



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero

ROBERTO FRANCO TEIXEIRA CORRÊA

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Avaliação da Toxicidade de Proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero

ROBERTO FRANCO TEIXEIRA CORRÊA

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biologia para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2012

À minha família

Aos meus amigos e amados

Ao meu orientador, Professor Bergmann

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me incentivou e esteve presente, independente da distância.

À minha mãe, pai, Tjowe, Flavio e Carol por existirem.

Aos meus amigos das conversas, das cervejas, da música, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia, do Laboratório de Bacteriologia do CENARGEN, da vida...

Ao Professor Bergmann, obrigado pela oportunidade e pela orientação.

Ao companheiro Daniel Ardisson pelas diversas horas em que prestou sua solidariedade a mim e minha pesquisa.

Aos professores Edvaldo Ximenes, Carlos André, Marlene de Souza e Renato Rezende de Oliveira pelas importantes contribuições dadas como membros da banca de qualificação de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Apoio à Pesquisa–DF (FAPDF) incentivo aos projetos desenvolvidos no Laboratório de Virologia da UnB

À universidade de Brasília, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Brasil.

ÍNDICE

Conteúdo

AGRADECIMENTOS.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ABREVIACÕES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1-INTRODUÇÃO.....	14
1.1-Revisão bibliográfica	14
1.1.1-Bacillus thuringiensis.....	15
1.1.2-Toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	20
1.1.3- α -exotoxinas	21
1.1.4- β -exotoxina	21
1.1.5-Toxinas VIP	22
1.1.6-Parasporinas.....	23
1.1.7- δ -endotoxinas (Proteínas Cry e Cyt)	24
1.1.7.1-Estrutura tridimensional das proteínas Cry	28
1.1.7.2-Modo de ação das proteínas Cry	30
1.1.7.2.1-Ligação ao receptor.....	33
1.1.7.3-Proteínas Cyt.....	36
1.1.7.3.1-Modo de ação das proteínas Cyt	39
1.1.7.4-Sinergismo entre proteínas Cyt e Cry	40
1.1.7.5-Regulação da expressão das δ -endotoxinas	42
1.1.7.6-Expressão de genes dependentes da esporulação	42
1.1.7.7-Genes não dependentes da esporulação	44
1.1.7.8-Mecanismos pós-transcricionais.....	44
1.1.8- <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	45
1.1.8.1- δ -endotoxinas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	47
1.1.9-Baculovírus.....	50

1.1.9.1-Classificação dos baculovírus.....	51
1.1.9.2-Modo de infecção	53
1.1.9.3-Baculovírus como vetor de expressão	56
2-OBJETIVOS.....	61
2.1-Geral.....	61
2.2-Específicos.....	61
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.1-Vírus e células	63
3.2-Extração do DNA plasmidial das estirpes S-1989 e S-1806 de <i>B. thuringiensis</i>	64
3.3-Amplificação, clonagem e sequenciamento dos genes <i>cyt2BaNcol</i> e <i>cyt2BaHisBamHI</i>	65
3.4-Construção dos vetores de transferência contendo os genes <i>cyt2BaNcol</i> e <i>cyt2BaHisBamHI</i>	66
3.5-Construção dos vetores de expressão contendo os genes <i>cyt2BaHisBamHI</i> , <i>cry4Aa</i> , <i>cry11A</i> e para transformação de <i>B. thuringiensis</i>	68
3.6-Construção, por transposição sítio-específica, de baculovírus recombinantes contendo os genes <i>cyt2BaNcol</i> e <i>cyt2BaHisBamHI</i>	70
3.7-Obtenção de cepas de <i>B. thuringiensis</i> contendo os genes <i>cyt2BaHisBamHI</i> , <i>cry4Aa</i> e <i>cry11A</i>	71
3.8-Expressão da proteína Cyt2BaNcol por baculovírus recombinante.	72
3.9- Expressão, purificação e solubilização das proteínas Cry e Cyt de <i>B. thuringiensis</i>	73
3.10-Imunodeteccção das proteínas Cyt2BaNcol e Cyt2BaHisBamHI.....	74
3.11-Ativação das protoxinas	75
3.12-Ensaio de citotoxicidade	76
4-RESULTOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1-Clonagem do gene <i>cyt2BaNcol</i> da estirpe S-1806 de <i>B. thuringiensis</i>	78
4.2-Clonagem do gene <i>cyt2BaHisBamHI</i> da estirpe S-1989 de <i>B. thuringiensis</i>	80
4.3-Construção dos vetores de transferência e dos baculovírus recombinantes.....	82
4.4-Clonagem dos genes <i>cyt2BaHisBamHI</i> , <i>cry4Aa</i> e <i>cry11A</i> no vetor de expressão pSVP27A e obtenção de cepas de <i>B. thuringiensis</i> recombinantes.	87
4.5-Análise da expressão da proteína PolhCyt2BaHis utilizando-se o sistema de expressão em baculovírus em células de inseto.	90
4.6-Análise da expressão das proteínas Cry4Aa, Cry11Aa, Cyt2Ba expressas em <i>B. thuringiensis</i> recombinantes.	92
4.7-Deteccção da expressão da proteína Cyt2BaHis expressas em <i>B. thuringiensis</i> por <i>Westernblot</i>	93

