

AVALIAÇÃO NEMATICIDA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE CRY 11Aa DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAESENSIS*, EXPRESSA EM *ESCHERICHIA COLI*, CONTRA LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM OVINOS

ANA PAULA DE SOUZA STORI DE LARA¹; ANA MUNÕZ VIANNA²;
FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS³; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴

¹Programa de Pós-graduação em Parasitologia-UFPel – ana.paula.central@hotmail.com

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia-UFPel – a.munozvianna@gmail.com

³Programa de Pós-graduação em Veterinária-UFPel – denis.santos195@gmail.com

⁴Docente do Núcleo de Biotecnologia-UFPel – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses gastrintestinais constituem um obstáculo ao desenvolvimento da ovinocultura mundial, representados por perdas na produção, principalmente devido a infecção por *Haemonchus contortus*, nematódeo pertencente à família *Trichostrongylidae* (O'CONNOR et al., 2006). A fêmea adulta da espécie produz um grande número de ovos, que são excretados nas fezes. Os ovos eclodem no pasto e continuam a desenvolver-se sob condições de umidade para larvas de terceiro estágio (L3s), que são então ingerida pelo animal hospedeiro adequado estabelecendo-se em vermes adultos (NIKOLAOU; GASSER, 2006). Os vermes adultos se alimentam de sangue levando o hospedeiro a anemia severa, edemas, diarreia e até mesmo a morte (GASSER et al., 2008). Controle de parasitas é baseada quase inteiramente sobre a administração de compostos químicos anti-helmínticos. Infelizmente, um dos problemas gerados pelo uso massivo e indiscriminado de produtos anti-helmínticos é o aumento da resistência a essas drogas, e esta situação tem consequências enormes nos países em que a produção de ovinos é uma das principais atividades econômicas (VANWYK et al., 1999; CEZAR et al., 2010).

Uma alternativa possível para minimizar essa série de problemas que o tratamento convencional de nematódeos gastrintestinais traz é a aplicação de bactérias nematopatogênicas utilizadas como controle biológico. *Bacillus thuringiensis* que é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, tem sido amplamente utilizado para o controle biológico de insetos e nematódeos (BRAVO et al., 2011; HU e AROIAN, 2012).

Dados promissores preliminares, com relação ao controle de *Haemonchus* spp. em ovinos, foram reportados pelo nosso grupo de pesquisa. Recentemente nosso grupo demonstrou poder nematicida do *Bacillus circulans* sobre larvas de *Haemonchus* spp. e larvas de terceiro instar de *Culex quinquefasciatus*. Em experimentos *in vitro*, houve redução do número de larvas de *Haemonchus* spp., chegando a um percentual de 83,3% de redução larval, em coproculturas utilizando *Bacillus circulans*, 80,6% com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, 76,95% com *Bacillus thuringiensis* var. *oswaldocruzi* e 65,7% com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (SINOTT, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação nematicida da proteína recombinante Cry11Aa expressa em *E. coli*, quando administrada a ovinos naturalmente infectados com parasitos gastrintestinal de ruminantes.

2. METODOLOGIA

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Coleção de microrganismos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas) foi recuperado em meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração - Acumedia) e incubado a 28 °C, subcultivado em *Erlenmeyer* de 1000mL de capacidade volumétrica contendo 200mL de meio NYSM (caldo nutritivo com extrato de levedura e sais), (YOUSTEN, 1940), incubada em agitador orbital a 28 °C a 150rpm por 72h, até atingir completa esporulação.

E. coli BL21 (DE3) C43 (Bacterioteca do CDTec, UFPel), transformada com pAE-*cry11Aa* foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) na presença de ampicilina (100µg mL⁻¹) a 37 °C durante 16h. Um cultivo de 5mL foi utilizado para inocular 500mL do mesmo meio e cultivada sob as mesmas condições até atingir uma O.D_{600nm}=0.6-0.7. A indução da proteína recombinante Cry11Aa foi induzida pela adição de 0,3 nM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside - Uniscience) por 3h a 37 °C. Uma alíquota foi armazenada sob refrigeração à 4 °C para ser utilizado nos ensaios.

Fezes de cordeiros da raça Corriedale naturalmente infectados com parasitas gastrintestinais foram coletadas diretamente da ampola retal. O número de ovos *H. contortus* foi determinado utilizando a técnica de OPG segundo Gordon; Whitlock (1939). Apenas cordeiros que continham mais de 1000 OPG foram usadas neste estudo sendo selecionados 9 ovinos, separados em três grupos de 3 animais cada.

Cada ovino recebeu via oral uma suspensão bacteriana num volume de 30 mL contendo 10⁸UFC/mL, sendo que no grupo 1 foi administrada a bactéria *E. coli* não transformada (grupo controle), grupo 2 a bactéria *Bti* e o grupo 3 recebeu *E. coli* recombinante expressando a proteína Cry11Aa. Doze horas após a administração dos tratamentos, fezes foram coletadas e submetidas a coproculturas utilizando a técnica de Roberts e O'Sullivan (1950). Pools de fezes de cada grupo foram separados em 4 g por recipiente e repetido três vezes. Os recipientes foram incubados durante 7 dias a 28 °C (60% de umidade). As larvas (L2/L3) foram colhidas no 7º dia e a contagem realizada em um microscópio de ampliação de 40 × (Olympus, modelo CX21).

