



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS-CESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E
SAÚDE-PPGBAS**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA,
CULICIDAE) POR TOXINAS DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER
1911) DE BIOMAS MARANHENSES**

JULIETE LIMA VIANA

**Caxias/MA
2017**

JULIETE LIMA VIANA

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE) POR TOXINAS DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DE BIOMAS MARANHENSES

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Estudos Superiores de Caxias, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora: Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Coorientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

**Caxias/MA
2017**

V614a Viana, Juliete Lima

Alterações histopatológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, culicidae) por toxinas de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) de biomas maranhenses / Juliete Lima Viana. __Caxias-MA: UEMA, 2017.

55f.

Orientador: Prof^a. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

1. Vetor. 2. Controle biológico. 3. Bactéria entomopatogênica. 4. Histologia. I. Viana, Juliete Lima. II. Título.

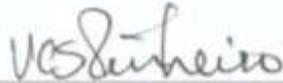
CDU 57.858.77:616.988

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA,
CULICIDAE) POR TOXINAS DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER
1911) DE BIOMAS MARANHENSES**

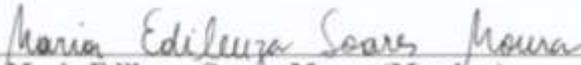
JULIETE LIMA VIANA

APROVADO EM: 07/08/2017

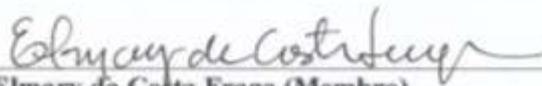
BANCA EXAMINADORA



Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Entomologia)
Universidade Estadual do Maranhão



Dra. Maria Edileuza Soares Moura (Membro)
Doutora em Medicina Tropical e Saúde Pública
Universidade Estadual do Maranhão



Dr. Elmary da Costa Fraga (Membro)
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão

Caxias/MA

2017

A Deus todo poderoso e a minha família, em especial, a minha mãe Maria de Jesus e ao meu pai Francisco, verdadeiros tesouros da minha vida, honestidade, trabalho, que com muito amor e carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, a minha irmã Julielma, a minha avó Lucila e a minha sobrinha linda Izabelly Sophia pelo amor, incentivo e carinho. Amo vocês!!!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado dons e tudo mais o suficiente para que eu pudesse chegar a este estágio. Sei que tudo posso naquele que me fortalece;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde, e ao corpo docente pela contribuição na minha formação profissional;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento dos projetos que são executados no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM.

À Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro pela orientação, confiança, oportunidade e pela relevante contribuição para a realização deste trabalho;

Ao meu coorientador Dr. Wanderli Pedro Tadei contribuição para a realização deste trabalho;

À Profa. Ma. Joelma Soares da Silva pela orientação, confiança, ensinamentos e apoio;

À Dra. Maria Cleoneide da Silva pela contribuição para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pesquisador da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, unidade da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) por ter contribuído para a realização deste trabalho cedendo ao LABEM as estirpes padrão;

Ao Laboratório de Ultraestrutura no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fiocruz Pernambuco) pela oportunidade de estágio e colaboração no projeto;

Ao Dra. Christina Alves Peixoto pela oportunidade para concluir etapas do experimento;

Ao Dr. Fábio Camargo Abdalla, Dra. Caroline Dantas Oliveira e a Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha pela excelente contribuição para a realização deste trabalho;

Aos meus pais (Francisco Mota Viana e Maria de Jesus Pereira Lima), pelos ensinamentos, amor, carinho e compreensão. Mãe, seu cuidado e dedicação deram em alguns momentos a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada;

À minha querida e amada avó Lucila Pereira de Melo pelo amor que sempre me dedicou, por ter acreditado em mim e me proporcionado à chance de realizar os meus sonhos;

À minha amada irmã Julielma Lima Viana, a minha fonte de forças nesta longa trajetória devida, permanecendo sempre presente na partilha de minhas conquistas e frustrações;

A minha sobrinha linda Izabelly Sophia. Te amo minha pequena menina dos olhos de Deus;

Aos meus familiares que amo muito (tia Edite e tio Oliveira, aos meus primos: Elenilda, Edilene, Elenice, Antônio, Thiago e Eduardo e meus sobrinhos);

À Eduarda, Suellen, Gabi, Sura Wanessa e Nádia;

Aos meus amigos Maxcilene, Maria dos Remédios, Carmem, Gracione, Graciane e Maria de Jesus pela amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza;

Aos colegas do Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) pelo apoio e companheirismo, em especial a Katiane, Aylane, Rachel, Janaína, Bruna, Silmara, Jéssica, Carine e Suely;

Aos colegas de curso da turma de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pelo apoio e companheirismo;

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*O poder de acreditar em si mesmo.
Esse vai ser o poder que vai mudar o
destino.*

Naruto Shippuuden

RESUMO

A busca por alternativas mais seguras no controle do *Aedes aegypti*, um importante vetor de diversos agentes etiológicos, que causam doenças como a dengue, febre amarela urbana, febre chikungunya e a febre zika, tornou-se uma crescente preocupação para a saúde pública. Os bioinseticidas são alternativas viáveis e eficazes para o controle de vetores, pois são inócuos ao homem e ao meio ambiente. Dentre os entomopatógenos, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), utilizada no controle biológico devido à presença de cristais proteicos com atividade inseticida, também denominados de δ -endotoxinas, sintetizados durante o processo de esporulação. O presente estudo objetivou investigar a presença de genes codificadores das toxinas mosquitocidas e avaliar os efeitos de linhagens tóxicas de *B. thuringiensis* no epitélio intestinal de larvas de *A. aegypti*. Foram utilizados 12 isolados de *Bt* provenientes dos biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga e do Ecossistema Restinga do estado do Maranhão, que foram submetidos à técnica de PCR com iniciadores gerais (*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry24*, *cry32*, *cyt1*, *cyt2*) e específicos (*cry1Ab* e *cry44Aa*) para verificar a presença de genes mosquitocidas, e a técnica de SDS-PAGE 12% para verificar o conteúdo proteico. Os efeitos tóxicos de *Bt* foram evidenciados por meio das alterações ultraestruturais pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). Na caracterização molecular, identificou-se a presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry32*, *cyt1*, *cyt2* e *cry1Ab*, e ausência dos genes *cry24* e *cry44Aa*. Os genes *cry1* e *cry2* foram detectados em apenas um isolado, já o gene *cry4* foi detectado em oito dos 12 isolados testados. Em relação ao gene *cry10* e *cry11* amplificaram em cinco e quatro isolados de *Bt*, respectivamente. Foi detectado a presença do gene *cry32* em sete linhagens de *Bt*. Os genes *cyt1* e *cyt2* mostraram produto de amplificação para oito e dois isolados, respectivamente, e o gene *cry1Ab* amplificou para apenas dois isolados. A caracterização proteica dos isolados apresentaram massa molecular com variações de 65 a 150 kDa que corresponde ao perfil proteico das toxinas Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11 e Cry32 e menor que 50 kDa semelhante ao das toxinas Cyt1 e Cyt2. A ação das toxinas de *Bt* no epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti* ocasionaram degeneração celular, extravasamento das vesículas no espaço entre o lúmen e o epitélio e a presença de vacúolos digestivos. Portanto, foi possível verificar que os isolados de *B. thuringiensis* nativos possuem genes que codificam toxinas díptero-específicas e diferentes perfis proteicos com alto potencial para serem utilizados no controle biológico do *A. aegypti*. Isso demonstra que o estudo de caracterização molecular e proteica possibilitaram conhecer o potencial dos isolados do Maranhão, e as alterações histopatológicas mostraram-se essenciais para confirmar e agregar novas evidências aos mecanismos de toxicidade de *B. thuringiensis* (*Bt*).

Palavras-chave: Vetor. Controle biológico. Bactéria entomopatogênica. Histologia.

ABSTRACT

The search for safer alternatives in the control of *Aedes aegypti*, an important vector of various etiologic agents that cause diseases such as dengue fever, urban yellow fever, chikungunya fever and zika fever, has become a growing concern for public health. Bioinsecticides are viable and effective alternatives for the control of vectors, because they are innocuous to man and to the environment. Among the entomopathogens, the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), used in biological control due to the presence of protein crystals with insecticidal activity, also known as δ -endotoxins, synthesized during the sporulation process, stands out. The present study aimed to investigate the presence of encoding genes of mosquito toxins and to evaluate the effects of toxic strains of *B. thuringiensis* on the intestinal epithelium of *A. aegypti* larvae. Twelve isolates of *Bt* from the Amazonia, Cerrado and Caatinga biomes and from the Restinga Ecosystem of the state of Maranhão were used, which were submitted to the PCR technique with general (*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry24*, *cry32*, *cyt1*, *cyt2*) and specific (*cry1Ab* and *cry44Aa*) primers to check the presence of mosquito genes, and the 12% SDS-PAGE technique to check the protein content. The toxic effects of *Bt* were evidenced through ultrastructural alterations by the hematoxylin and eosin (HE) technique. In the molecular characterization, the presence of the genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry32*, *cyt1*, *cyt2* and *cry1Ab*, and absence of *cry24* and *cry44Aa* genes were identified. The *cry1* and *cry2* genes were detected in only one isolate, and the *cry4* gene was detected in eight of the 12 isolates tested. In relation to the *cry10* and *cry11* gene amplified in five and four *Bt* isolates, respectively. The presence of the *cry32* gene was detected in seven *Bt* lineages. The *cyt1* and *cyt2* genes showed amplification product for eight and two isolates, respectively, and the *cry1Ab* gene amplified to only two isolates. The protein characterization of the isolates presented molecular mass ranging from 65 to 150 kDa corresponding to the protein profile of the toxins Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11 and Cry32 and less than 50 kDa similar to the toxins Cyt1 and Cyt2. The action of *Bt* toxins on the intestinal epithelium of *A. aegypti* larvae caused cell degeneration, vesicles extravasation in the space between the lumen and the epithelium and the presence of digestive vacuoles. Therefore, it was possible to verify that the native *B. thuringiensis* isolates have genes that encoding diptera-specific toxins and different protein profiles with high potential for use in the biological control of *A. aegypti*. This demonstrates that the study of molecular and protein characterization made it possible to know the potential of isolates from Maranhão, and histopathological changes were essential to confirm and add new evidence to the mechanisms of toxicity of *B. thuringiensis* (*Bt*).

Keywords: Vector. Biological control. Entomopathogenic bacteria. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Produto da amplificação dos genes *cry1*, *cry2* e *cry4* em isolados de *Bacillus thuringiensis*; MM: Marcador molecular (1Kb DNA Ladder), CP1: *Bta* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *azawai* (controle positivo); CP2: *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (controle positivo); CP3: *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo); CN - controle negativo..... 30
- Figura 2. Produto da amplificação dos genes *cry10* e *cry11* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: Marcador molecular (1Kb DNA Ladder), *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo), CN - controle negativo..... 30
- Figura 3. Produto da amplificação do gene *cry32* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: Marcador molecular (1Kb DNA Ladder), *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* (controle positivo), CN - controle negativo 31
- Figura 4. Produto da amplificação dos genes *cyt1* e *cyt2* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: Marcador molecular (1Kb DNA Ladder), *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo), CN - controle negativo..... 31
- Figura 5. Produto da amplificação do gene *cry1Ab* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: Marcador molecular (1Kb DNA Ladder), *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (controle positivo), CN - controle negativo 31
- Figura 6. Perfil proteico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com ação larvicida para *Aedes aegypti*. MM: Marcador molecular; *Bta* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *azawai*; *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* 32
- Figura 7. Fotomicrografia do intestino mediano de larvas de 3º ínstar de *Aedes aegypti*, coradas com HE. A- Controle positivo: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. B- Controle negativo..... 33
- Figura 8. A, B e C: Alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com a bactéria *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-179. A e B- Fotomicrografias com 6 horas de exposição a bactéria. C- Fotomicrografias com 24 horas de exposição a bactéria..... 34
- Figura 9. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-229. A- Seções histológicas da

região anterior da larva de *Aedes aegypti*. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com evidente desorganização celular34

Figura 10. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-237. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição ao Bt. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo35

Figura 11. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-401. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo36

Figura 12. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-459. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo36

Figura 13. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-559. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição ao bacilo. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição bacteriana36

Figura 14. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-686. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo37

Figura 15. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-686. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo37

Figura 16. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-755. A- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo37

Figura 17. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-761. A- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores gerais dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado24
- Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores específicos dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado25
- Tabela 3. Conteúdo gênico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* caracterizados por PCR. 29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
BBENMA	Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
BtMA	<i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão
<i>Bty</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>yunnanensis</i>
CHIKV	Vírus chikungunya
<i>cry</i>	<i>crystal</i> (genes codificadores de proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)
Cry	Crystal (Proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)
<i>cyt</i>	<i>cytolytic</i> (genes codificadores de proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)
Cyt	Cytolytic (Proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da Dengue/sotiripos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GENBIMOL	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
HE	Hematoxilina e eosina
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MM	Marcador molecular
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
rpm	Rotação por Minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Dodecil Sulfato de Sódio Eletroforese em gel de poliacrilamida)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SVS	Dodecil sulfato de sódio
TBE 1 X	Tris/Borato/EDTA
TFP	Toxinas formadoras de esporos
Tris - HCl	Cloridrato de trizma
UFC	Unidade formadora de colônia
VIP	Proteínas inseticidas vegetativas
WHO	World Health Organization
<i>xg</i>	Força centrífuga relativa
ZIKV	Vírus Zika
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	16
1.2 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	17
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
1.4 δ -endotoxinas	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Seleção de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
3.2 Identificação de genes mosquitocidas	23
3.2.1 Extração do DNA	23
3.2.2 PCR para amplificação de genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> díptero-específicos	24
3.3 Caracterização proteica	26
3.4 Análises histopatológicas.....	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Identificação de genes mosquitocidas	29
4.2 Caracterização proteica	32
4.3 Análises histopatológicas.....	33
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L. 1762) é um importante vetor de diversos agentes etiológicos patogênicos ao homem, que causam doenças como dengue, febre amarela urbana, febre chikungunya e febre zika. É um mosquito antropofílico, doméstico, que possui atividade hematofágica diurna. É originário da África e foi descrito no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico. O vetor pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, subgênero *Stegomyia* e gênero *Aedes*, espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (CHRISTOPHERS, 1960; NELSON, 1986; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; TAUIL, 2002; KUMAR et al., 2011; VASCONCELOS, 2015).

