso em: 02 agosto 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Dengue:** aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília, 2002. 20 p. Disponível em: <[http://www.defesacivil.sp.gov.br/documentos/cartilha\\_dengue.pdf](http://www.defesacivil.sp.gov.br/documentos/cartilha_dengue.pdf)>. Acesso em: 02 agosto 2007.

BRAVO, A.; QUINTERO, R. **Importancia y potencial del *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas.** Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe: Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO), 1993. 58 p.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRICKLE, D. S.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, J. Efficacy of insecticides of different chemistries against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic *Bacillus thuringiensis* and conventional cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 86-92, 2001.

BRODERICK, A. N.; GOODMAN, K. F.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, n. 1, p. 101-107, 2000.

BROWN, K. L.; WHITELEY, H. R. Isolation of the *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 12, p. 4166-4170, 1988.

BROWN, K. L.; WHITELEY, H. R. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 12, p. 6682-6688, 1990.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

BRYANT, J. E. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 31-35, 1994.

CAROZZI, N. B. ; KRAMER, V. C. ; WARREN, G. W. ; EVOLA, S. ; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.

CAVADOS, C. F. G.; FONSECA, R. N.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera: Simuliidae) larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 1017-1021, 2001.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, 1995.

CHAK, K. F.; CHAO, D. C.; TSENG, M. Y.; KAO, S. S.; TUAN, S. J.; FENG, T. Y. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2415-2420, 1994.

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, suppl. 1, p. 201-206, 2000.

CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 912-919, 2002.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1447-1457, 2004.

CLEMENTS, N. A. **The biology of mosquitoes**. Wallingford: CABI Publications, 1999. v. 2, 740 p.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994. 225 p.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

COSTA, M. A. R. **A ocorrência do *Aedes aegypti* na região noroeste do Paraná**: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí - 1999, na perspectiva da geografia médica. 2001. 214 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2001.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, n. 3, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

DE BARJAC, H. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 286, n. 10, p. 797-800, 1978.

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V. J.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 101-126.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, V.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

DERVYN, E.; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 9, p. 2283-2291, 1995.

DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F.; MARTINS, E. S.; SOARES, C. M. S; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 26 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 30).

DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **PCR Primer: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, 520 p.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DUCASSE, D. A. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR). In: DOCAMPO, D. M.; LENARDÓN, S. L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistémicos**. Córdoba: Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) – INTA-JICA, 1999. p. 57.

FARAH, S. B. **DNA: segredos & mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007, p. 111.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 3, p. 271-275, 1992.

FERNANDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M. H.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop a-8 of domain II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, 2005.

FERNANDEZ, L. E.; AIMANOVA, K. G.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **The Biochemical Journal**, London, v. 394, n. 1, p. 77-84, 2006.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2, 860 p.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 676-677, 2003.

FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A.; REVET, B.; BERGOIN, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 63, n. 3, p. 294-300, 1994.

GARCIA, R.; DES ROCHERS, B.; TOZER, W. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against organisms found in association with mosquito larvae. **Proceedings of the Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association**, Sacramento, v. 48, p. 33-36, 1980.

GILL, S. S.; COWLES, E.; PIETRANTONIO, P. The mode of action do *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 615-634, 1992.

GITAHY, P. M.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. L. S.; DE-SOUZA, M. T.; BALDANI, J. I. **Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

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

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univattatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, Aliso Viejo, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

GONZALEZ, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States American**, Washington, v. 79, n. 22, p. 6951-6955, 1982.

GONZALEZ, J. M.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**, New York, v. 11, n. 1, p. 28-38, 1984.

GORDON, R. E.; HAYVES, W. C.; PANG, C. H. N. **The Genus *Bacillus*.** Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture, 1973. 283 p. (Agriculture Handbook, n. 427).

GOVINDARAJAN, R.; JAYARAJ, S.; NARAYANAN, K. Mortality of the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (F.) when treated with *Bacillus thuringiensis* combinations with boric acid and insecticides. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 4, n. 3, p. 193-196, 1976.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue and hemorrhagic fever**. London: CAB International, 1997. p. 1-22.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/denguehemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. **Trends in Microbiology**, London, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 50, supl. 6, p. 50-60, 1994.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 169-179, 1996.

HABIB, M. E. M. **Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larva de Lepidoptera e Diptera**. 1982. 163 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

HABIB, M. E. M. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against some aquatic dipterous insects. **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 95, n. 4, p. 368-376, 1983.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HUGHES, P. A.; STEVENS, M. M.; PARK, H. W.; FEDERICI, B. A.; DENNIS, E. S.; AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, n. 1, p. 34-39, 2005.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, n. 6, p. 643-644, 1996.

KALMAN, S.; KIEHNE, K. L.; LIBS, J. L.; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 1131-1137, 1993.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, New York, v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

LECADET, M. M.; MARTOURET, D. Enzymatic hidrolisis of the crystal of *B. thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 9, n. 3, p. 322-330, 1967.

LEMOS, M. V. F.; SENA, J. A. D. Bioinseticida baseado no emprego de inclusões cristalinas de proteínas bioinseticidas, Patente n<sup>o</sup> PI0200228-0, 28 janeiro 2002. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/>>. Acesso em: 02 agosto 2007.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 37-70.

LERECLUS, D.; BOURGOIN, C. LECADET, M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-toxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R. A., SETLOW, P. (Ed.). **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology, 1989. p. 255-276.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and  $\delta$ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 225-229, 2002.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; JÚNIOR, A. N. R.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

LIMA, J. B. P.; PEREIRA-DA-CUNHA, M.; CARNEIRO-DA-SILVA JR., R.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, n. 2, p. 287-292, 1997.

