



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB
FACULDADE DE CIÊNCIA DA EDUCAÇÃO DA SAÚDE –
FACES**

BRUNA MARTINS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* COM
POTENCIAL DE USO NO TRATAMENTO A DOENÇAS HELMÍNTICAS**

BRASÍLIA-DF

2023

BRUNA MARTINS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* COM
POTENCIAL DE USO NO TRATAMENTO A DOENÇAS HELMÍNTICAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências da
Educação e Saúde para obtenção do grau
de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto
Martins Queiroz.

BRASÍLIA-DF

2023

BRUNA MARTINS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* COM
POTENCIAL DE USO NO TRATAMENTO A DOENÇAS HELMÍNTICAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências da
Educação e Saúde para obtenção do grau
de Bacharel em Medicina Veterinária.

Brasília, ____ de _____ de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz

Prof. Dr. Emanuel Elzo Leal de Barros

Prof. Me. Lucas Edel Donato

Brasília-DF

2023

IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* COM POTENCIAL DE USO NO TRATAMENTO A DOENÇAS HELMÍNTICAS

Resumo

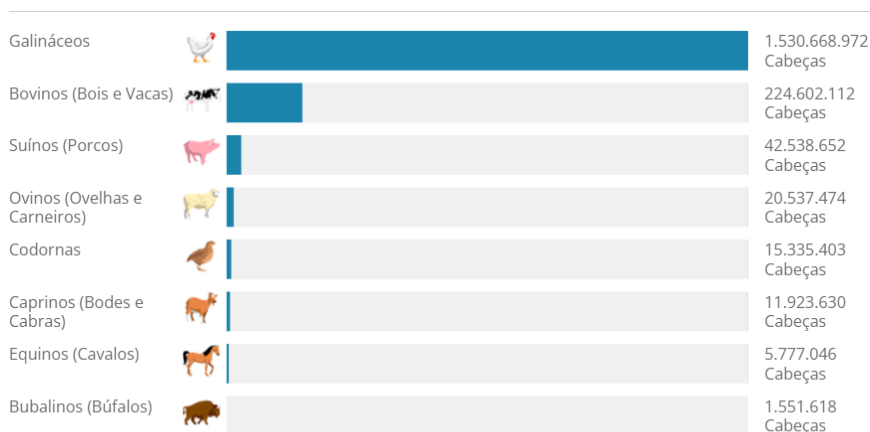
A ovinocultura apresenta grande importância para a pecuária mundial, entretanto as doenças parasitárias causadas por nematoides gastrintestinais estão entre os principais fatores que limitam a produção. Os produtores buscam alternativas para contornar essa problemática, todavia a maior parte desses realizam o controle administrando anti-helmínticos os quais vem aumentando cada vez mais a resistência desses vermes ao princípio ativo das fórmulas. Dentre as novas abordagens contra os nematoides, há estudos relacionados às propriedades nematicidas das proteínas cristal expressas pelas bactérias *Bacillus thuringiensis*. Perante o exposto, o objetivo deste trabalho foi descrever a ação de uma possível proteína Cry com atividade anti-helmíntica contra *C. elegans* e assim proporcionar uma solução viável para a problemática descrita. Os genes que codificam as toxinas Cry6 e Cry11 foram clonados em vetores pHT para expressão em células de *B. thuringiensis*. As bactérias foram cultivadas, extraídas e purificadas. Uma vez que a esses processos foram realizados, o experimento foi dado continuidade por intermédio de bioensaios com nematoides *C. elegans*. Por intermédio desta pesquisa foi possível concluir que a proteína Cry11 não possui efeitos nematicidas, concordando com a maior parte da literatura, enquanto a proteína Cry6 mostra-se promissora para o controle de *C. elegans* com dosagens acima de 173,51 ppm (173512,1 ng/mL).

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*; nematicida; nematoide; toxina Cry.

1. INTRODUÇÃO

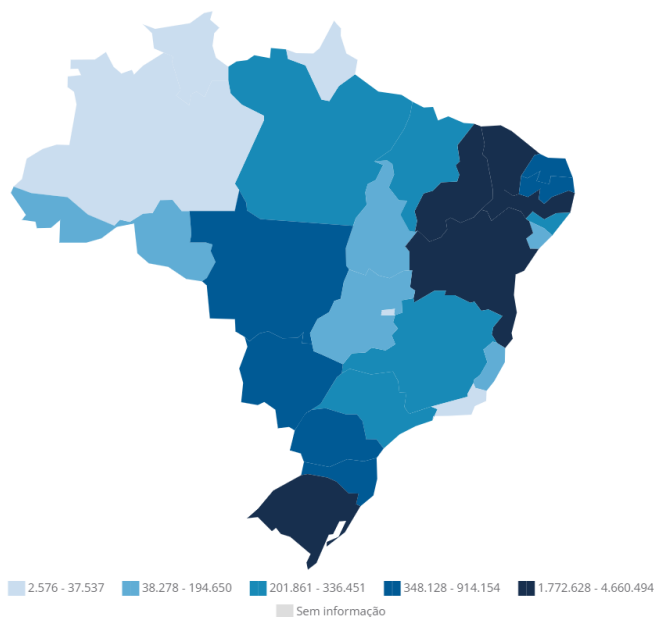
No contexto mundial, a ovinocultura se tornou um dos mais amplos setores com massiva implantação em países como a Austrália, Nova Zelândia, Argentina e África do Sul. No Brasil, tal setor está no 4º lugar como maior rebanho do país com cerca de 70% da produção concentrada na região Nordeste (FIGURA 1 e 2) (IBGE, 2021; MORAND-FEHR; BOYAZOGLU, 1999).