Esse vetor é considerado um mosquito cosmopolita, encontrado nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes 45°N e 35°S ou dentro das faixas isotermais de 20°C (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Esse mosquito desenvolve-se por holometabolia, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Os ovos apresentam contorno alongado e fusiforme. A larva é constituída por cabeça, tórax e abdômen. A pupa não se alimenta, sendo dividida em cefalotórax e abdômen, e é nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio pupal para o alado. O mosquito adulto é escuro com listras brancas no corpo e nas patas, e um desenho em forma de lira no mesonoto (COSTA, 2001; FORATTINI, 2002).

Devido às condições domiciliares ou peridomiciliares, melhores condições para reprodução, como sangue humano e criadouros com água, o *A. aegypti* adaptou-se a esses ambientes, o que favorece sua sobrevivência, e conseqüentemente aumento no número de casos de dengue, febre chikungunya e a febre zika (HADDOW et al., 1964; SILVA et al., 1999; LEPARC-GOFFART et al., 2014; WEAVER, 2014; HONÓRIO et al., 2015). A transmissão destas arboviroses ocorre quando a fêmea do *A. aegypti*, que necessitam de sangue para maturação dos ovos, contaminam-se ao picar uma pessoa infectada (WHITEHEAD et al., 2007; MAFRA; LEMOS, 2009; VALLE; PIMENTA, AGUIAR, 2016).

A dengue é uma doença de amplo aspecto clínico, causada por um vírus RNA de cadeia simples que compreende quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001; WHO, 2009; BRASIL/MS, 2013). No ano de 2016, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde notificou 1.500.535 casos prováveis de dengue no país (BRASIL/SVS/MS, 2017).

Os vírus zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) foram recentemente introduzidos no Brasil provavelmente no período da Copa do Mundo em 2014 (VASCONCELOS, 2015). O

Zika vírus é um *Flavivirus* da família Flaviviridae, isolado em 1947 na Uganda a partir de soro de macacos (DIALLO et al., 2014). A transmissão autóctone no país, da febre pelo Zika vírus foi confirmada a partir de abril de 2015. Em 2016, foram notificados 215.319 casos prováveis da doença no país (BRASIL/SVS/MS, 2017).

O vírus da febre chikungunya é originário da África, pertencente à família Togaviridae, gênero *Alphavirus* (TAUIL, 2014; DONALÍSIO; FREITAS, 2015). Em 2016, foram notificados 271.824 casos prováveis de febre chikungunya no Brasil (BRASIL/SVS/MS, 2017). Portanto, faz-se necessário a realização de estudos que visem o controle da população desses vetores, pois nenhuma destas arboviroses tem vacina disponível na rede pública de saúde para o controle dos agentes etiológicos, favorecendo uma maior necessidade de controlar os vetores de doenças.

1.2 Controle do *Aedes aegypti*

O controle do *A. aegypti* ainda constitui um grande problema para os órgãos de saúde pública em todo mundo, sendo realizado por meio da eliminação dos criadouros ou do uso de inseticidas químicos rotineiramente empregados no controle de adultos e larvas que vem sendo utilizados no controle da população de *A. aegypti* desde o início do século XX. Esses inseticidas dividem-se em três grupos: organoclorados, organofosforados e carbamatos e os piretroides que atuam no sistema nervoso central do inseto (GIANNINI, 2001; TAUIL, 2002; BRASIL/MS, 2010; BOYER et al., 2012).

O organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) tornou-se o inseticida químico mais utilizado do século XX, sendo eficaz no controle de mosquitos transmissores de doenças e pragas agrícolas (BECKER et al., 2010; COSTA, 2012).

Os organofosforados e carbamatos são inibidores seletivos da atividade da acetilcolinesterase, quando liberados podem contaminar o meio ambiente (GUILOSKI et al., 2010). Já os piretroides utilizados como inseticidas domésticos e agrícolas e em programas de saúde pública no combate a insetos vetores de doenças, surgiram como uma alternativa aos de maior toxicidade (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; COSTA, 2012).

O desenvolvimento de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas organofosforados, piretroides e outros compostos tóxicos, bem como seus efeitos de poluição ao meio ambiente, justificaram novas pesquisas para o uso de agentes biológicos no controle desse vetor (MACORIS et al., 1999; TAUIL, 2002; POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003; LIMA; MELO; VALLE, 2005).

O controle biológico visa reduzir populações de pragas e vetores de doenças por meio da utilização de agentes biológicos como patógenos, predadores, competidores ou

parasitos. O conhecimento da existência de inimigos naturais foi iniciado pelos chineses a 1.200 a.C. que utilizaram formigas contra ataques de lagartas desfolhadoras à plantações de citrus (BARBOSA, 2004; HEMINGWAY, 2005).

Os inimigos naturais podem ser definidos de acordo com seu modo de ação, na condição de predação ou de parasitismo. Este poderá ser classificado da seguinte forma: micro ou macroparasitismo, ou seja, se os agentes se reproduzem ou não no organismo do hospedeiro (FORATTINI, 2002).

Os agentes de controle biológico podem reduzir os efeitos nocivos do uso indiscriminado dos inseticidas químicos, favorecendo o meio ambiente e a saúde humana (SCOPEL; ROZA-GOMES, 2011).

Dentre os agentes de controle biológico, as bactérias entomopatogênicas formadoras de esporos possuem um grande potencial no controle de mosquitos vetores e insetos-pragas, dentre estas, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (BERLINER, 1911), pois apresenta propriedades inseticidas a insetos de várias ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Homoptera, Orthoptera, Mallophaga, Sarcostigophora e outros organismos, tais como, a nematóides e ácaros (FEITELSON, 1993; SCHNEPF et al., 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2007; COSTA et al., 2010; DORTA, 2014). Sua descoberta, principalmente da subespécie *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (Eubacteriales, Bacillaceae), possibilitou o desenvolvimento de um formulado comercializado em vários países do mundo para o controle de vetores de doenças (RAYMOND et al., 2010).

1.3 *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *B. thuringiensis* é um bastonete de 1 a 1,2µm, por 3 a 5µm, geralmente com motilidade, formadoras de esporos entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com esporângio não nitidamente estendido, gram-positiva, aeróbica, podendo também crescer facultativamente em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45°C (HABIB; ANDRADE, 1998). Foi descoberta pelo biólogo Shigetane Ishiwata no início do século XX no Japão a partir de larvas mortas de bicho-da-seda. Posteriormente, foi isolada de larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) por Berliner em 1911 na província de Thuringia na Alemanha (OCHOA; ARRIVILLAGA, 2009).

O *B. thuringiensis* ocorre em diversos ambientes: como solo, folhas de plantas e algumas vezes em micro habitats favoráveis como, por exemplo, dentro de insetos mortos pela ação desta bactéria. O número de células desta bactéria obtidas em isolamento pode variar entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo, enquanto em plantas, esse número varia entre 0 e 100 UFC/cm² por folha (DAMGAARD, 2000).

Em 1976 foi descoberta uma variedade de *B. thuringiensis*, a bactéria *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*), caracterizada pelo método do antígeno-H como sorovariedade H-14, com potencial tóxico para mosquitos vetores e insetos pragas (GOLDBERG; MARGALIT, 1977; de BARJAC, 1978). Produtos à base desta bactéria são comercializados, sob diferentes formulações, líquida ou granulada. A maioria desses formulados é composta de esporos viáveis e cristais tóxicos, visando aumentar sua atividade larvicida através da reciclagem bacteriana (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; BIZARRI et al., 2008; ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

A boa efetividade de *B. thuringiensis* incentiva estudos de isolamento desta bactéria em diversas regiões do mundo, e a ampla gama de substrato para a sua reprodução pode gerar variabilidade genética dessa bactéria em condições naturais (IRIARTE et al., 2000; MAEDA et al., 2000; VILAS-BÔAS, 2002; VALICENTE; LANA, 2008; TAN et al., 2009; ZHANG et al., 2010; BEN-DOV, 2014).

O *B. thuringiensis* produz várias toxinas com atividade inseticida como: α -exotoxinas, β -exotoxinas, quitinases (Chi), proteínas inseticidas vegetativas (VIP) e as δ -endotoxinas conhecidas como toxinas formadoras de esporos (TFP), e recebem esta denominação devido a sua localização intracelular do cristal proteico (VALADARES-INGLIS; SHILER; DE-SOUZA 1998; LIN; XIONG, 2004; PARKER; FEIL, 2005). Essas toxinas produzem diferentes formatos de cristais como: cuboide, bipiramidal, esférico, dentre outros (HABIB; ANDRADE, 1998).

1.4 δ -endotoxinas

Durante o processo de esporulação a bactéria *B. thuringiensis* produz cristais proteicos, que apresentam atividade entomopatogênica. O cristal proteico é formado por δ -endotoxinas, também conhecidas como proteínas Cry e Cyt (BRAVO et al., 2011). Na literatura são descritas 22 toxinas com ação entomopatogênica para o *A. aegypti*. As toxinas Cry são tóxicas para as ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera, já as Cyt apresentam toxicidade para insetos da ordem Diptera (PRAÇA, 2004; BRAVO; SOBERÓN, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009; BEN-DOV, 2014).

As proteínas Cry apresentam massa molecular entre 40 a 140 kDa, sendo codificadas por diferentes genes denominados genes *cry* (BRAVO, SOBERÓN, 2007). Desde o primeiro gene *cry* de *B. thuringiensis* clonado e sequenciado por Schnepf e Whiteley em 1981, o número de seqüências de novos genes tem crescido substancialmente (CRICKMORE et al., 1998; de MAAGD et al., 2001; LIMA, 2010; CRICKMORE et al., 2016).

As proteínas Cry tornam-se tóxicas aos insetos alvo quando são ingeridas pelas larvas. Após a ingestão das inclusões cristalinas ocorre a solubilização dos cristais proteicos em pH alcalino no intestino médio das larvas liberando peptídeos sem atividade inseticida que recebem o nome de protoxinas. Em seguida, as protoxinas são processadas pelas enzimas digestivas, as proteases protoxinas, principalmente as serina-proteases, tornando-se toxinas ativas. As toxinas reconhecem receptores específicos para cada uma delas no intestino médio das larvas, após o reconhecimento do receptor começa a formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal, provocando desequilíbrio iônico, aumentando a absorção de água, ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à paralisia e à morte (HOFMANN et al., 1988; HÖFTE; WHITELEY, 1989; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; FIUZA, 2009).

As toxinas Cyt apresentam proteínas de massa molecular de 27–30 kDa, que são codificadas pelos genes *cyt*. Diferente das toxinas Cry, as Cyt não se ligam aos receptores, mas se inserem diretamente na membrana celular, potencializando a ação inseticida das Cry (WARD; ELLAR; CHILCOTT, 1988; KONI; ELLAR, 1993; CRICKMORE et al., 1998; PÉREZ et al., 2005; SANTOS et al., 2012).

A bactéria *B. thuringiensis* é considerada a espécie de maior interesse no controle biológico de insetos (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). No que concerne ao controle de mosquitos, a subespécie *B. thuringiensis israelensis*, têm sido utilizada com muito sucesso há mais de trinta anos, e comercializada mundialmente para a fabricação de inseticidas usados no controle de vetores (BRAVO et al., 2011). No entanto, existe uma preocupação crescente do surgimento de populações de mosquitos resistentes às toxinas de *Bti* (CADAVID-RESTREPO; SAHAZA; ORDUZ, 2012).

Devido à boa efetividade de *Bt* no controle de vetores, diversos estudos no mundo são realizados para selecionar linhagens com ação para mosquitos (GOBATTO et al., 2010; OOTANI et al., 2011; CAMPANINI et al., 2012; SOARES-DA-SILVA et al., 2015). No entanto, os trabalhos de seleção de linhagens de *Bt* para mosquitos são iniciados com a busca pelo complexo de proteínas Cry e Cyt, toxinas encontradas na cepa padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cy2Ba*) utilizada mundialmente no controle de insetos vetores (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; COSTA et al., 2010; CANTÓN et al., 2011; CRICKMORE et al., 2016). Contudo, além desses genes existem também outros codificadores de toxinas com ação inseticida para larvas de mosquitos, especificamente para *A. aegypti* (*cry1Ab*, *cry1Ca*, *cry11Bb*, *cry16Aa*, *cry20Aa*, *cry24Ca*, *cry30Fa*, *cry32Ba*, *cry32Ca*, *cry32Da*, *cry44Aa*, *cry54Aa*, *cyt2Ba* e *cyt2Bc*)

(FATORETTO, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009; AHMAD; SHAKOORI, 2013; HANUR et al., 2015; CRICKMORE et al., 2016).

Estudos vêm demonstrando a existência de isolados nativos de *Bt* que não apresentam toxinas de *Bti* (LOBO, 2015; SOARES-DA-SILVA et al., 2015), porém mostram excelente ação inseticida em larvas de *A. aegypti* por meio de bioensaios. Esses dados reforçam a necessidade de investigar a presença de outros genes que já tenham sido descritos como codificadores de proteínas inseticidas, que causam mortalidade às larvas de mosquitos, para aumentar os números de toxinas disponíveis que possam ser utilizadas no controle do *A. aegypti*. O que poderá elucidar os danos ocasionados no epitélio intestinal pela ação dos isolados de *B. thuringiensis* com alta toxicidade contra larvas de *A. aegypti*.