Para a análise estatística o percentual do total de redução larval foi determinado pela fórmula: $R = 100 (1 - T / C)$, onde *R* é a redução (efeito larvicida), *C* é o número de larvas contadas no grupo controle, e *T* é o número de larvas contadas nos grupos tratamentos (Coles et al., 1992). E estes resultados foram analisados por análise de variância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste realizado com *Bti* e a proteína recombinante Cry11Aa expressa em *E. coli* demonstraram uma redução larval ($p < 0,01$), quando administrados a ovinos naturalmente infectados com *H. contortus*, demonstrando que após 12 horas, a bactéria ainda se encontra viável nas fezes, sendo capaz de reduzir a população de parasitos em sua fase de vida livre. A proteína Cry11Aa expressa em *E. coli* apresenta o maior efeito larvicida, atingindo uma redução significativa 90% das larvas quando em comparação com o grupo controle. A proteína recombinante também apresentou uma significância estatística ($p < 0,05$) quando comparado com *Bti* conforme demonstra a Figura 1.

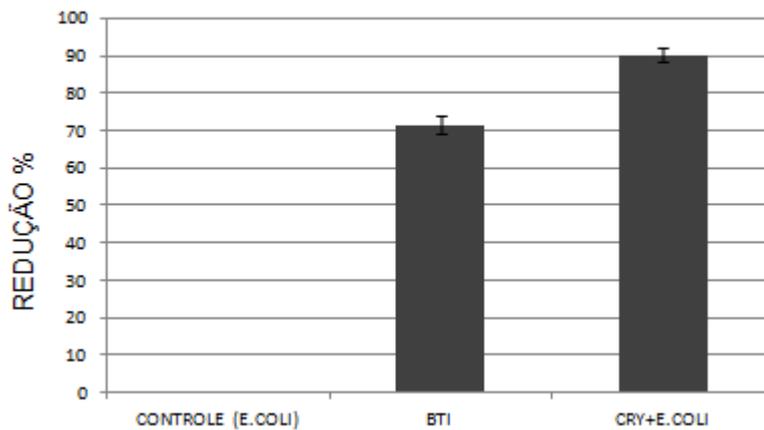


Figura 1. Redução Larval. Os dados representam a média de redução larval (%) presentes nas coproculturas realizadas 12 h após administração das bactérias aos ovinos, sendo que a proteína recombinante Cry11Aa expressa em *E. coli* teve uma redução de 90% e Bti obteve uma redução de 71%.

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que a proteína recombinante Cry11Aa expressa em *E. coli* possui efeito nematicida para larvas de *Heamonchus contortus*. A ação da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle biológico deve-se a presença de proteínas Cry que são sintetizadas durante a esporulação na periferia dos esporos sobre a forma de pró-toxinas. A cepa de *Bti* sintetiza mais de uma proteína Cry no momento da esporulação. Em nosso estudo, observamos que o uso de *E. coli* como hospedeiro de expressão permitiu a produção seletiva da proteína Cry11Aa, onde obtemos um maior efeito na redução de larvas, atribuindo o efeito a esta toxina.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo, sugerem que a proteína recombinante Cry 11Aa expressa em *E. coli*, é uma alternativa viável no controle biológico, apresentando um potencial nematicida, podendo ser utilizado como parte no controle integrado de nematódeos em ovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBÉRON, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, p.423–431, 2011.

CEZAR, A.S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; RIBAS, H.O.; VOGEL, F.S. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.173, n.1-2, p.157–160, 2010.

GASSER, R.B.; BOTT, N.J.; CHILTON, N.B.; HUNT, P.; BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock-biomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v.26, p.325–334, 2008.

GORDON H. M.; WHITLOCK H. V. Uma nova técnica para a contagem de ovos de nematóides nas fezes de ovelha. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.12, p. 50-52, 1939.

HU, Y.; AROIAN, R.V. Bacterial pore-forming proteins as anthelmintics. **Invertebrate Neuroscience**, v.12, p.37–41, 2012.

NIKOLAOU, S.; GASSER, R.B. Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.36, p,859–868, 2006.

O'CONNOR, L.J; WALKDEN-BROWN, S.W; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.1-2, p.1–15, 2006.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, S.P. Métodos para contagem de ovos e culturas das larvas de estrongilídeos infestam o trato gastrointestinal de animais. **Australian Journal of Agricultural Research**, p.99-102, 1950.

SINOTT, M.C.; FILHO, N.A.C.; CASTRO, L.L.D.; LORENZON, L.B.; PINTO, N.B.; CAPELLA, G.A.; LEITE, F.P.L. *Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental Parasitology**, v.132, p. 103-108, 2012.

VANWYK, J.A.; STENSON, M.O.; VANDERMERWE, J.S.; VOSTER, R.J.; VILJOEN, P.G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, n.4, p,273–284, 1999.

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