Figura 1: Ranking da pecuária brasileira em 2021.



Fonte: IBGE, 2021.

Figura 2: Mapa referente ao tamanho do rebanho de ovinos em cabeças no Brasil.



Fonte: IBGE, 2021.

Apesar da importância da ovinocultura para a pecuária mundial, as doenças parasitárias causadas por nematoides gastrintestinais (NGI) estão entre os fatores

principais que limitam a produção, causando baixos índices de produtividade e, conseqüentemente, um grande impacto econômico diante dos altos custos para prevenir e tratar animais infectados. De acordo com Chagas e colaboradores (2022), o gasto com o citado anteriormente, apenas no estado do Rio Grande do Sul, está em torno de 400 mil dólares (IBGE, 2021; MORAND-FEHR; BOYAZOGLU, 1999).

Os produtores buscam alternativas para contornar a problemática com os NGI seja melhorando a dieta do animal, melhoramento genético ou gestão do pastoreio, todavia a maior parte desses realizam o controle administrando anti-helmínticos de amplo espectro. O uso exaustivo de tais medicamentos, em muitos casos realizado de forma inadequada, vem aumentando cada vez mais a resistência desses vermes ao princípio ativo das fórmulas mais usadas (FISSIHA; KINDE, 2021; MILLER et al., 2012).

O uso exacerbado e inapropriado dos anti-helmínticos resultou, segundo Gainza e colaboradores (2021), no aparecimento de *Haemonchus* spp. resistentes a múltiplas drogas no Brasil. Nesse estudo experimental, foram analisadas amostras fecais de 245 ovinos de diferentes raças os quais estavam sem tratamento por anti-helmínticos por no mínimo 12 semanas antes do experimento. As amostras foram separadas em grupos e submetidas à cultura de larvas. Por fim, foram aplicadas diluições de diferentes medicamentos (Benzimidazol, Levamisol, Ivermectina e Zolvix) em tais culturas e verificou-se que 60% delas mostravam resistência a todos os nematicidas testados enquanto os outros 40% apresentavam múltipla resistência ao benzimidazol, levamisol e ivermectina.

Zajac e Garza (2020) descreveram que a maior parte das ocorrências de helmintoses em ovinos é proporcionada por aqueles NGI oriundos da ordem Strongylida. Em países de clima tropical como o Brasil, o representante mais prevalente desse grupo é o hematófago *Haemonchus contortus* (*H. contortus*). Diferentemente dos outros NGI, *H. contortus* não ocasiona primariamente diarreia nos seus hospedeiros fazendo com que o curso da sua infecção seja de difícil observação até a complicação do quadro clínico que pode até levar à morte por anemia severa dos animais (SALGADO; SANTOS, 2016).

Um grande esforço tem sido investido no entendimento de como é a evolução da resistência anti-helmíntica e como gerir esse fator, não obstante é de relevância lembrar que nenhum composto químico mostra ser totalmente efetivo contra todas as infecções helmínticas. Diante disso, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de tratamentos anti-helmínticos seguros e economicamente viáveis. Dentre as novas abordagens contra os GIN, há estudos relacionados às propriedades nematicidas das proteínas cristal (Cry) expressas pelas bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt; *B. thuringiensis*) (HU et al., 2010; LÓPEZ et al., 2006).

O microrganismo supracitado trata-se de uma bactéria do solo que produz grandes inclusões cristalinas quando está na condição de esporo. Esses cristais contêm proteínas Cry que são altamente tóxicas para invertebrados, no entanto, não são nocivas aos vertebrados (HU et al., 2010). Atualmente há uma variedade de produtos comerciais contendo proteínas Cry contra pestes agrícolas e alguns estudos, como o de Verduzco-Rosas e colaboradores (2021), mostram que há estirpes de Bt com atividade nematicida contra o verme de vida livre *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) o qual é considerado o microrganismo modelo para experimentações laboratoriais com nematoides. Outras pesquisas mostraram a atividade anti-helmíntica das proteínas Cry em GIN como *Ancylostoma ceylanicum* (*A. ceylanicum*) (CAPPELLO et al., 2006) e até mesmo no controle de *H. contortus* (SANDERS et al., 2020).

Perante o exposto, objetiva-se com a elaboração deste trabalho descrever a ação de uma possível proteína Cry com atividade anti-helmíntica contra *C. elegans*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Local. Os experimentos foram realizados no Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que corresponde ao polo de genética e biotecnologia da Embrapa localizado em Brasília, Distrito Federal. O laboratório utilizado trata-se do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) e o período que os experimentos foram realizados foi de 24 de março de 2023 a 27 de novembro de 2023.

Construção do vetor. Os genes que codificam as toxinas Cry6 e Cry11 foram clonados em vetores pHT para expressão em células de *B. thuringiensis* (estirpes S2493 e S2038).