A presença dos genes é uma forma de prever a atividade inseticida de um isolado, no entanto, a toxicidade de cada isolado de *Bt* precisa ser evidenciada também pela expressão das proteínas e capacidade de interação com o epitélio intestinal de larvas de *A. aegypti* (PORCAR; JUARÉZ-PÉREZ, 2003; OLIVEIRA et al., 2009; BRAVO et al., 2011).

Devido à complexidade da ação dessas toxinas contra mosquitos, é necessário, verificar se estas estão envolvidas no processo de sepse do bacilo no epitélio intestinal da larva. Este mecanismo de ação de *B. thuringiensis* é evidenciado por meio de análises histopatológicas, as quais podem contribuir com informações essenciais sobre os efeitos tóxicos ocasionados pela ação desta bactéria às larvas de *A. aegypti*. Estes estudos histopatológicos tem sido analisadas através da microscopia de luz, onde fornecem subsídios que comprovam o efeito tóxico da bactéria, sendo uma técnica de fácil aplicação e rapidez, e custos relativamente reduzidos (CAVADOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Portanto, essa pesquisa poderá fornecer dados importantes para subsidiar no futuro o desenvolvimento de bioinseticidas com maior toxicidade e menores chances do inseto tornar-se resistente, uma vez que muitos recursos são demandados na tentativa de combater mosquitos vetores de doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os efeitos de linhagens tóxicas de *B. thuringiensis* no epitélio intestinal de larvas de *A. aegypti* e investigar a presença de genes codificadores das toxinas mosquitocidas.

2.2 Específicos

- Caracterizar molecularmente toxinas Cry e Cyt presentes em isolados tóxicos de *B. thuringiensis*, mantidos no Banco de Bacilos entomopatogênicos do Maranhão – BBENMA;
- Analisar o conteúdo proteico de isolados de *B. thuringiensis* com atividade inseticida a *A. aegypti*;
- Visualizar danos do epitélio de larvas de *A. aegypti* tratados com isolados de *B. thuringiensis* do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis*

O Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão – BBENMA do Laboratório de Entomologia Médica-LABEM do CESC-UEMA dispõe atualmente de 1.448 isolados de *Bt* provenientes dos biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, e do ecossistema Restinga do estado do Maranhão. Foram testados seletivamente 680 isolados contra larvas de *A. aegypti*, destes 27 isolados apresentaram mortalidade de 100% das larvas em 24 horas, sendo que 12 não amplificaram genes de *Bti*.

Esses 12 isolados que não amplificaram genes de *Bti*, foram utilizados para investigação de diferentes combinações de toxinas inseticidas, com a utilização de iniciadores gerais e específicos para as famílias de genes mosquitocidas disponíveis na literatura (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; CRICKMORE et al., 2016). Nos isolados que mostraram positividade nas reações de PCR foram realizadas verificação do padrão de proteínas, e análises histopatológicas para entender o efeito das diferentes combinações de toxinas mosquitocidas encontradas nessas linhagens, no epitélio intestinal de larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti* utilizadas nos bioensaios.

3.2 Identificação de genes mosquitocidas

3.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídos utilizando a Matriz InstaGene (*Bio-Rad*), seguindo o protocolo do fabricante, os quais foram previamente cultivados em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (*Kasvi*), por 18 horas a 28°C em estufa bacteriológica. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1mL de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados a centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm a 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 100µL da Matriz instaGene (*Bio-Rad*) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 25 minutos, agitado rigorosamente em *Vortex Mixer (Vision Scientific)* por 10 segundos e logo depois, fervido a 100°C por 8 minutos. A amostra foi novamente agitada em *Vortex Mixer* por 10 segundos e centrifugada por 2,5 minutos a 12.000 rpm a 25°C. Finalmente, 100µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos estéreis, o qual foi quantificado para verificação da quantidade e qualidade do DNA com a utilização de espectrofotômetro L-Quant (*Loccus*) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do CESC-UEMA, e por fim, estocado em freezer a -18°C até o momento do uso.

3.2.2 PCR para amplificação de genes de *Bacillus thuringiensis* díptero-específicos

Inicialmente foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores gerais para identificação das famílias de genes codificadores de toxinas mosquitocidas: *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry24*, *cry32*, *cyt1* e *cyt2* (BRAVO et al., 1998; JOUZANI et al., 2008; EJIOFOR; JOHNSON, 2002; IBARRA et al., 2003; CRICKMORE et al., 2016) (Tabela 1). Posteriormente, os isolados foram submetidos a uma nova reação de PCR com iniciadores específicos: *cry1Ab* e *cry44Aa* (FATORETTO, 2007; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009) (Tabela 2).

Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores gerais dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado.

Genes iniciadores gerais	Sequências	Referências	Tam.* (pb)**	TA °C#
Subclasse Cry	<i>cry1</i> 5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3'(d) 5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'(r)	Bravo et al. (1998)	543-594	52
	<i>cry2</i> 5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'(d) 5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'(r)	Jouzani et al. (2008)	689-701	52
	<i>cry4</i> 5'-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3'(d) 5'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3'(r)	Jouzani et al. (2008)	439-459	50
	<i>cry10</i> 5'-TCAATGCTCCATCCAATG-3'(d) 5'-CTTGTATAGGCCTTCCTCCG-3'(r)	Jouzani et al. (2008)	348	51
	<i>cry11</i> 5'-TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC-3'(d) 5'-CATTTGTAAGTTGTAATCCC-3'(r)	Bravo et al. (1998)	305	51
	<i>cry24</i> 5'-TTATCAATGTAAAGGGATGC-3'(d) 5'-ACTGGATCTGTGTATATTTTCTAG-3'(r)	Ibarra et al. (2003)	304	52
	<i>cry32</i> 5'-TGGTCGGGAGAGAATGGATGGA-3'(d) 5'-ATGTTTGCGACACCATTTTC-3'(r)	Ibarra et al. (2003)	676-677	48
Subclasse Cyt	<i>cyt1</i> 5'-CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT-3'(d) 5'-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT-3'(r)	Ibarra et al. (2003)	477-480	52
	<i>cyt2</i> 5'-ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC-3'(d) 5'-TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC-3'(r)	Ibarra et al. (2003)	355-356	56

*tamanho; ** pares de bases; #temperatura de anelamento.

Tabela 2- Oligonucleotídeos iniciadores específicos dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado.

Genes iniciadores específicos		Sequências (5'-3')	Referências	Tam.* (pb)**	TA °C***
Subclasse Cry	<i>cry1Ab</i>	5'-CGGGATTAGAGCGTGTATG-3'(d) 5'-CATCCAGCGAATCTACCG-3'(r)	Fatoretto (2007)	~550	56
	<i>cry44Aa</i>	5'-CATTACACGGGGTTCGTTAT-3'(d) 5'-CCGCACTTACATGTGTCCAA-3'(r)	Vidal-Quist; Castañer; González-Cabrer, (2009)	444	60

*tamanho; **pares de bases; ***temperatura de anelamento.

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL com os seguintes reagentes: 2,5µL de Buffer, 2,5µL de dNTPs, 0,5µL de MgCl₂, 0,5µL de cada *primer*, 0,1µL de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 1µL de DNA e 4,9µL de água *milli-Q* para completar o volume final de 12,5µL.

Em todas as reações foram utilizadas cepas padrões (*Bta* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Bti* - *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*, *Bty* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis* e *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*) como controle positivo, cedida pelo professor Dr. Manoel Victor Franco Lemos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Unidade da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP). Como controle negativo a quantidade de DNA foi substituída por água *milli-Q*.

As ampliações dos genes foram realizadas em termociclador *Gencycler-G96G* (*Biosystems*), com programa otimizado de acordo com a temperatura de pareamento de cada iniciador. A reação de amplificação teve um passo inicial de desnaturação 94°C por 5 minuto, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento (temperatura de acordo com cada iniciador), polimerização de 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos, seguido de uma etapa de Hold a 4°C.

Posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% para visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR. Após a reação de amplificação foi retirado 5µL de cada amostra e adicionado a 3µL de tampão de corrida *Blue/Orange 6X Loading Dye* (*Promega*) contendo o corante *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (*Biotium*).

As amostras foram submetidas a um campo elétrico de 90V, conduzido em tampão TBE 1 X (Tris/Borato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese foi incluído 3µL de DNA *Ladder*® 1Kb (*Promega*), adicionado a 3µL do tampão de carregamento, como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados e como padrão de peso molecular. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em transiluminador e fotografados em aparelho *L. PIX* (*Loccus Biotecnologia*).

3.3 Caracterização proteica

Os isolados positivos caracterizados por meio da PCR foram analisados quanto ao conteúdo proteico do cristal para verificar quais proteínas inseticidas codificadas estão sendo expressas pelos genes *cry* e *cyt*. A caracterização proteica foi realizada mediante a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o detergente iônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 12%, em condições desnaturantes segundo Laemmli (1970).

A extração das proteínas foi realizada seguindo o protocolo de Lecadet et al. (1991), sendo que cada isolado foi plaqueado em ágar nutriente, após 24 horas de crescimento em estufa bacteriológica, uma colônia de cada isolado foi transferida para *Erlenmeyer* contendo 12mL de caldo nutriente e levados ao incubador rotativo (*SHAKER*), mantido a 28°C por 52 horas a 200 rpm.

Da cultura crescida de cada amostra foi retirada uma alíquota de 1,5µL contendo o complexo esporo/cristal, em seguida foi centrifugado a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, o pellet foi ressuscitado em 1,5mL de 0,5M NaCl em agitador *Vortex Mixer* e centrifugado novamente, a seguir o pellet foi ressuscitado em 1,5mL da solução para inibição da atividade proteásica (2mL de 100mM PMSF + 4mL do EDTA a 0,5M avolumado para 200mL), foi homogeneizada em *Vortex Mixer* e centrifugada novamente a 12000 xg por 15 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante, repetiu-se esse procedimento por duas vezes e, posteriormente, estocado em solução de inibição de atividade proteica a -20°C.

Para preparação de 50µL das amostras, foram adicionados 25µL da solução contendo as proteínas de *Bt* e 25µL de tampão de amostra (0,5M Tris-HCl pH 6,8; 25% de Glicerol; 1,0% de Azul de bromofenol; 10% de SDS e β-mercaptoetanol a 1%), e fervidas por 10 minutos a 100°C. De cada amostra foi retirado 40µL e aplicada em gel de poliacrilamida, e como padrão de massa molecular de proteína foi adicionado o marcador *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (*Promega*). Foram utilizadas cepas padrões como controle positivo, nas mesmas condições anteriormente descritas (LAEMMLI, 1970).

A eletroforese em gel de poliacrilamida consistiu em um gel composto por duas concentrações: um primeiro gel de malha mais fina a 5%, o concentrador, cuja função é de

compactar a amostra e o separador de 12% de acrilamida, cuja função é separar o complexo SDS-proteína em função da sua massa molecular. Esse gel foi preparado e colocado em cuba de eletroforese vertical (*Kasvi*) preenchida com tampão de corrida 1X (25mM Tris-BASE, 35mM SDS e 1,92mM Glicina) e submetido a um campo elétrico de 150V por 2:30 minutos.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de *Comassie Brillhante Blue* (metanol 50%, Ácido acético 10% e 0,1% de *Comassie Brillhante Blue* R-250) por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida foi descorado em solução de metanol e ácido acético 4:1 por 24 horas, até a visualização das bandas de proteínas que correspondem às toxinas presentes. O gel foi digitalizado e analisado quanto à presença das proteínas de ação inseticida de interesse, conforme descrição da literatura.

3.4 Análises histopatológicas

As análises histopatológicas das larvas de *A. aegypti* tratadas com *B. thuringiensis* foram realizadas de acordo com a metodologia de Oliveira et al. (2009). Para cada isolado, inicialmente foi realizado um bioensaio com 10 larvas de terceiro ínstar de *A. aegypti*, estas foram colocados separadamente em copos de 50mL contendo 10mL de água destilada e 1mL da solução esporo/cristal de cada isolado de *B. thuringiensis*.

Posteriormente, foram realizadas leituras nos intervalos de 6 e 24 horas após exposição à solução bacteriana para acompanhamento das alterações ultraestruturais. Como controle negativo, em cada bioensaio foi preparada uma réplica sem inoculação bacilar e como controle positivo foi utilizada a linhagem padrão *Bti* (*Bti*- *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* T14 001), nas mesmas condições dos isolados.

Os bioensaios foram realizados em triplicata, em condições controladas de temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa em torno de 80%, no LABEM-CESC/UEMA. Para as análises histopatológicas propriamente dita, as larvas vivas nos bioensaios foram recolhidas individualmente com auxílio de pipetas Pasteur e colocadas em microtubos esteréis de 1,5mL contendo uma solução fixativa de paraformaldeído a 4% (100mL de água destilada e 0,4g de paraformaldeído em pó), e armazenada à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Ultraestrutura no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fiocruz Pernambuco), onde foram processadas as análises de microscopia.