LUNA, C. L.; LOPES, C. E.; MASSARANI, G. Recovery of *Bacillus sphaericus* 2362 spores from growth medium by flocculation/sedimentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 213-216, 2003.

LUNA, C. L.; SILVA, G. R.; RIOS, E. M. M. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 143-145, 2004.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 59-103.

MARMUR, J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 3, p. 208-218, 1961.

MARQUES, E. Q.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. p. 110-130.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A Ciência do DNA**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 576 p.

MITSUHASHI, M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 10, n. 5, p. 285-293, 1996.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p. 2395-2400, 1994.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1986. p. 127-170.

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, 1998. p. 815-843.

MORAIS, J. G. M. **Considerações críticas sobre os modelos de intervenção sobre o *Aedes aegypti***: perspectivas do plano de erradicação em PE. 1998. 42 f. Monografia (Programa de Residência em Medicina Preventiva e Social) - Universidade de Pernambuco, Recife, 1998.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 335-350, 1987.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.

NAYAR, J. K.; KNIGHT, J. W.; ALI, A.; CARLSON, D. B.; O'BRYAN, P. D. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* against two Florida mosquito species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 15, n. 1, p. 32-42, 1999.

OLIVEIRA, M. M. F. **Condicionantes sócio-ambientais urbanos da incidência da dengue na cidade de Londrina/PR**. 2006. 169 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

OUELLET, T.; SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 1003-1007, 1993.

PFANNENSTIEL, M. A.; COUCHE, G. A.; ROSS, E. J.; NICKERSON, K. W. Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 4, p. 644-649, 1986.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideu, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification de *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 419-432, 2003.

PRIMROSE, S. B.; TWYMAN, R. M. **Principles of gene manipulation and genomics**. Victoria: Blackwell publishing, 2006. p. 59-61.

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

REVINA, L. P.; KOSTINA, L. I.; GANUSHKINA, L. A.; MILKHAILOVA, A. L.; ZALUIN, I. A.; CHESTUKHINA, G. G. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to N- and C- moieties restores its original biological activity. **Biochemistry**, Washington, v. 69, n. 2, p. 181-187, 2004.

RIBEIRO, A. F.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C.; CONDINO, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.

RICHTER, A. R.; FUXA, J. R. Pathogen-pathogen and pathogen-insecticide interactions in velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, n. 6, p. 1559-1564, 1984.

RUAS-NETO, A. L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simúlideos no Rio Grande do Sul: susceptibilidade a campo. **Boletim da Saúde**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 21-26, 1984.

RUIZ, M. L.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. *In vivo* binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 73-79, 2004.

SALLES, J. F.; BALDANI, J. I. ***Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 31 p. (Documentos, 54)

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 999 p.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 393-404, 1988.

SCHEINERT, P.; KRAUSSE, R.; ULLMANN, U.; RAINER, S.; KRUPP, G. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 103-117, 1996.

SEBESTA, K.; HORSKA, K. Mechanisms of inhibition of DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 209, n. 2, p. 357-376, 1970.

SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; GUIMARÃES, V. P.; ELIAS, C. N.; LIMA, C. G. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. **Entomologia y Vectores**, Salta, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2002.

SINA, B. J.; AULTMAN, K. Resisting resistance. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 305-306, 2001.

SMITS, P.H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides. In: EVANS, H. F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Nottingham: Major Design & Production, 1997, p.21-28.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 731-763.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

STEVENS, M. M.; AKHURST, R. J.; CLIFTON, M. A.; HUGHES, P. A. Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 86, n. 3, p. 104-110, 2004.

TAUIL, P. L. Urbanization and dengue ecology. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, suppl. 17, p. 99-102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; GUERRA, Z.; BARRETO, M. L. Dengue in Brazil: situation-2001 and trends. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 26, p. 70-76, 2002.

TUN-LIN, W.; KAY, B. H.; BARNES, A. Understanding productivity, a key to *Aedes aegypti* surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 53, n. 6, p. 595-601, 1995.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microorganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 102-225.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 447-480.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus***. 2002. 102 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F.; SARIDAKIS, H. O.; LEMOS, M. V.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 255-259, 2000.

VISSER, B. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 58, n. 2-3, p. 121-124, 1989.

ZINIU, Y.; LONGSHENG, Y. Large-scale field evaluation of larvicidal preparation of *Bacillus thuringiensis* H-14 for mosquito control in town and rural environment in China. **Bulletin of the Society of Vector Ecologists**, Santa Ana, v. 15, n. 2, p. 189-195, 1990.

WIRTH, M. C.; FEDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1093-1097, 2000.

WONG, H. C.; SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 258, n. 3, p. 1960-1967, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Dengue haemorrhagic fever**: diagnosis, treatment, prevention and control. 2. ed. Geneva, 1997. 84 p. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>>. Acesso em: 02 agosto 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. Dengue prevention and control. In: World Health Assembly 55., 2002, Geneva. **Report by the Secretariat**. p. 1-3. Disponível em: <[http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA55/ea5519.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ea5519.pdf)>. Acesso em: 02 agosto 2007.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria** : from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

YOSHISUE, H.; FUKADA, T.; YOSHIDA, K. I.; SEN, K.; KUROSANA, S. I.; SAKAI, H.; KOMANO, T. Transcriptional regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquito larvicidal crystal protein gene *cryIVA*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 9, p. 2750-2753, 1993a.

YOSHISUE, H.; NISHIMOTO, T.; SAKAI, H.; KOMANO, T. Identification of a promoter for the crystal protein-encoding gene *cryIVB* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Gene**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 247-251, 1993b.

YOSHISUE, H.; SAKAI, H.; SEN, K.; YAMAGIWA, M.; KOMANO, T. Identification of a second transcriptional start site for the insecticidal protein gene *cryIVA* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Gene**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 251-255, 1997.