Cultivo das estirpes. As bactérias foram cultivadas em 15 mL de meio Embrapa (ME) líquido com eritromicina (10 µg/mL), posto que o plasmídeo utilizado apresenta um gene de resistência para esse antibiótico, por um período de 24 h. No dia seguinte, a turbidez do erlenmeyer era verificada para confirmar o crescimento bacteriano e assim a amostra foi inoculada por 72 h a 28 °C a 200 rpm em 600 mL de ME com eritromicina (10 µg/mL). A microscopia foi realizada a fim de confirmar a esporulação completa das amostras e a não contaminação do meio. Tal processo foi realizado duas vezes de forma que totalizou 1200 mL de inóculo bacteriano para cada estirpe testada. Posteriormente, cada cultivo foi separado pela metade de forma que 600 mL seguiram para a extração de proteínas e o resto foi utilizado na purificação do material.

Purificação dos cristais. Para realizar a purificação dos inóculos, foi necessário realizar uma série de lavagens para retirada do meio de cultura do inóculo. Primeiramente, o meio foi centrifugado por 30 min a 4 °C a 10.000 rpm em tubos de 200 mL. Após isso, o sobrenadante foi transferido para outro frasco e foi feita a sua microscopia a fim de confirmar se todos os cristais e esporos foram sedimentados devidamente. Depois que todo material foi devidamente sedimentado, o sedimento foi ressuspensão em 30 mL de uma solução de 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA pH 8,0 e centrifugado novamente por 10 min a 4 °C e 10.000 rpm.

O processo anterior foi repetido mais duas vezes com a eliminação dos sobrenadantes. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão com 30 µL de Fluoreto de Fenilmetanosulfonil (PMSF) a 1 mM. Essa etapa também foi realizada 3 vezes no total. O PMSF é usado como um inibidor de proteases para evitar a quebra das proteínas permitindo que o material seja conservado sob congelamento com essa solução (PERES et al., 2023).

A seguir, as amostras foram ressuspensas em 15 mL de tampão TTN (ANEXO 1) e seguiram para uma etapa de sonicação com 3 ciclos de pulsos de 1 minuto com intervalos de 1 minuto entre um pulso e outro. A sonicação trata-se de uma metodologia aplicada no laboratório a fim de extrair as proteínas produzidas que consiste, em suma, na aplicação de energia ultrassônica na amostra líquida a fim de agitar as partículas e por consequência lisar as células bacterianas (BEROVIČ, 2011; CHUNG, 2017). Após o supracitado, as amostras estavam prontas para o gradiente de densidade de sacarose (ANEXO 2).

O gradiente de densidade em sacarose trata-se de uma técnica para fracionar macromoléculas como as proteínas Cry alvo deste estudo. Nele, a amostra contendo uma mistura de moléculas de diferentes tamanhos é colocada na superfície do gradiente e durante a centrifugação, elas se sedimentam através do gradiente em

diferentes proporções. Tais taxas dependem do tamanho, forma e densidade da molécula em relação à viscosidade do gradiente. E assim, o conteúdo de maior tamanho é sedimentado no fundo e os mais leves permanecem no topo, o que garante a separação por tamanho das macromoléculas (RASCHKE; GUAN; ILIAKIS, 2009).

Posteriormente à centrifugação do gradiente de sacarose, é necessário eliminar a sacarose das porções desejadas da amostra. Primeiro, coloca-se um volume igual de água e centrifuga-se novamente por 10 min em 4 °C por 10.000 rpm. Depois, ressuspende-se o sedimento no volume necessário de água miliQ contendo Triton 0,01%. Essa etapa deve ser realizada em um total de 3 vezes. Por fim, ressuspende-se o pellet em 500 µL de água + PMSF 1,0 mM e conserva-se a amostra a -20 °C até o uso.

Extração de esporo-cristal. Na extração de proteínas, inicialmente as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4 °C por 10.000 rpm em tubos de 200 mL. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 20 mL de NaCl 0,5 M. Centrifuga-se novamente e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado em que todo NaCl contido no tubo deve ser retirado.

Então o sedimento foi ressuspensão em 20 mL de solução inibidora de proteases composta por 1 mM de PMSF contendo 100 mM de EDTA. Tal processo foi realizado 3 vezes e por fim, a amostra pode ser estocada no freezer.

Bioensaio com solução esporo-cristal. Uma vez que a purificação e a extração foram realizadas, o experimento foi dado continuidade por intermédio de bioensaios com nematoides *C. elegans* diante da dificuldade atrelada ao cultivo em laboratório dos parasitas intestinais. Foi demonstrado que a elevada conservação dos receptores celulares glicolipídicos entre as diferentes espécies de nematoides proporciona uma alta correlação entre a susceptibilidade de *C. elegans* às proteínas Cry testadas com as demais espécies de nematóides, o que corrobora o uso de *C. elegans* como organismo modelo para screening de proteínas Cry com propriedades nematocidas de amplo espectro (CAPPELLO et al., 2006).

Além dos bioensaios, foram realizadas a técnica de eletroforese de proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a fim de verificar os resultados obtidos e o ensaio de proteína de Bradford, metodologia utilizada para medir a concentração de proteínas em uma solução com base no espectroscópio.