O material foi adicionado em cassetes plásticos para o processamento e mergulhados em álcool 70%, posteriormente, as amostras foram processadas em histotécnico (*OMA DM40*) durante 8 horas: desidratadas em etanol graduado (70% a 100%), diafanizados em xilol, incluídos em parafina 56-58°C. Após esse procedimento, as amostras foram emblocadas em parafina a 56-60°C (inclusor *Leica EG1120*). Foram obtidas secções de 4mm em micrótomo

(*Zeiss HYRAX M55*), coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), e montadas com Entellan. Em seguida, as amostras foram observadas e analisadas em microscópio de luz nos aumentos de 40X e 100X (*Leica LAS EZ*).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação de genes mosquitocidas

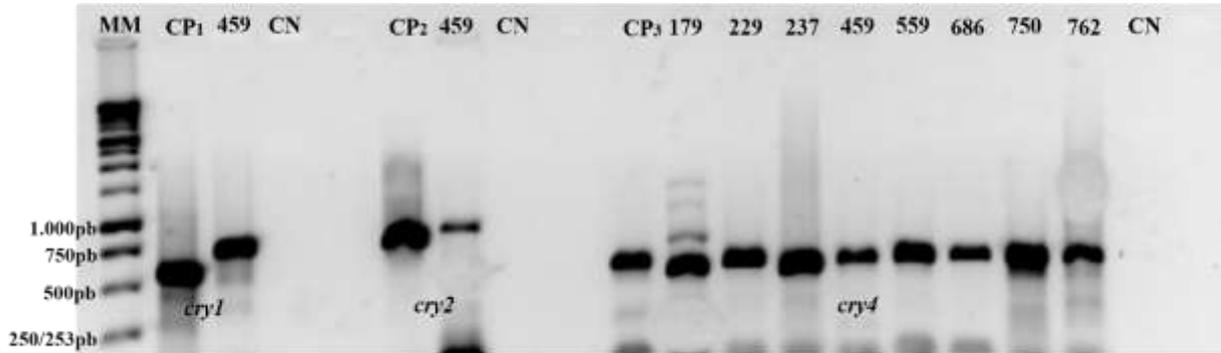
Dos 12 isolados analisados molecularmente, 10 amplificaram para dois ou mais genes estudados, apenas o BtMA-401 apresentou perfil isolado e a linhagem BtMA-764 não amplificou para nenhum dos genes pesquisados (Tabela 3). Os oligonucleotídeos *cry24* e *cry44Aa* utilizados não produziram fragmentos de tamanho esperado, indicando que as estirpes não possuem esses genes. O isolado BtMA-459 foi o único que apresentou o gene *cry1* e *cry2* comparados com os padrões *Bta* e *Btk*, respectivamente, e o gene *cry4* foi detectado em oito isolados, mais a estirpe padrão *Bti* (Figura 1).

Tabela 3. Conteúdo gênico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* caracterizados por PCR para genes gerais e específicos.

ISOLADOS	Oligonucleotídeos Gerais									Oligonucleotídeos Específicos	
	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry10</i>	<i>cry11</i>	<i>cry24</i>	<i>cry32</i>	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>cry44Aa</i>
<i>Bta</i> ¹	+										
<i>Btk</i> ²		+								+	
<i>Bti</i> ³			+	+	+			+	+		
<i>Bty</i> ⁴							+				
BtMA-179			+		+						
BtMA-229			+		+						
BtMA-237			+	+	+			+			
BtMA-401							+				
BtMA-459	+	+	+				+	+	+		
BtMA-559			+				+	+			
BtMA-686			+	+			+	+			
BtMA-750			+	+	+			+	+		
BtMA-755				+			+	+		+	
BtMA-761							+	+		+	
BtMA-762			+	+			+	+			
BtMA-764											

(+) presença do gene estudado. ¹*Bacillus thuringiensis* subsp. *azawai*; ²*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; ³*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; ⁴*Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*.

Figura 1. Produto da amplificação dos genes *cry1*, *cry2* e *cry4* em isolados de *Bacillus thuringiensis*; MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); CP1: *Bta* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *azawai* (controle positivo); CP2: *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (controle positivo); CP3: *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo); CN - controle negativo.



O gene *cry10* amplificou em cinco linhagens de *Bt* com fragmento de 348pb e o gene *cry11* amplificou para quatro linhagens apresentando 305pb (Figura 2). Esse resultado também foi obtido para *Bti*, usado como controle positivo. O gene *cry32* foi detectado em sete isolados de *Bt* e o controle positivo *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* (Figura 3). Oito linhagens de *Bt* apresentaram fragmentos de tamanho esperado para o gene *cyt1* e dois isolados para o gene *cyt2*, assim como a linhagem padrão *Bti* (Figura 4). Utilizando primer específico para a detecção do gene *cry1Ab*, também foram obtidos fragmentos de tamanho esperado, indicando a presença do gene nos isolados BtMA-755 e BtMA-761 e no controle positivo (Figura 5).

Figura 2. Produto da amplificação dos genes *cry10* e *cry11* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo); CN - controle negativo.

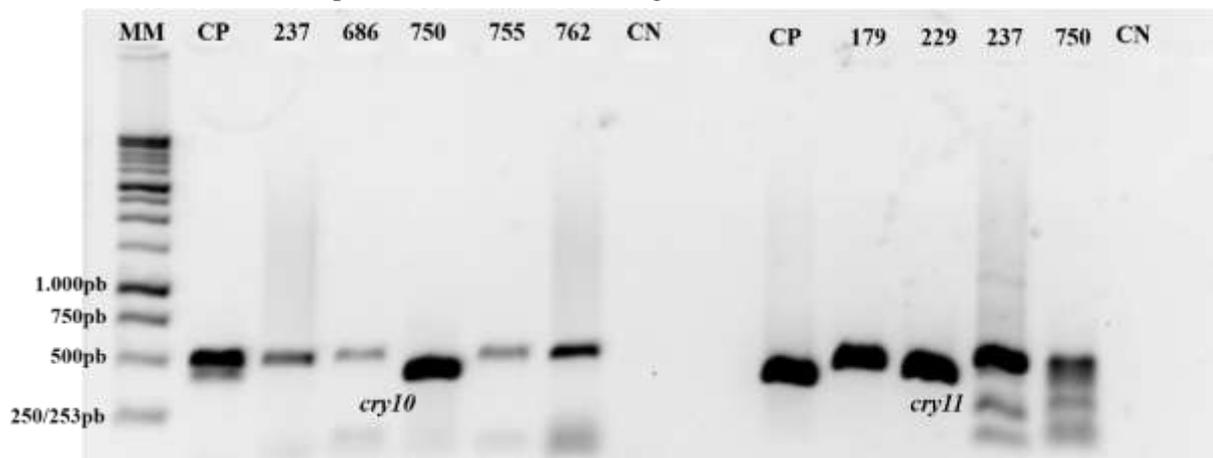


Figura 3. Produto da amplificação do gene *cry32* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* (controle positivo); CN - controle negativo.

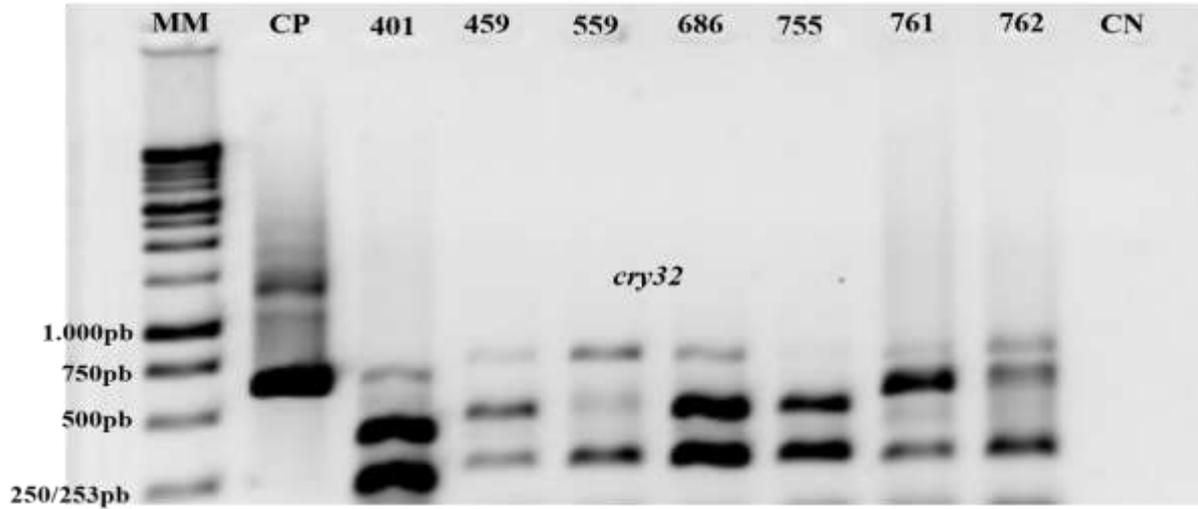


Figura 4. Produto da amplificação dos genes *cyt1* e *cyt2* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (controle positivo); CN - controle negativo.

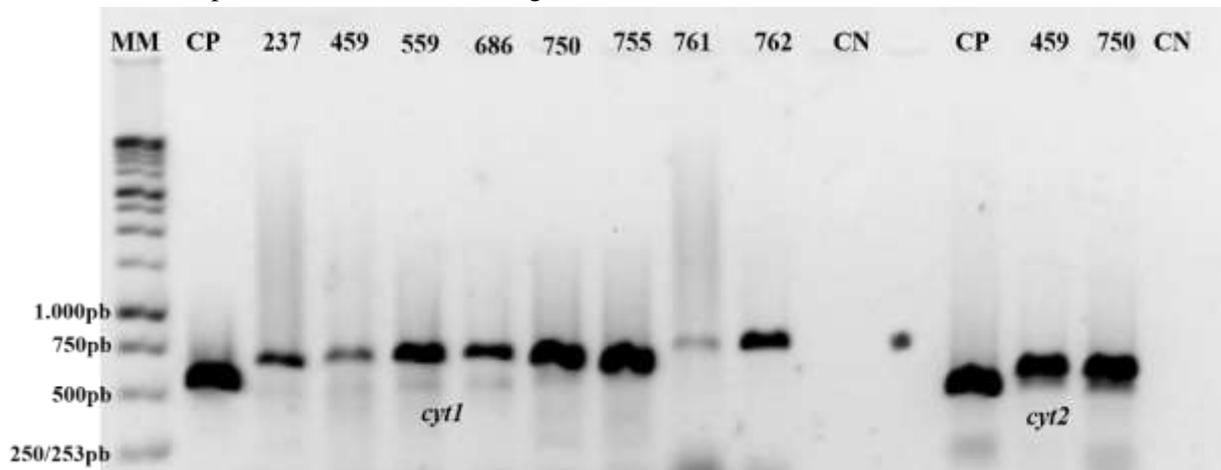
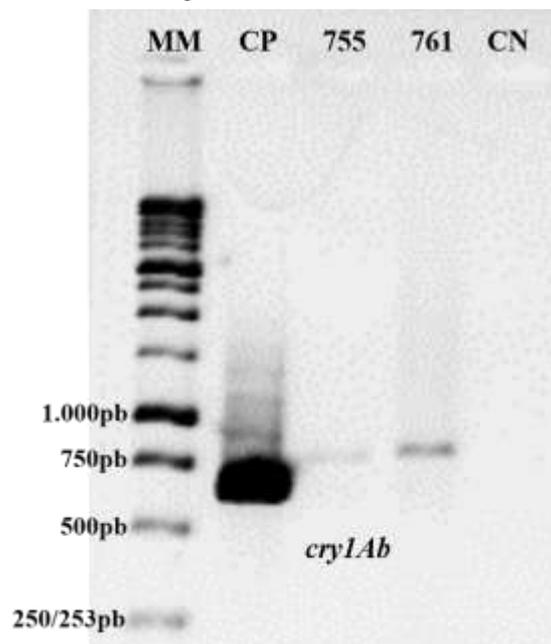


Figura 5. Produto da amplificação do gene *cry1Ab* em isolados de *Bacillus thuringiensis*. MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (controle positivo); CN - controle negativo.

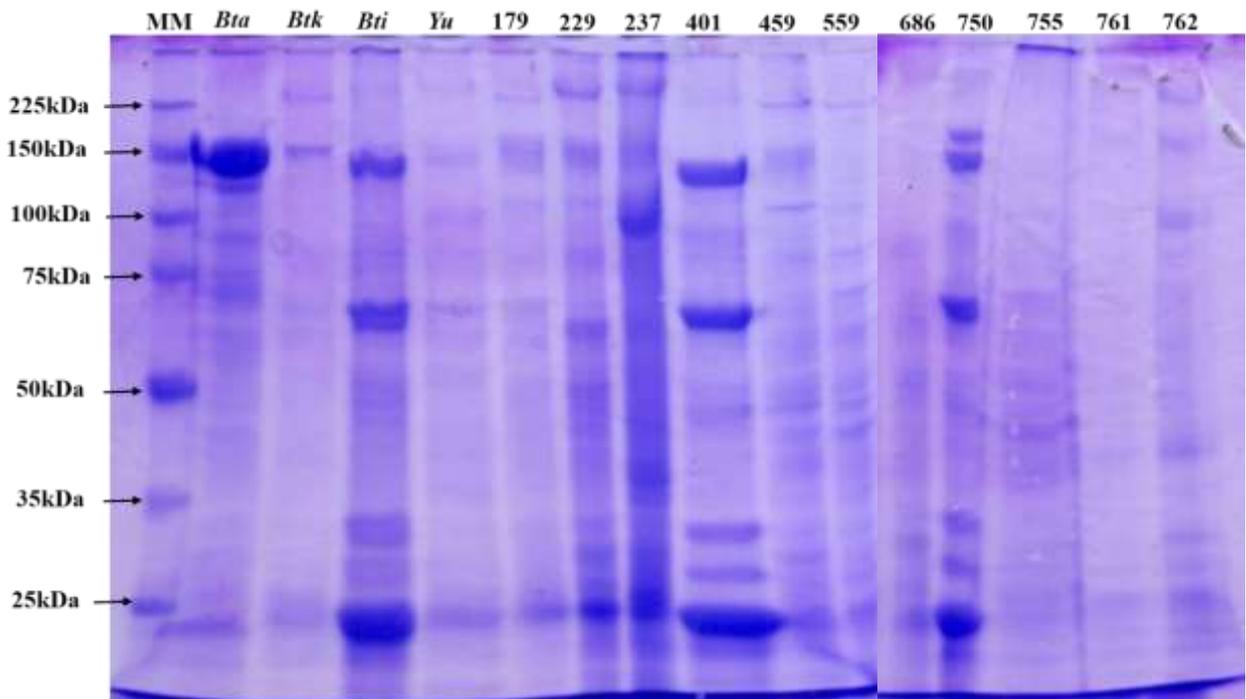


4.2 Caracterização proteica

A análise do perfil proteico dos isolados de *B. thuringiensis* pela técnica de SDS-PAGE 12%, demonstrou que estes expressaram proteínas com massas moleculares correspondentes as toxinas Cry e Cyt, no entanto, as linhagens BtMA-755 e BtMA-761 embora tenham sido identificados a presença de genes, não foi possível verificar o perfil proteico. Os demais isolados apresentaram proteínas de massa molecular de aproximadamente 65 a 150 kDa, que corresponde as proteínas Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11 e Cry32 (Figura 6).

Em relação a classe Cyt, os isolados BtMA-179, BtMA-229, BtMA-237, BtMA-401, BtMA-459, BtMA-559, BtMA-686, BtMA-750 e BtMA-762 apresentaram proteínas de massa molecular menor que 50 kDa semelhante ao das toxinas Cyt1 e Cyt2 (Figura 6).

Figura 6. Perfil proteico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com ação larvicida para *Aedes aegypti*. MM: marcador molecular (1Kb DNA Ladder); *Bta* – *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*; *Btk* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; *Bti* - *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; *Bty* - *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis*.



4.3 Análises histopatológicas

As observações dos 10 isolados de *B. thuringiensis* utilizados nas análises histopatológicas, mostraram que o epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti* apresentaram várias alterações ultraestruturais no grupo experimental. O controle positivo caracterizou-se por apresentar o epitélio intestinal desconectado e desordenado em 6 horas de aplicação do *Bti* (Figura 7A). Neste mesmo intervalo de tempo, no grupo controle negativo, o intestino médio ou mesêntero de larvas de 3º estágio de *A. aegypti* apresentou três partes distintas: anterior, mediana e posterior sem alterações celulares (Figura 7B). Com 6 horas de exposição ao BtMA-179, as células do intestino estavam separadas umas das outras deixando uns espaços entre as células e algumas células estavam vacuolizadas (Figura 8A e 8B). Com 24 horas de exposição ao *Bt*, o epitélio intestinal mostrou-se destruído e totalmente desorganizado (Figura 8C).

A figura 9A mostra o epitélio intestinal destruído com células desorganizadas pela ação do BtMA-229 com 6 horas de exposição a bactéria. Com 24 horas, as células do epitélio intestinal estavam desconectadas uma das outras e com vilosidades. As vesículas digestivas estavam presas no espaço entre o lúmen e as células do epitélio (Figura 9B).

As células do epitélio das larvas de *A. aegypti* no intervalo de 6 horas tratadas com o BtMA-237, apresentou-se sem forma definida e com evidente degeneração celular (Figura 10A). Com 24 de exposição ao bacilo, as células do epitélio estavam desorganizadas e desprendidas do tecido conjuntivo com vacúolos em volta do núcleo (Figura 10B).

Figura 7. Fotomicrografia do intestino de larvas de 3º ínstar de *Aedes aegypti*, coradas com HE. A- Controle positivo: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. B- Controle negativo.

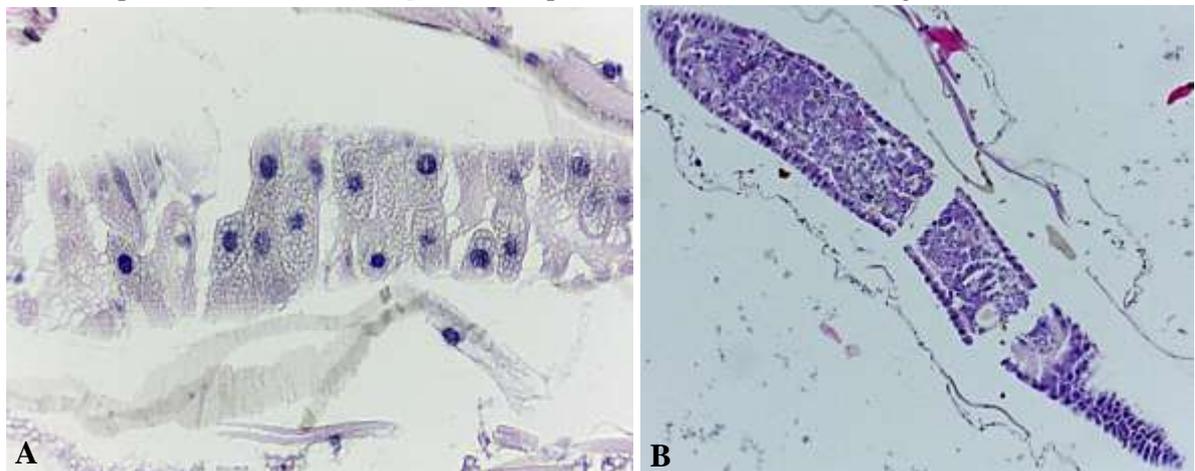


Figura 8. A, B e C: Alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com a bactéria *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-179. A e B- Fotomicrografias com 6 horas de exposição a bactéria. C- Fotomicrografias com 24 horas de exposição a bactéria.

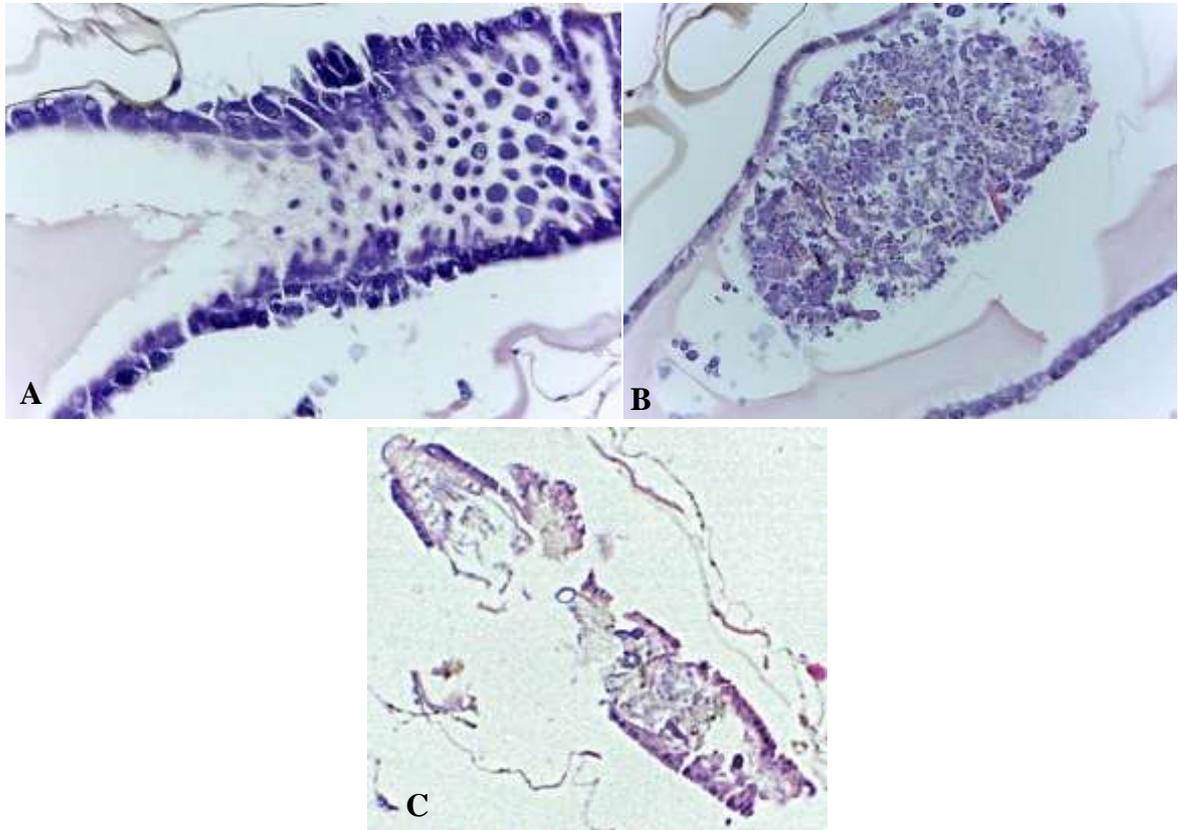


Figura 9. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-229. A- Seções histológicas da região anterior da larva de *Aedes aegypti*. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com evidente desorganização celular.

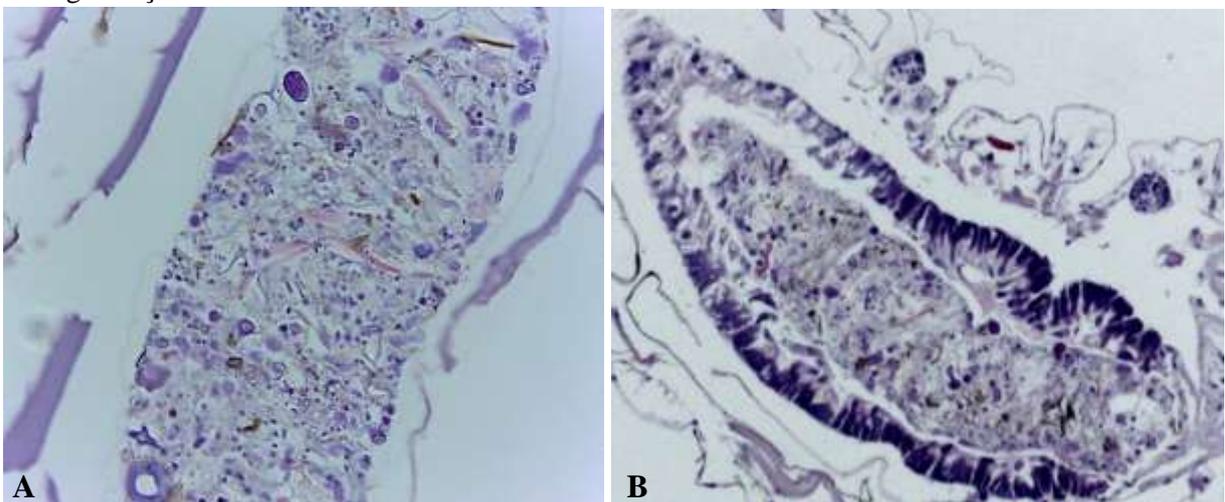
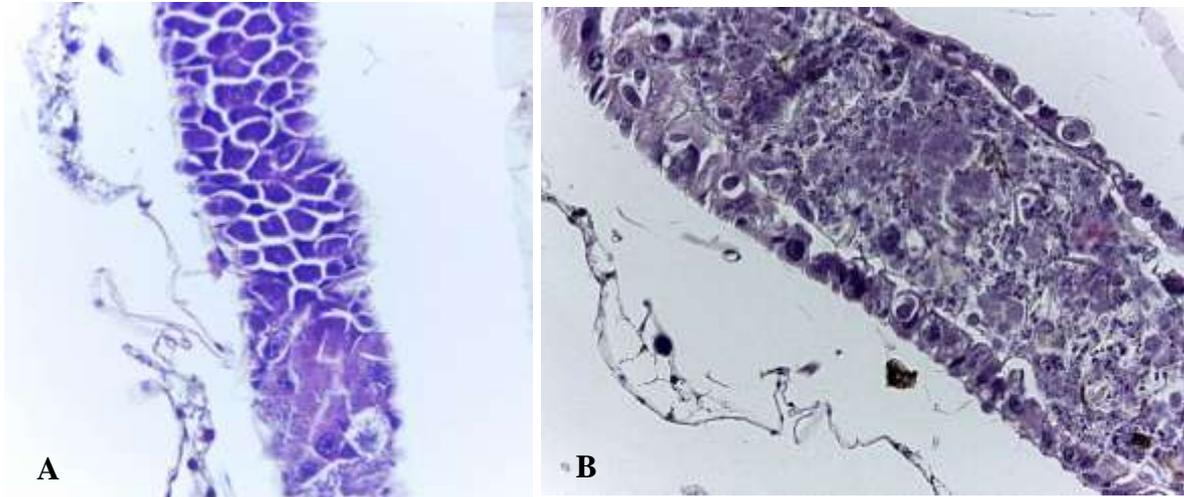


Figura 10. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-237. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição ao *Bt*. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.



As figuras 11A e 11B mostram o epitélio destruído pela ação bacteriana da linhagem BtMA-401 durante o intervalo de 6 e 24 horas, respectivamente. As células apresentaram alto grau de destruição, com evidente desorganização celular. Com 6 e 24 horas de exposição ao BtMA-459, as células intestinais estavam desordenadas, e notável formação de vacúolos, com formas irregulares (Figura 12A e 12B). Foram observadas células epiteliais praticamente destruídas no tempo de 6 horas, e rompimento total do epitélio em 24 horas de exposição a linhagem BtMA-559 (Figura 13A e 13B).

Mudanças morfológicas no epitélio das larvas foram notadas com 6 horas de exposição a linhagem BtMA-686, apresentavam suas células afastadas uma das outras, e conteúdo das vesículas estavam extravasadas no espaço entre o lúmen e o epitélio. Com 24 horas de exposição, o epitélio se encontrava totalmente destruído (Figura 14A e 14B).