Para o bioensaio, uma placa contendo uma população de *C. elegans* cultivados em meio NGM (do inglês, Nematode growth medium) (ANEXO 3) foi lavada duas vezes com solução salina M9 (ANEXO 4). O material foi despejado em um tubo falcon de 50 mL e o volume foi preenchido até 20 mL com a solução salina M9.

Em seguida, o tubo foi centrifugado duas vezes por 3 min a 20°C e 3000 rpm. Após tal processo, o sobrenadante foi descartado e 1 mL desse material foi transferido para um novo falcon de 50 mL. O tubo falcon teve seu volume completado com a solução M9 até o volume total do falcon.

Posteriormente, foi feita a média do número de nematoides contidos no volume de 2,5 mL. Esse processo deve ser feito pelo menos 3 vezes e o ideal é deixar entre 30 e 50 nematoides por repetição. Essa contagem foi feita em uma placa de leitura de nematoides.

Por fim, utilizando placas de cultivo com 6 poços de capacidade de 2,5 mL foi colocado 1,875 mL da solução de nematoides devidamente homogeneizada em vortex, adicionando-se 625 µL da solução esporo-cristal extraída da bactéria a ser testada. Para o controle negativo coloca-se 625 µL de solução salina M9 em

substituição a bactéria. Após 24 h da realização dos processos listados, foi feita a primeira leitura do bioensaio.

Com os resultados obtidos do experimento anterior, novos bioensaios foram realizados, entretanto em um período de incubação de 72 h. Em todos os bioensaios foram realizadas sextuplicatas (6 réplicas) para cada tratamento.

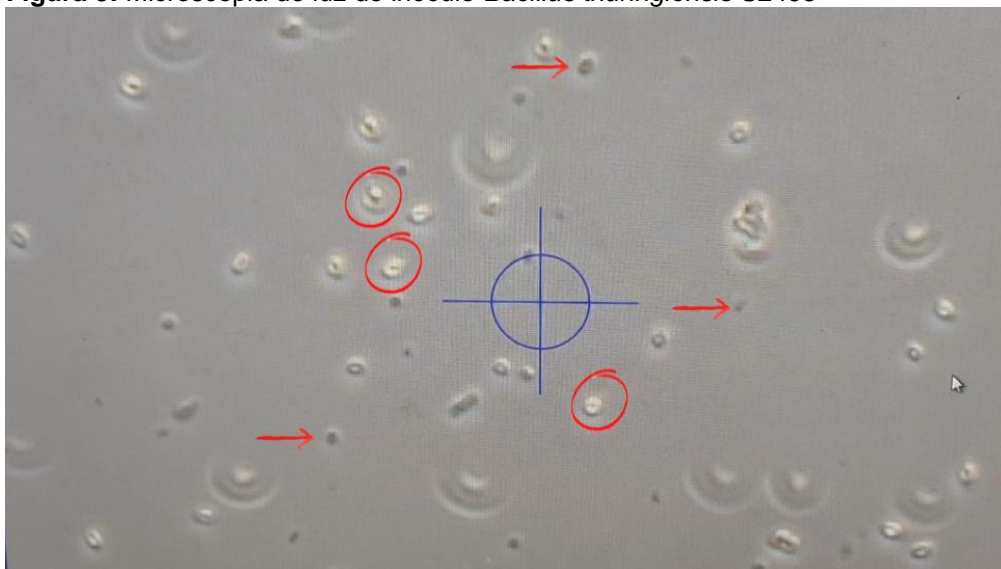
Bioensaio com proteína purificada. Com as proteínas purificadas e os resultados obtidos dos experimentos anteriores, foi realizado um bioensaio com 48 h de duração a fim de delimitar a concentração letal necessária da proteína purificada para causar a letalidade de 50% da amostra. Nesse experimento, utilizou-se as quantidades de 200 partes por milhão (ppm) (200000 ng/mL), 150 ppm (150000 ng/mL) e 68,4 ppm (68400 ng/mL) da proteína Cry6. Como controle positivo, utilizou-se a solução esporo-cristal das estirpes S2577 e S2792 que possuem atividade nematicida conhecida e documentada no banco de dados da Embrapa. O controle negativo consistiu em solução salina M9 em substituição a proteína. Utilizou-se triplicatas (3 réplicas) para cada tratamento. Utilizou-se a toxina Cry11 como um tipo de controle negativo para se avaliar a ação da bactéria sobre o nematóide.

Análise dos dados. Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis realizado no software Rstudio com um valor de significância menor que 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a expressão das proteínas alvo confirmou-se a presença dos cristais e esporos na solução após a microscopia de luz (FIGURA 3)

Figura 3: Microscopia de luz de inóculo *Bacillus thuringiensis* S2493

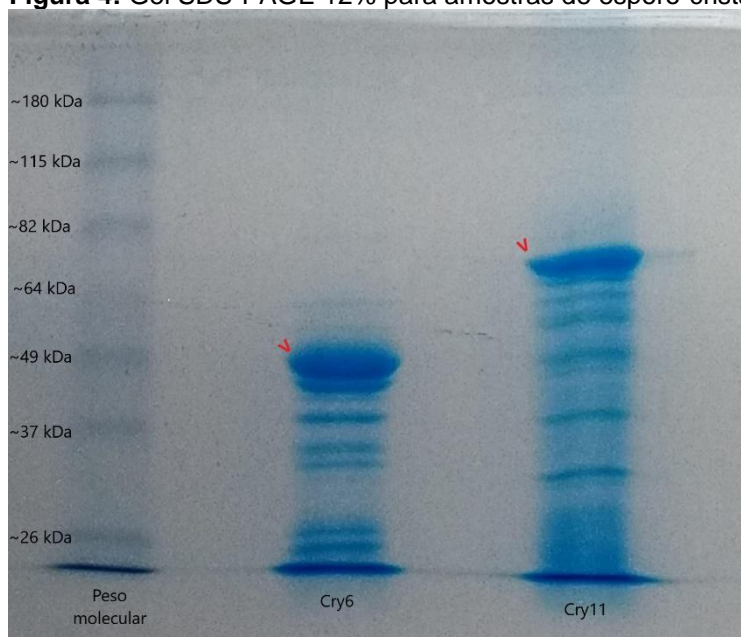


Setas em vermelho indicam cristais proteicos e círculos em vermelho indicam esporos.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

A expressão dos cristais originados das estirpes S2493 e S2038, Cry6 e Cry11 respectivamente, foi também confirmada por intermédio de SDS-PAGE. Foi observada uma banda com tamanho de ~80 kDa para a toxina Cry11 e uma banda ligeiramente menor de tamanho de ~49 kDa para a proteína Cry6 (FIGURA 4).

Figura 4: Gel SDS-PAGE 12% para amostras de esporo-cristal de Cry6 e Cry11.



Cabeças de seta em vermelho indicam a banda correspondente a proteína alvo.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Os pesos moleculares constatados pelo SDS-PAGE correspondem aos encontrados na literatura em que relatam que a Cry11 é uma toxina com ~72 kDa e a Cry6 possui ~43 kDa (DEMENTIEV, et al. 2016; FLOREZ, et al. 2018).

Em relação ao primeiro experimento, foi realizado um teste de *post-hoc* de Dunn para uma melhor análise e concluiu-se que o grupo do tratamento controle apresentou diferenças estatísticas relevantes em relação aos tratamentos envolvendo a solução esporo-cristal contendo Cry6 e contendo Cry11. Já entre os grupos Cry6 e Cry11 não houve diferença estatística significativa como resultado nesse primeiro momento (TABELA 1).

Tabela 4: Resultados do experimento após 24h.

Tratamento	Replicata	Tempo	Gene cry	NN	%C
Controle solução salina M9	1	24 h	-	20 _a	0% _a
	2			32 _a	0% _a
	3			34 _a	0% _a
	4			30 _a	0% _a
	5			30 _a	0% _a
	6			36 _a	0% _a
S2493	1	24 h	cry6	12 _b	40% _b
	2			15 _b	53,125% _b
	3			10 _b	70,58% _b
	4			3 _b	90% _b
	5			11 _b	63,33% _b

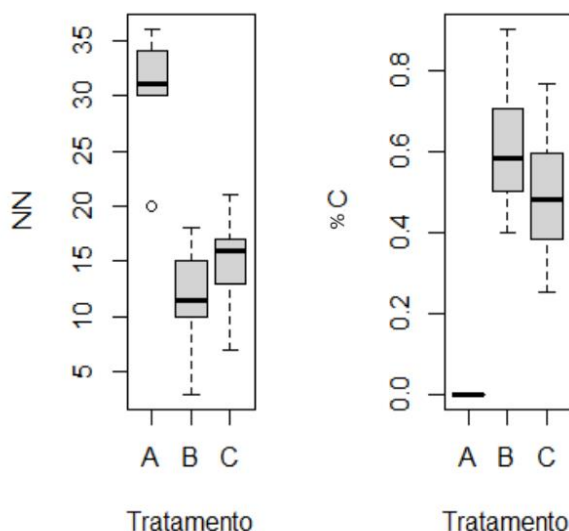
	6			18 _b	50% _b
S2038	1	24 h	cry11	15 _b	25% _b
	2			13 _b	59,375% _b
	3			21 _b	38,23% _b
	4			17 _b	43,33% _b
	5			7 _b	76,66% _b
	6			17 _b	52,77% _b

NN: Número de nematóides vivos. %C: Porcentagem de mortalidade em relação ao controle. _{a,b}: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

Na figura 5 é possível verificar um diagrama de caixa do experimento 1 o qual permite visualizar a distribuição dos dados. Com relação a Cry6, de acordo com Yu e coautores (2014), essa toxina apresenta mortalidade clara contra *C. elegans* que foi comprovado nesse estudo. Com 24 h de aplicação do tratamento com a toxina, houve uma letalidade média de 60% (FIGURA 5).

Figura 5: Visualização dos dados NN e %C, após 24h, em diagrama de caixa.