A figura 15A demonstra as microvilosidades celulares irregulares e destruída pela ação bacteriana em 6 horas de exposição ao BtMA-750. As principais alterações encontradas em 6 horas de exposição ao BtMA-755 foram distanciamento das células, ou seja, aumento do espaçamento entre as unidades de célula, vacuolização celular (Figura 16A). As figuras 15B, 16B, 17A e 17B mostram ausência do epitélio intestinal, ocasionada pela atividade larvicida do BtMA-750, BtMA-755 e BtMA-761, respectivamente, nas larvas de *A. aegypti*, mostrando o potencial dos isolados do Maranhão.

Figura 11. A e B: Fotomicrografia das alterações celulares de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-401. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.

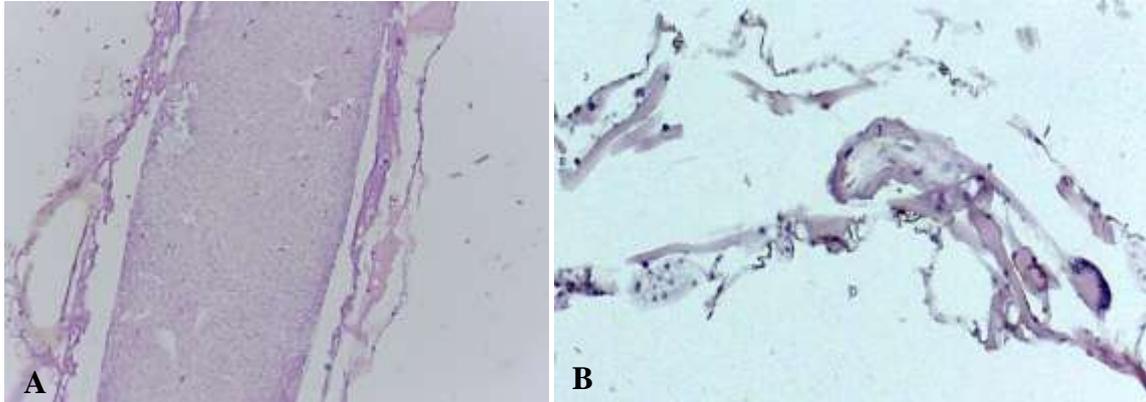


Figura 12. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-459. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.

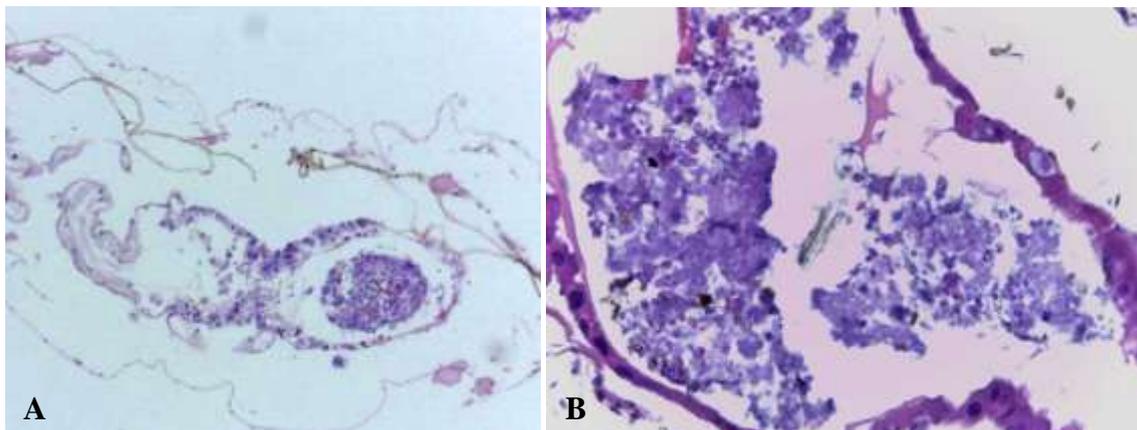


Figura 13. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-559. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição ao bacilo. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição bacteriana.

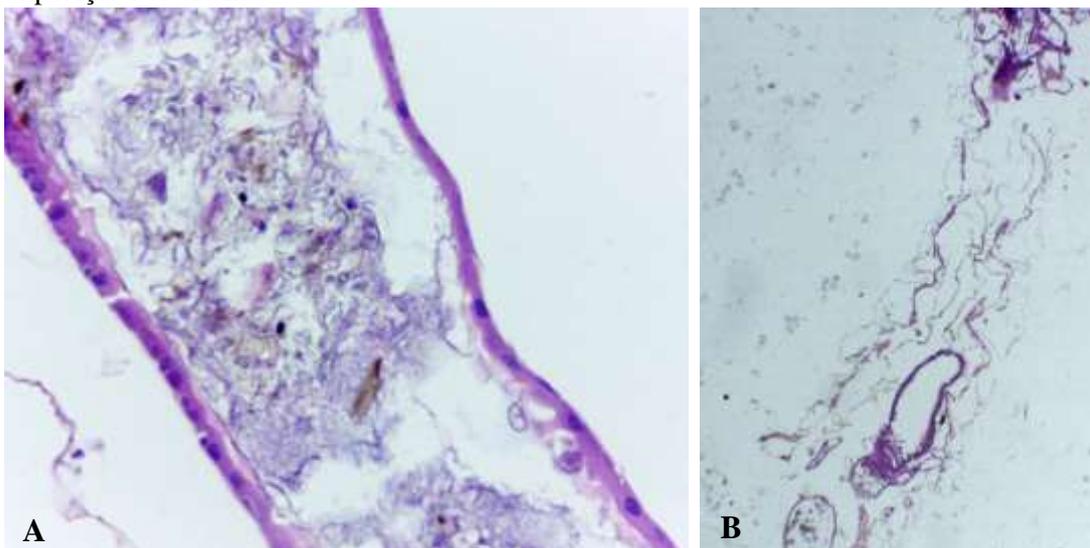


Figura 14. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-686. A- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.

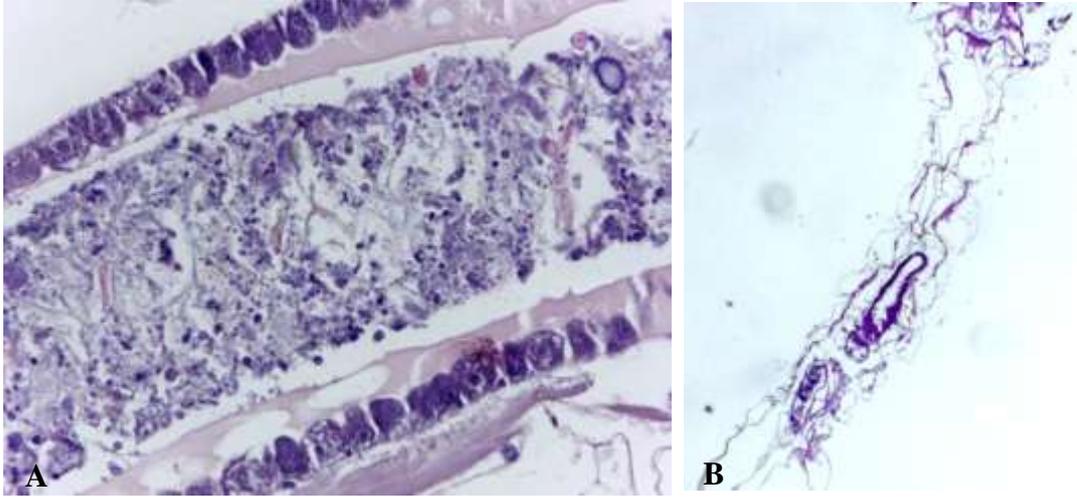


Figura 15. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-750. A- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.

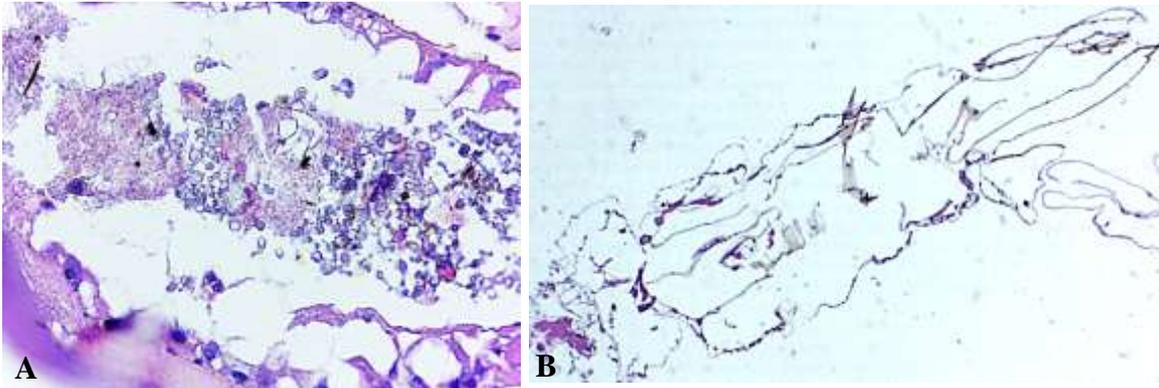


Figura 16. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-755. A- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seccões histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.

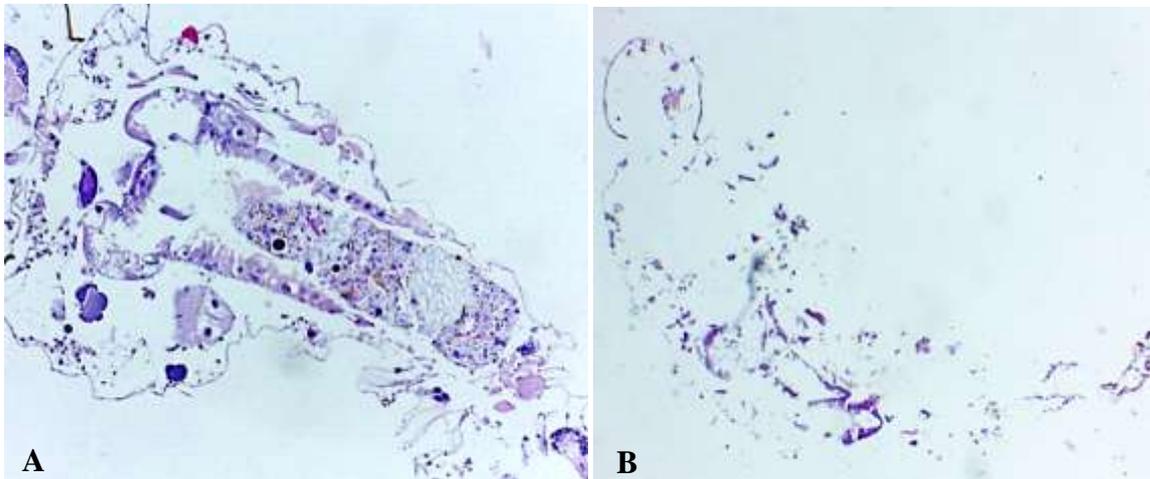
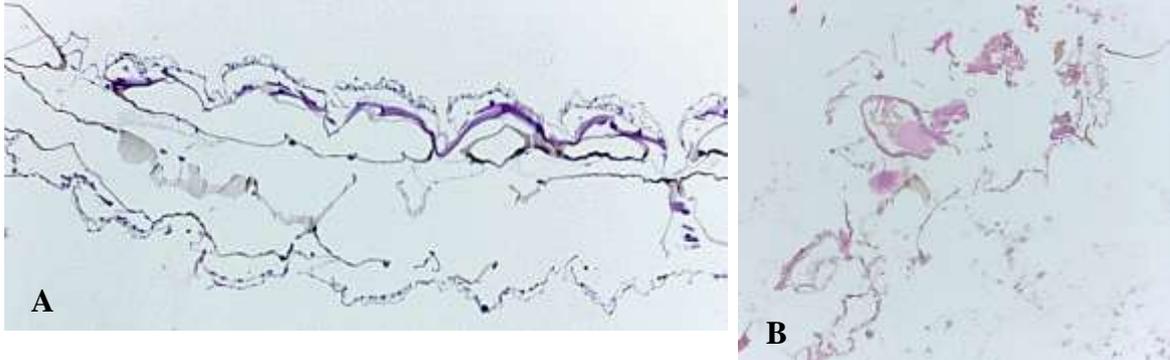


Figura 17. A e B: Fotomicrografia das alterações ultraestruturais de larvas de *Aedes aegypti*, após exposição a *Bacillus thuringiensis*, estirpe BtMA-761. A- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 6 horas de exposição a bactéria. B- Seções histológicas do epitélio intestinal de larvas de *Aedes aegypti* com 24 horas de exposição ao bacilo.



5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram encontrados diferentes perfis gênicos, incluindo combinações de toxinas Cry e Cyt, em oito dos 12 isolados testados. Bravo et al. (1998) mostraram que esses perfis associados de genes, sugerem que cepas de *B. thuringiensis* possuem alta frequência de troca de informação genética. Os isolados deste estudo, que apresentaram combinações de genes *cry*, são os mais promissores para a busca de novos agentes de controle biológico com uma ação inseticida mais ampla.

Ben-Dov et al. (1997, 2014) destacam que novas especificidades tóxicas podem surgir de novas combinações de genes *cry* conhecidos. O sucesso deste entomopatógeno está relacionado à produção de proteínas que ao serem ingeridas pelas larvas de insetos alvo tornam-se tóxicas e levam a morte. Com isso, interrompem o ciclo reprodutivo do vetor, com a redução do índice populacional de adultos.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os obtidos por Mahalakshmi et al. (2012) que encontraram padrões diversificados de toxinas Cry e Cyt em isolados da Índia com atividade inseticida. Baig e Mehnaz (2010) também identificaram diferentes perfis associados contendo genes *cry*, provenientes de rochas sedimentares do Mar Arábico, doze isolados contendo dois genes *cry*, enquanto cinco isolados apresentaram mais de dois genes *cry* e do mesmo modo Shishir et al. (2014) verificaram a presença de genes *cry* em proporções variadas de diferentes ecossistemas de Bangladesh na Ásia.