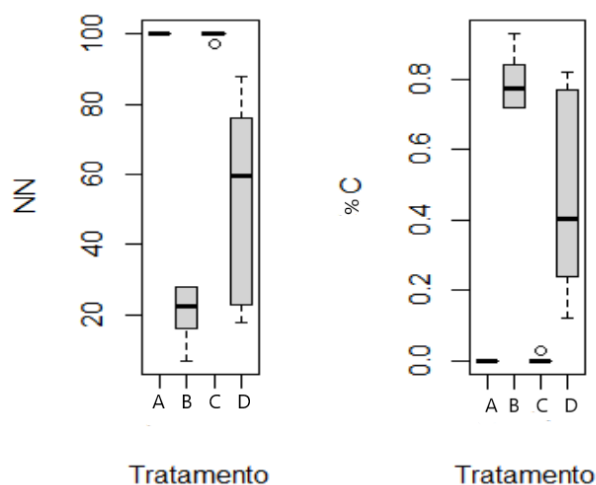


NN: Número de nematóides vivos. %C: Porcentagem de mortalidade em relação ao controle. A: controle solução salina M9; B: S2493 - Cry6; C: S2038 - Cry11

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Quando o tempo de tratamento foi estendido para 72 h, obteve-se que a Cry6 intoxica os nematóides em comparação ao tratamento controle gerando uma mortalidade média de cerca de 80%, ou seja, maior que a porcentagem obtida com 24 h de experimento (FIGURA 6).

Figura 6: Visualização dos dados NN e %C, após 72h, em diagrama de caixa.



NN: Número de nematóides vivos. %C: Porcentagem de mortalidade em relação ao controle. A: controle solução salina M9; B: S2493 - Cry6; C: S2038 - Cry11

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

De acordo com a portaria nº 48 de 12 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), para um anti-helmíntico ser considerado moderadamente efetivo e, portanto, registrável, sua eficácia deve ser de no mínimo 80%. Diante desse dado, é possível levantar a hipótese de que a Cry6 possui um potencial nematicida capaz de ser registrado pelo MAPA. Além disso, a literatura também confirma a efetividade da Cry6 contra nematoides como é relatado por Cebolla (2018), Verduzco-Rosas e colaboradores (2021) e o TOXITAXI (<http://www.combio.pl/toxitaxi/>), uma base de dados universal dedicada a reunir e analisar os resultados de bioensaios existentes acerca da atividade biocida de toxinas Cry e outros oriundos dos mais diversos grupos taxonômicos. Segundo estudos de Yu e coautores (2014), a Cry6 poderia também ser utilizada em sinergismo com a Cry5B para aumentar a sua atividade nematicida. Essa possibilidade pode ser explorada futuramente para auxílio no tratamento de doenças helmínticas.

Já o grupo Cry11 não apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao controle negativo (FIGURA 7). Estudos realizados por De Lara e colaboradores (2016) documentam o funcionamento nematicida de proteínas cristais como a Cry11.

No estudo supracitado, foi testada a forma nativa Cry11Aa expressa pelo bacilo e sua forma recombinante expressa por *Escherichia coli* (*E. coli*) em larvas de *H. contortus* e conclui-se, de maneira geral, que a toxina Cry11 possui efeitos contra tal nematoide quando presentes em suspensão de esporo-cristal. Todavia, esse é o único estudo registrando a ação da Cry11 em nematoides. Perante o restante da literatura, sobretudo para autores como Florez e seus colaboradores (2018) e Cebolla (2018), a toxina Cry11 possui ação apenas em insetos da ordem *Diptera* o que corrobora com o resultado dessa pesquisa que a toxina Cry11 não apresenta ação eficiente em nematoides.

Apesar do resultado negativo obtido com a toxina Cry11, ainda é possível concluir que o fator nematicida ocasionado pelo Bt não é oriundo de outros mecanismos da bactéria uma vez que, com a proteína Cry6, o resultado obtido foi estatisticamente diferente. E assim, pôde servir como um controle positivo para análises a respeito do efeito nematicida observado é relativo à bactéria em si ou à toxina expressa.

O resultado preliminar obtido com 24h de bioensaio, com relação a Cry11, merece ser analisado com cautela uma vez que possivelmente houve alguma dificuldade técnica em relação a essa amostra já que, como discutido anteriormente, não há ação nematicida documentada e replicada com sucesso na literatura com essa toxina.

Com relação à sinergia entre as proteínas Cry deste estudo, não houve diferença estatística entre o tratamento com as proteínas alvo sozinhas com o tratamento entre elas combinadas (TABELA 2). Provavelmente, houve letalidade no sinergismo em função da ação da Cry6 uma vez que a Cry11 não apresentou atividade quando aplicada sozinha.

Tabela 2: Resultados do experimento após 72h.

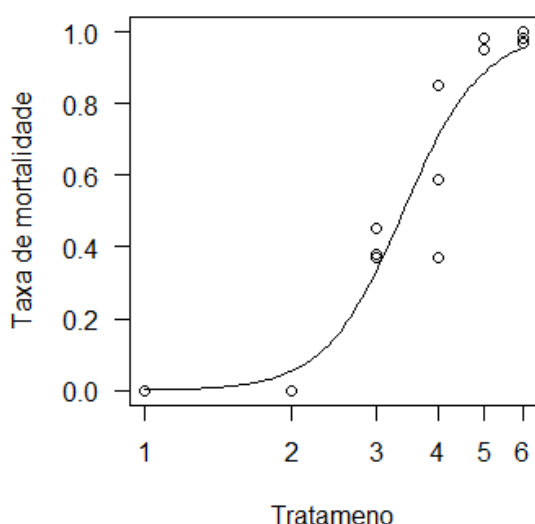
Tratamento	Replicata	Tempo	Gene cry	NN	%C
Controle solução salina M9	1	72h	-	100 _a	0% _a
	2			100 _a	0% _a
	3			100 _a	0% _a
	4			100 _a	0% _a
	5			100 _a	0% _a
	6			100 _a	0% _a
S2493	1	72h	cry6	28 _{bc}	72% _{bc}
	2			16 _{bc}	84% _{bc}
	3			27 _{bc}	73% _{bc}
	4			18 _{bc}	82% _{bc}
	5			28 _{bc}	72% _{bc}
	6			7 _{bc}	93% _{bc}
S2038	1	72h	cry11	100 _{ac}	0% _{ac}
	2			97 _{ac}	3% _{ac}
	3			100 _{ac}	0% _{ac}
	4			100 _{ac}	0% _{ac}
	5			100 _{ac}	0% _{ac}
	6			100 _{ac}	0% _{ac}
Sinergismo	1	72h	50% cry6 + 50% cry11	18 _c	82% _c
	2			65 _c	35% _c
	3			88 _c	12% _c
	4			76 _c	24% _c
	5			23 _c	77% _c
	6			54 _c	46% _c

NN: Número de nematóides vivos. %C: Porcentagem de mortalidade em relação ao controle. a,b,c: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

Em relação ao bioensaio com a proteína Cry6 purificada quando utilizado a concentração de 68,4 ppm (68400 ng/mL), não houve mortalidade dos nematóides, entretanto, observou-se um efeito dose dependente em que com o aumento dessa, houve a maior letalidade de *C. elegans*. Segundo cálculos realizados no programa Rstudio, a concentração necessária para a mortalidade de 50% da população de namatoides corresponde, neste estudo, a 173,51 ppm (173512,1 ng/mL). A dose de 200 ppm (200000 ng/mL) foi a que alcançou a maior mortalidade (85%) o que não corrobora com a literatura em que, perante dados do TOXITAXI, quando aplicada sozinha sob concentração de cerca de 16,3 ppm (16302 ng/mL) há a mortalidade de 50% dos helmintos no meio. Provavelmente, as estirpes de *C. elegans* utilizadas nesse experimento apresentavam alguma resistência à toxina estudada logo foram necessárias altas dosagens para garantir um efeito nematicida satisfatório (FIGURA 7).

Figura 7: Gráfico CL50 para a proteína purificada Cry6..



No eixo X: 1 = Controle negativo solução salina M9; 2 = 68,4 ppm; 3 = 150 ppm; 4 = 200 ppm; 5 = Controle positivo S2577; 6 = Controle positivo S2792.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Essa possibilidade supracitada pode ser atribuída ao fato da colônia de nematoides utilizada ser oriunda de um mesmo clone utilizado a mais de 10 anos no laboratório e, por seleção natural além do fato de nunca ter sido introduzido novos indivíduos ao meio, perpetua-se o genoma resistente. Apesar dessa hipótese, a eficácia da Cry6 em namatoides é notável. Além disso, uma vez que o mecanismo de ação dos anti-helmínticos é distinto do mecanismo adotado pelo Bt dificilmente há uma resistência cruzada entre o medicamento e a toxina Cry (CAPPELLO et al, 2006; FISSIHA; KINDE, 2021).

Como o experimento com a solução esporo-cristal da Cry11 não obteve resultados positivos, essa proteína não foi utilizada para cálculos de concentração letal.

4. CONCLUSÃO

Por intermédio desta pesquisa foi possível concluir que a proteína Cry11 não possui efeitos nematicidas enquanto a proteína Cry6 na dosagem de 173,51 ppm (173512,1 ng/mL) é eficaz no controle de *C. elegans*.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita Regina e Odorico Andrade, por acreditarem em todo meu potencial e me incentivarem a cada dia me tornar a melhor versão de mim mesma.

A minha grande amiga, Elaine Barros. Crescer significa mudar e mudar envolve riscos. É uma passagem do conhecido para o desconhecido. Por isso, obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e na minha evolução como pessoa ao longo do curso. Sem você, essa longa jornada teria sido solitária e provavelmente não seria possível.

Aos meus gatos, sobretudo Lenny e Loki, cujo amor e carinho proporcionados de maneiras únicas, após cada longo dia de trabalho, me fez ter esperanças de continuar. Vocês são um dos seres mais preciosos que apareceram na minha vida

Ao meu namorado extraordinário e sua família igualmente maravilhosa que me acolheram mesmo diante da bagunça que me cerca e me fizeram sentir especial e amada.

Aos meus orientadores Dr. Eduardo de Oliveira Melo e Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz por compartilharem seus conhecimentos sendo sempre atenciosos e demonstrando grande carinho e paciência. Meus sinceros agradecimentos.

A Dra. Bárbara Eckstein por ter me acolhido com amabilidade em seu laboratório, permitindo que essa pesquisa fosse possível de ser realizada.

A todos do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, pelas risadas e lágrimas que foram compartilhadas, pelos conselhos, ensinamentos e toda amizade que foi proporcionada ao longo desse período que estive trabalhado com vocês.

A todos do Laboratório de Reprodução Animal por toda paciência e aprendizado que me foi possibilitada ao longo desses 3 anos que estive neste local.

Aos meus amigos por toda alegria que me ofereceram e por terem aguentado cada surto meu ao longo dessa jornada.