No presente trabalho não foi constatado nenhuma linhagem que expressou todos os genes, o que pode ser observado nos trabalhos realizados por Costa et al. (2010) investigando sete genes em 45 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões brasileiras e Ricieto et al. (2011) que estudou 20 isolados provenientes de diferentes ambientes da Região Norte do Paraná.

Diferentes resultados foram verificados por Khojand et al. (2013), onde três isolados de *B. thuringiensis* oriundos da província Khorasan Razavi, localizada no nordeste do Irã apresentaram os quatro genes testados. Soares-da-Silva et al. (2015), também encontraram uma linhagem de *B. thuringiensis* do Amazonas expressando os cinco genes testados, e Vieira-Neta (2016) estudando um isolado de *Bt* da restinga do estado do Maranhão observou fragmentos de DNA para os nove genes utilizados nas análises moleculares.

No presente trabalho, também se constatou que um isolado de *B. thuringiensis* não amplificou para nenhum dos oligonucleotídeos estudados, o que evidencia a presença de novos genes *cry* e *cyt* ainda não caracterizados. Pinto e Fiuza (2003) também verificaram que um total de 36,95% dos isolados de amostras de solos do Rio Grande do Sul não amplificaram para nenhum dos seis pares de oligonucleotídeos analisados.

Os resultados referentes à caracterização do BtMA-401, realizada neste estudo, assemelham-se aos estudos de Ejiófor e Johnson (2002) em que apenas a linhagem BT23 proveniente do Centro-Sul dos Estados Unidos, também amplificou para um único gene. No trabalho de Baig e Mehnaz (2010), sete isolados de *Bt* também apresentaram um único gene testado.

No presente estudo observou-se a presença de genes que codificam as toxinas Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry32, Cyt1, Cyt2 e Cry1Ab e ausência das toxinas Cry24 e Cry44Aa nos isolados ativos de *B. thuringiensis*. Nas análises moleculares realizadas por Salekjalali, Barzegari e Jafari (2012) encontraram uma maior frequência de genes *cry1* em 29 isolados de *Bt* oriundos do solo de Arasbaran, Irã. Silva et al. (2012) verificaram que os 20 isolados de *B. thuringiensis* provenientes do nordeste brasileiro apresentaram o gene *cry2*. Já Khojand et al. (2013), encontraram genes *cry1* e *cry2* representando 91,7% e 87,6% das estirpes analisadas, respectivamente, diferente dos resultados encontrados neste estudo, em que verificamos a ocorrência dos genes *cry1* e *cry2* em uma única linhagem de *B. thuringiensis*.

Nos trabalhos de Constanski et al. (2015) os genes *cry1* e *cry2* foram encontrados apenas nos isolados BR37 e BR94, respectivamente, e Nemappa et al. (2012) observou que apenas um dos nove isolados de *Bt*, o T191, mostrou presença de genes da família Cry1. No entanto, Grecco, Polanczyk e Pratisoli (2010) não detectaram os genes *cry1* e *cry2* nos isolados testados de diferentes localidades do Brasil.

A família Cry1 possui toxinas com atividade contra dípteros, como é o caso da proteína Cry1Ab, identificada em duas linhagens de *B. thuringiensis* no presente estudo. Manikandan et al. (2016) obtiveram apenas uma linhagem para o gene *cry1Ab* positiva, dos seis isolados de *Bt* analisados. Entretanto, Fatoretto et al. (2007) demonstraram resultados superiores ao encontrado neste estudo, em que o gene *cry1Ab* amplificou em 80 dos 115 isolados caracterizados, provenientes das cinco regiões geográficas brasileiras e de outros países.

Os isolados BtMA-179, BtMA-229, BtMA-237, BtMA-459, BtMA-559, BtMA-686, BtMA-755, BtMA-761 e BtMA-762 expressaram pelo menos um dos genes estudados e/ou para combinação entre dois ou mais genes encontrados *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* em linhagens de *B. thuringiensis* tóxicas a *A. aegypti*, diferindo dos resultados do Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão em que estes mesmos isolados não expressaram genes específicos encontrados na cepa padrão *Bti*, o que evidencia a necessidade de sequenciar estas linhagens com o intuito de obter informações mais detalhadas sobre o conteúdo genômico das mesmas.

Outros estudos verificaram isolados expressando diferentes proporções de genes *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry32*, *cyt1* e *cyt2*, também encontrados neste estudo. Khojand et al. (2013), constataram que o gene *cry4* amplificou em 10 dos 24 isolados analisados, já Ejiofor e Johnson (2002) verificaram que apenas um isolado de *Bt* apresentou fragmentos de tamanho esperado para o gene *cry4*. Por outro lado, Dias et al. (2002), descreveram isolados de amostras de solo e água coletadas em diferentes regiões do país com ação tóxica para *A. aegypti*, que não apresentaram os genes *cry4* e *cry11*. Praça et al. (2004), também reportaram dois isolados de *B. thuringiensis* tóxicos para *A. aegypti* com ausência dos genes *cry4* e *cry11*.

Diferentes resultados foram obtidos por El-kersh et al. (2014) analisando 103 isolados nativos de diferentes regiões da Arábia Saudita, no qual 28 isolados apresentaram fragmentos de tamanho esperado para o gene *cyt1*, 23 e 26 isolados amplificaram para o gene *cry10* e *cry11*, respectivamente. No trabalho de Santos et al. (2012), verificou-se nas reações de PCR, a presença dos genes *cry10* e *cry11* nos isolados de *Bt* tóxicos as larvas de *A. aegypti* do Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Já Konecka et al. (2012) pesquisando a presença de genes *cyt*, dos sete isolados de *B. thuringiensis* da Polônia, nenhum apresentou os genes *cyt1* e *cyt2*. Silva et al. (2012) verificaram que dos 20 isolados de *Bt* analisados, nenhuma das linhagens amplificaram para os genes *cry4*, *cry11*, *cyt*, o que difere dos resultados encontrados no presente estudo, em que estes genes foram verificados nos isolados de *Bt* do Maranhão.

A distribuição de genes *cry32* encontrada neste trabalho é diferente da relatada por Jouzani et al. (2008) em que nenhum dos 16 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões do Irã, produziram fragmentos de tamanho esperado, o que indica que as estirpes não possuem esse gene.

A ausência dos genes *cry24* e *cry44Aa* em isolados *B. thuringiensis* com ação larvicida para *A. aegypti* observada neste estudo foi igualmente descrita por Ejiofor e Johnson (2002) estudando isolados provenientes do Centro-Sul dos Estados Unidos e Vidal-Quist, Castañera e González-Cabrera (2009) analisando amostras coletadas no leste da Espanha, respectivamente.

As proteínas Cry podem ser compostas por um ou mais cristais intracelulares, estas proteínas são codificadas por um ou várias cópias de um mesmo gene, ou diferentes genes *cry*, esse fato contribui para a ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações e consequentemente distintos perfis de toxicidade, como observado na análise proteica deste trabalho (CRICKMORE et al., 1998; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; JOUZANI et al., 2008; BEN-DOV, 2014).

As classes Cry1 e Cry2 identificadas no presente estudo apresentam conteúdo proteico em torno de 65 e 130 kDa, respectivamente. Essas proteínas apresentam duas integrantes, as proteínas Cry1Ab e Cry2Aa, ativas contra a ordem díptera (AGUIAR, 2007; CÍCERO, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009). As proteínas Cry4, Cry10 e Cry11 identificadas neste trabalho, também tóxicas para insetos da ordem díptera, produzem bandas de aproximadamente 128 a 135 kDa, 78 kDa e 72 kDa, respectivamente (THORNE et al., 1986; LERECLUS et al., 1989; DELECLUSE; ROSSO; RAGNI, 1995; AGUIAR, 2007).

A toxina Cry32 presente nos isolados nativos do Maranhão, possui massa molecular variando de 128 a 140 kDa, e apresenta três integrantes com atividade contra insetos da ordem díptera: Cry32Ba, Cry32Ca e Cry32Da. As proteínas Cyt1 e Cyt2 identificadas neste estudo apresentam massa molecular de 27 a 30 kDa, e têm sido bastante relatadas agindo sinergicamente com as toxinas Cry, mostrando-se importantes para aumentar a eficiência de um isolado no controle de mosquitos (CRICKMORE et al., 1998; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; JOUZANI et al., 2008; BEN-DOV, 2014).

O fato da não identificação do perfil proteico nos isolados BtMA-755 e BtMA-761 pode ser explicado pela não expressão dessas proteínas, pois a presença do gene não quer dizer necessariamente que a toxina esteja sendo expressa, ou pode estar sendo expressa em baixa quantidade. Isto também foi evidenciado nos estudos de Macedo et al. (2012) ao analisar *Bt* do banco de bacilos de Londrina e da Embrapa e Constanski et al. (2015) que estudou amostras de solo e água de diferentes regiões do Brasil.

No presente trabalho as alterações histopatológicas no epitélio intestinal de larvas de *A. aegypti*, ocasionadas pelas toxinas produzidas pelo cristal, em todas as estirpes e o controle positivo incluíram degeneração celular. Tais resultados, semelhantes aos relatados por Rey et al. (1998) comparando as alterações ultraestruturais em diferentes espécies de dípteros e crustáceos de ecossistemas alpinos pela ação tóxica de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, e Cavados et al. (2004) investigando os efeitos de toxinas de *Bti* em larvas de *Simulium pertinax*, onde essa desorganização estrutural do epitélio é evidente, mostrando células sem a característica histológica já nas primeiras 6 horas de aplicação da bactéria, o que pôde ser observado no presente trabalho. De acordo com Habib (1983), Boonserm et al. (2005) e Lacey (2007), a ação rápida desta bactéria é devido às larvas possuírem o pH do intestino altamente alcalino favorecendo a solubilização e liberação dos cristais proteicos.

Alguns autores como Rey et al. (1998) e Cavados et al. (2004) também demonstraram através das análises histopatológicas extravasamento das vesículas no espaço entre o lúmen e o epitélio e a presença de vacúolos digestivos, sendo uma consequência do processo de lise celular e defesa do organismo à ação bacteriana. Em outras investigações

realizadas por Barreto (2009) foram encontrados resultados semelhantes aos citados anteriormente utilizando substâncias botânicas como tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae) como larvicida biológico.

Em estudos realizados com a espécie *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Charles e de Barjac (1981), e Lahkim-Tsrer et al. (1983) constataram a desintegração completa do epitélio intestinal de larvas de *A. aegypti* ocasionado pela ação desta bactéria, o que pôde ser observado no presente estudo, com 24 horas de aplicação das linhagens BtMA-559, BtMA-686, BtMA-750 e BtMA-755, e em 6 e 24 horas na linhagem BtMA-761, demonstrando o alto potencial tóxico destas estirpes. As observações histopatológicas das células epiteliais do controle negativo neste trabalho, coincidiram com as pesquisas descritas por Lahkim-Tsrer et al. (1983), Cavados et al. (2004) e Barreto (2009), que também descreveram aspectos celulares normais, com citoplasma íntegro e núcleo único e esférico.

A partir dos dados obtidos na caracterização molecular por meio da PCR e SDS-PAGE 12%, pode-se verificar que existem isolados de *B. thuringiensis* do Maranhão com combinações de toxinas Cry e Cyt com elevada toxicidade, o que pode-se ser visualizado mediante as alterações ultraestruturais no epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti* provocadas por estas toxinas, o que evidencia o potencial destes isolados de *B. thuringiensis* como possíveis agentes de controle biológico.

6 CONCLUSÃO

- A presença dos genes díptero-específicos *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry32*, *cyt1*, *cyt2* e *cry1Ab* encontrados no presente estudo, são importantes na seleção de isolados de *B. thuringiensis* com toxicidade para *A. aegypti*;
- Os isolados BtMA-237, BtMA-459, BtMA-559, BtMA-686, BtMA-750, BtMA-755, BtMA-761, BtMA-762, que apresentaram combinações dos gene *cry* e *cyt* são os mais promissores como agentes de controle biológico, com um espectro de ação mais amplo;
- A análise SDS-PAGE revelou que a maioria dos isolados produziu massa molecular sugerindo a presença das proteínas Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry32, Cyt1 e Cyt2;
- Os isolados de *B. thuringiensis* do Maranhão mostram-se altamente tóxicos, provocando alterações ultraestruturais no epitélio intestinal nas larvas de *A. aegypti*;
- Os resultados encontrados neste estudo evidenciam o potencial dos isolados para o controle de *A. aegypti*, no qual podem constituir como ferramenta biotecnológica para a fabricação de larvicidas biológicos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. W. S. A. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinante de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto**. 2007. 122f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2007.
- AHMAD, M. S.; SHAKOORI, A. R. Cloning and molecular characterization of *cry1Ca* and *cry1Cb* genes from locally isolated *Bacillus thuringiensis* Strains. **Pakistan journal of zoology**, v. 45, n. 3, p. 759-767, 2013.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- BAIG, D.; N.; MEHNAZ. S. Determination and distribution of *cry*-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. **Microbiological Research**, v. 165, n. 5, p. 376-383, 2010.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. 1.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004.
- BARRETO, C. F. **Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae)**. 2009. 101F. Tese (Pós-Graduação em Medicina Tropical na área de concentração em Parasitologia) - Universidade Federal De Goiás, Instituto De Patologia Tropical E Saúde Pública, Goiânia – GO, 2009.
- BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; MINOO, M.; DAHL, C.; KAISER, A. **Mosquitoes and their control**. 2 ed. New York: Springer, 2010.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, Switzerland, v.6, p. 1222-1243, 2014.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.
- BERLINER, E.. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe. **Z. Gesante Getreidewesen**, Berlin, v. 3, p. 63- 70, 1911.
- BIZARRI, M. F.; BISHOP, A. H.; DINSDALE; A.; LOGAN, N. A. Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 60-69, 2008.
- 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**, p. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.
- BOYER, S.; PARIS, M.; JEGO, S.; LEMPÉRIÈRE, G.; RAVANEL, P. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme

activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v, 62, n. 2, p. 75–81, 2012.

BRASIL/MS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. Brasília-DF: 2013.

BRASIL/MS. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente**. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

BRASIL/SVS/MS. Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016**. Boletim Epidemiológico. Brasília-DF: 2017.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-31, 2011.

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

CADAVID-RESTREPO, G.; SAHAZA, J.; ORDUZ, S. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n. 1, p. 74-79, 2012.

CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, E. C.C.; LEMOS, M. V. F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific *cry* genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 243-247, 2012.

CANTÓN, P. E.; REYES, E. Z.; ESCUREDO, I. R.; BRAVO, A. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 595-600, 2011.

CAVADOS, C. F. G.; MAJEROWICZ, S.; CHAVES, J. Q.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C.; RABINOVITCH, L. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p.493-498, 2004.

CHARLES, L. F.; de BARJAC, H. Histopathologie de l'action de la δ -endotoxine De *Bacillus thuringiensis* var- *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti* (dip.: culicidae). **Entomophaga**, v. 26, n. 2, p. 203-212, 1981.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press; 1960.

CÍCERO, E. A. S. Caracterização molecular e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial inseticida para *Sphenophorus levis*. 2007. 76f. Tese (Pós-

Graduação em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2007.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CONSTANSKI, K. C.; ZORZETTI, J.; VILAS-BÔAS, G. T.; RICHIETO, A. P. S.; FAZION, F. A. P.; VILAS-BÔAS, L.; MONNERAT, R. G.; NEVES, P. M. O. J. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 50, n. 8, p.730-733, 2015.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, S. S.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 757-766, 2010.

COSTA, L. G. Efeitos tóxicos dos praguicidas. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. (Ed). **Fundamentos em toxicologia de Casaret e Doull**, Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. cap. 22, p. 311-371.

COSTA, M. A. R. **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. 214f. Dissertação (Pós-graduação em Geografia) - Universidade Estadual Paulista. Presidente Prudente, 2001.

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info>>. Acesso em: 23 set. 2016.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX C. (Eds.). **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field application**, 2000. cap. 1.2, p. 23-40.

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**, v. 286, n. 10, p. 797-800, 1978.

de MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DELECLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4230-4235, 1995.

DIALLO, D.; SALL, A. A.; DIAGNE, C. T.; FAYE, O.; FAYE, O.; BA Y.; HANLEY, K. A.; BUENEMANN, M.; WEAVER, S. C.; DIALLO, M. Zika Virus Emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v.9, n. 10, p. 1-8, 2014.

- 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. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, DF, p. 1676-1340, 2002.
- DONALÍSIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.
- DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-279, 2002.
- DORTA, S. O. **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Liviidae)**. 2014. Dissertação (Pós-graduação em Ciências, Área concentração Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Piracicaba, 2014.
- EJIOFOR, A. O.; JOHNSON, T. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 284-290, 2002.
- EL-KERSH, T.A.; AL-AKEEL, R.A.; AL-SHEIKH, Y.A.; ALHARBI, S.A. Isolation and distribution of mosquito-larvicidal *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 616-632, 2014.
- FATORETTO, J. C.; SENA, J. A. D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M. L V. F.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.36, n. 5, p. 737-745, 2007.
- FEITELSON, J. S. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In L. Kim (ed.), *Advanced engineered pesticides*. **Marcel Dekker, Inc.**, New York, p. 63-72. 1993.
- FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 32-35, 2009.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
- GIANNINI, M. L. **Dengue hemorrágica**. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. 1 ed. Chichester: John Wiley and Sons, 2000.
- GOBATTO, V.; GIANI, S. G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; SPECHT, A. and BARROS, N. M. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1039-1046, 2010.
- GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 355-358, 1977.

- GRECCO, E. D.; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI. Seleção e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* Berliner com atividade tóxica para *trichoplusia Ni* Huebner (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 685-692, 2010.
- GUILOSKI, I. C.; SILVA, E. G.; NISHIKAWA, C. M.; ASSIS, H. C. S. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 1998. cap. 12, p. 383-446.
- HABIB, M. E. M. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H14) against some aquatic dipterous insects. **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology**, v. 95, p. 368 – 376, 1983.
- HADDOW, A. J.; WILLIAMS, M. C.; WOODALL, J. P.; SIMPSON, D. I.; GOMA, L. K. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, p. 57-69, 1964.
- HANUR, V. S.; REDDY B.; ARYA, V. V.; RAMI REDDY, P. V. Genetic Transformation of Tomato Using *Bt* Cry2A Gene and Characterization in Indian Cultivar Arka Vikas. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 1805-1814, 2015.
- HEMINGWAY, J. Biological control of mosquitoes. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). **Biology of disease vectors**, Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. cap. 43, p. 649-660.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 7844-7848, 1988.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.
- HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.
- IBARRA, J. E.; DEL RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NOIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; DE OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003.
- IRIARTE, J.; PORCAR, M.; LECADET, M.; CABALLERO, P. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 402-408, 2000.
- JOUZANI, G. S.; ABAD, A. P.; SEIFINEJADE, A.; MARZBAN, R.; KARIMAN, K.; MALEKI, B. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in

native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 83-94, 2008.

KHOJAND, S.; KESHAVARZI, M.; ZARGARI, K.; ABDOLAHI, H.; ROUZBEH, F. Presence of Multiple *cry* Genes in *Bacillus thuringiensis* Isolated from Dead Cotton Bollworm *Heliothis armigera*, **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 6, p. 1285-1292, 2013.

KONECKA, E. et al. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 01-05, 2012.

KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v.229, n.2, p.319-327, 1993.

KUMAR, N. P.; SURESH, A.; VANAMAIL, P.; SABESAN, S.; KRISHNAMOORTHY, K. G.; MATHEW, J.; JOSE, V. T.; JAMBULINGAM, P. Chikungunya virus outbreak in Kerala, India, 2007: a seroprevalence study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 912-916, 2011.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, p. 133-163, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAHKIM-TSROR, L.; PASCAR-GLUZMAN, C.; MARGALIT, J.; BARAK, Z. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, n. 1, p. 104- 116, 1983.

LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J. E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 840-849, 1991.

LEPARC-GOFFART, I.; NOUGAIREDE, A.; CASSADOU, S.; PRAT, C.; LAMBALLERIE, X. **Chikungunya in the Americas**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A. AND RAPOPORT, G. Role Structure, and Molecular Organization of the Genes Coding for the Parasporal d-Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: ISSAR SMITH, RALPH A. SLEPECKY AND PETER SETLOW (Eds.). Regulation of Prokaryotic Development. **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1989.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119-137, 2010.

LIMA, J. B. P.; MELO, N. V.; VALLE, D. Persistence of vectobac WDG and Metoprag S-2G against *Aedes aegypti* larvae using a semi-field bioassay in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 7-12, 2005.

LIN, Y.; XIONG, G. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 8, p. 635-639, 2004.

LOBO, K. S. Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do cerrado maranhense em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). 2015. 109f. Dissertação (Pós-graduação em Saúde do Adulto e da Criança) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2015.

MACEDO, C. L.; MARTINS, É. S.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, A. C.; PRAÇA, L. B.; GÓIS, L. A. B.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1759-1765, 2012.

MACORIS, M. L. G.; ANGRIGHETTI, M. T. M.; GLASSER, C.M.; GARBELOTI, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y.; HATANO, T.; OHBA, M. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 418-422, 2000.

MAFRA, A. A.; LEMOS, F. L. **Linha guia de atenção à saúde: dengue**. 1.ed. Belo Horizonte: Governo do Estado de Minas, 2009.

MAHALAKSHMI, A.; SUJATHA, K.; KANI, P.; SHENBAGARATHAI, R. Distribution of *cry* and *cyt* Genes among Indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates with Mosquitocidal Activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 216-226, 2012.

MANIKANDAN, R.; MUTHUKUMAR, C.; RAMALAKSHMI, A.; BALASUBRAMANI, V.; UDAYASURIYAN, V. Screening of new isolates of *Bacillus thuringiensis* for *cryI* genes and testing of toxicity against *Dichocrocis punctiferalis* (family: Pyralidae, order: Lepidoptera). **Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 191-197, 2016.

NELSON, J. M. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. **Organización Panamericana de La Salud**, Washington, DC, 1986.

NEMAPPA L.; UDAYASURIYAN, V.; RAJESH, A. M.; YATHISH, K. R.; SWAMY, M. H. K.; SOMAPPA, J. Screening of new isolates of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and cloning of the *cry* genes. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 75, p. 13974-13979, 2012.

OCHOA, G.; ARRIVILLAGA, J. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 59, n. 2, p. 181-191, 2009.

OLIVEIRA, C. D.; TADEI, W. P 1, ABDALLA, F. C. Occurrence of Apocrine Secretion in the Larval Gut Epithelial Cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalarsis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a Defense Strategy Against Infection by *Bacillus sphaericus* Neide?. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 624-631, 2009.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; AZEVEDO, E. B.; GARCIA, B. O.; SANTOS, S. F.; AGUIAR, R. W. S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linnaeus, (Díptera: Culicidae). **Journal Biotechnology Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 37-43, 2011.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, JIANGUANG.; FOLCH, J. L.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **PNAS**, v. 102, n. 51, 2005.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 699-702, 2003.

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

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

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. **Pesquisa Agropecuária**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

RAYMOND, B., JOHNSTON, P.R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D., CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. **Trends Microbiology**, v. 18, n.5, p. 189-194, 2010.

REY, D.; LONG, A.; PAUTOU, M. P.; MEYRAN, J. C. Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 88, p. 255-263, n. 3, 1998.

RICIETO, A. P. S.; FAZION, F. A. P.; HELENE, L. C. F.; VILA-BÔAS, L. A.; VILA-BÔAS, G. T. Novos isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de larvas de insetos. In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. **Anais Eletrônico...** Paraná: CESUMAR - Centro Universitário de Maringá, 2011.

SALEKJALALI M.; BARZEGARI, A.; JAFARI, B. Isolation, Pcr Detection and Diversity of Native *Bacillus thuringiensis* Strains Collection Isolated from Diverse Arasbaran Natural Ecosystems. **World Applied Sciences Journal**, v. 18, n. 8, p. 1133-1138, 2012.

SANTOS, F.P. J. LOPES, G.T. VILAS-BÔAS, J.A.C. ZEQUI. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 64– 70, 2012.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

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

- SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, n. 7, p.2893-2897, 1981.
- SCOPEL, W; ROZA-GOMES, M. F. Programas de controle biológico no Brasil. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 2, n. 2, p. 2015-223, 2011.
- SHISHIR, A.; ROY, A.; ISLAM, N.; RAHMAN A.; KHAN, S. N.; HOQ, M. M. Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their *cry* genes profile. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, 2014.
- SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, C. L. N. S.; ELIAS, C. N. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. **Entomologia y Vectores**, v. 6, n. 4, p. 383-391, 1999.
- SILVA, M. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; MARQUES, E. J.; SILVA, L. M.; BARROS, R.; LIMA F.; JOSÃO, V. M.; SILVA, S. M. F. A. *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n.5, p. 583-599, 2012.
- SOARES-DA-SILVA, J.; PINHEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANZYK, R.A.; TADEI, W. P. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomology**, São Paulo, v. 59, n. 1, 2015.
- TAN, F.; ZHU, J.; TANG, J.; TANG, X.; WANG, S.; ZHENG, A.; LI, P. 2009. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* Strain BtMC28. **Current Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 654-659, 2009.
- TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.
- TAUIL, P. L. Transmissibility conditions of chikungunya fever. Brasil. **Epidemiologia e Serviços Saúde**, v. 23, n. 4, p. 773-774, 2014.
- TAVEIRA, L. A. T.; FONTES, L. R.; NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti***. 1. ed. Ribeirão Preto, SP, 2001.
- THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A. M.; POLLOCK, T. J. Structural similarity between the Lepidoptera and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 3, p. 801-811, Jun. 1986.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. (Ed.), **Controle biológico**, Jaguariúna, SP: Embrapa--CNPMA, 1998. cap. 7, p. 208-217.
- VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. P. Molecular characterization of the *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains 344 and 1644, efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, n. 3, p. 195-209, 2008.

VALLE, D.; PIMENTA, D, N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 419-422, 2016.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p.1-16, 2009.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. **Revista Pan-Amazônica Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VIDAL-QUIST, J. C., P.; CASTAÑERA, J.; GONZÁLEZ-CABRERA. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Citrus Orchards in Spain and Evaluation of Their Insecticidal Activity Against *Ceratitidis capitata*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 749–759, 2009.

VIEIRA-NETA, M.R. A. **Seleção e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) da restinga e mangue para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. 2016. 53f. Dissertação (Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde) - Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, 2016.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 102f. Tese (Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2002.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J.; CHILCOTT, C.N. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 202, n. 3 p. 527-535, 1988.

WEAVER. S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1-4, 2014.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.7, p.518-528, 2007.

WHO-World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** - Library Cataloguing-in-Publication Data. New edition: Geneva, 2009.

ZHANG, L.; HUANG, E.; GLIN, J.; GELBIC, I.; ZHANG, Q.; GUAN, Y.; HUANG, T.;GUAN, X. A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudate*. **Microbiological Research**, v. 165, n.2, p. 133-141, 2010.