E não menos importante, ao meu computador, o qual aguentou fortemente durante toda a execução desta monografia. Sem ele, seria impossível consultar tantos documentos para produzir esta pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEROVIČ, M. Sterilization in Biotechnology. Em: **Comprehensive Biotechnology**. 2 ed. ed. United States: Elsevier, 2011. p. 135–150.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. ABASTECIMENTO. **PORTARIA Nº 48, DE 12 DE MAIO DE 1997**. Portaria. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/portaria/portaria-sda-mapa-no-48-de-12-05-1997.pdf>. Acesso em: nov. 2023
- CAPPELLO, M. et al. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. **PNAS**, v. 103, n. 41, 2006.
- CEBOLLA, J. G. **Mining of new insecticidal protein genes plus determination of the insecticidal spectrum and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Vip3Ca protein**. [s.l.] University of Valencia, 2018.
- CHAGAS, A. C. DE S. et al. Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 31, n. 3, 2022.
- CHUNG, D. D. L. Cement-Matrix Composites. Em: **Carbon Composites**. 2 ed. ed. United States: Elsevier Inc., 2017. p. 333–386.
- DE LARA, A. P. D. S. S. et al. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1665–71, out. 2016.
- DEMENTIEV, A. et al. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. **BMC Biology**, v. 14, n. 1, 30 ago. 2016.
- FISSIHA, W.; KINDE, M. Z. **Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. Infection and Drug Resistance** Dove Medical Press Ltd, , 2021.
- FLOREZ, A. M. et al. Toxic activity, molecular modeling and docking simulations of *Bacillus thuringiensis* Cry11 toxin variants obtained via DNA shuffling. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 17 out. 2018.
- GAINZA, Y. A. et al. Anthelmintic resistance of *haemonchus contortus* from sheep flocks in brazil: Concordance of in vivo and in vitro (resista-test©) methods. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 30, n. 2, 2021.
- HU, Y. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, mar. 2010.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br> Acesso em: out. 2023
- LÓPEZ, M. E. et al. **Use of *Bacillus thuringiensis* toxin as an alternative method of control against *Haemonchus contortus***. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais...**Blackwell Publishing Inc., 2006.
- MILLER, C. M. et al. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 376–381, 25 maio 2012.
- MORAND-FEHR, P.; BOYAZOGLU, J. Present state and future outlook of the small ruminant sector. **Small Ruminant Research**, v. 34, p. 175–188, 1999.

PERES, P. E. C. et al. Effect of phenylmethylsulfonyl fluoride, a protease inhibitor, on enamel surface remineralization. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 22, 2023.

RASCHKE, S.; GUAN, J.; ILIAKIS, G. Application of alkaline sucrose gradient centrifugation in the analysis of DNA replication after DNA damage. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 521, p. 329–42, 2009.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. DE P. **Panorama da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrointestinais de pequenos ruminantes no Brasil**. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** Brazilain Coll Veterinary Parasitology, , 1 jan. 2016.

SANDERS, J. et al. A new paraprobiotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 230–236, 1 dez. 2020.

VERDUZCO-ROSAS, L. A. et al. Selection and characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains showing nematocidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 5, 1 mar. 2021.

YU, Z. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry6A exhibits nematocidal activity to *Caenorhabditis elegans* *bre* mutants and synergistic activity with Cry5B to *C. elegans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 511–519, jun. 2014.

ZAJAC, A. M.; GARZA, J. **Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants**. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice** W.B. Saunders, , 1 mar. 2020.

ANEXOS

7.1. ANEXO 1 - Tampão TTN (100mL)

1,0mL de Triton X-100 a 1% (concentração final 0,1%)
5mL de Tris HCL 1M pH 8 (concentração final 0,05M)
200µl de NaCl 5M (concentração final 0,01M).
93,8mL de dH₂O

7.2. ANEXO 2 - Gradiente de sacarose

Usar concentrações de 84%, 79%, 72% e 69%. Usar a concentração de 90% somente para cristais muito grandes e pesados.

	90%	84%	79%	72%	69%
Sacarose	36g	33,6g	31,6g	28,8g	26,8g
Água miliQ	10mL	12,4mL	14,4mL	17,2mL	19,2mL
AQUECER					
Triton X-100 a 1%	400µl	400µl	400µl	400µl	400µl
Tris HCl 1M pH 8	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL
NaCl 5M	80µl	80µl	80µl	80µl	80µl
Água miliQ	Completar o volume até 40mL				

Não montar o gradiente assim que a sacarose tiver sido derretida, deve-se incubar cada solução de sacarose por 30 min a 4°C.

O gradiente deve ser montado cuidadosamente para que as bandas não se misturem, seguindo a ordem abaixo:

- 4º - 69%
- 3º - 72%
- 2º - 79%
- 1º - 84%

7.3. ANEXO 3 - NGM (300 mL)

- CaCl₂ 1M
- Colesterol 5 mg/mL
- MgSO₄ 1M

- Tampão fosfato 1M
- 0,9g de NaCl
- 5,1g de ágar
- 0,75g de peptona
- 292,5mL de H₂O destilada

7.4. ANEXO 4 – Solução salina M9 (500 mL)

- 1,5g de KH₂PO₄
- 3g de Na₂HPO₄
- 2,5g de NaCl
- 0,5mL MgSO₄ 1M
- 500mL dH₂O