4.8-Toxicidade das proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry11A para culturas de células de Diptera e Lepidoptera	94
4.9-Análise da citotoxicidade de Cyt2Ba para células de inseto.....	96
4.10-A análise da incubação de Cry e Cyt juntas pode sugerir interação entre estas toxinas em ensaios de citotoxicidade	98
4.11-Proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry11A perdem atividade quando processadas com suco gástrico de Lepidoptera	99
4.12-A atividade citotóxica de Cry4Aa e Cry11A em uma linhagem celular de mamífero é dependente da presença de Cyt2Ba	101
5-CONCLUSÃO.....	106
6-PERSPECTIVAS.....	108
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de contraste de fase e eletrônica do <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> ..	18
Figura 2. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry	28
Figura 3. Representação da estrutura terciária baseada na modelagem da toxina Cry4Aa	30
Figura 4. Esquema da ativação proteolítica de algumas proteínas Cry	322
Figura 5. Receptores moleculares da proteína Cry1Aa	34
Figura 6. Representação esquemática do modo de ação de toxinas Cry de <i>B. thuringiensis</i>	36
Figura 7. Representação esquemática da estrutura da toxina Cyt1Aa (Butko, 2003)	38
Figura 8. Representação esquemática das hipóteses do modo de ação das proteínas	40
Figura 9. Representação circular do pBtoxis.....	46
Figura 10. Ultraestrutura de um baculovírus.....	53
Figura 11. Início de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus	54
Figura 12. Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção <i>in vivo</i> de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus	55
Figura 13. Esquema ilustrativo da construção e isolamento de baculovírus recombinantes pelo método de recombinação homóloga.....	59
Figura 14. Esquema ilustrativo da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição (adaptado do Kit Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen)	60
Figura 15. Mapa físico dos vetores de transferência usados para produção de baculovírus recombinantes	68
Figura 16. Mapa físico do vetor de expressão, pSVP27A, usado para expressão de proteínas heterólogas em <i>B. thuringiensis</i>	69
Figura 17. Clonagem do gene <i>cyt2BaNco I</i> no vetor de clonagem pGem®-Teasy	79
Figura 18. Análise da seqüência do gene <i>cry2Ba</i>	80
Figura 19. Clonagem do gene <i>cyt2BaHisBamHI</i> no vetor de clonagem pGem®-Teasy	81
Figura 20. Análise da seqüência do gene <i>cry2BaHisBamHI</i>	82
Figura 21. Construção do vetor de transferência pFastPH3 <i>cyt2BaNcoIHis</i> e confirmação da clonagem	83
Figura 22. Clonagem do gene <i>cyt2BaHisBamHI</i> no vetor de transferência para o genoma de baculovírus	84
Figura 23. Confirmação das construções dos baculovírus recombinantes	86
Figura 24. Construção dos vetores de expressão em células de <i>B. thuringiensis</i>	88
Figura 25. Confirmação da construção dos vetores de expressão em células de <i>B. thuringiensis</i>	89
Figura 26. Confirmação da transformação de <i>B. thuringiensis</i> com os vetores contruídos	90
Figura 27. Análise da expressão da proteína PolhCyt2Ba em células de inseto.	91
Figura 28. Análise em SDS-PAGE da expressão de Cry11A, Cry4Aa e Cyt2BaHis em cepas de <i>B. thuringiensis</i> recombinantes	93
Figura 29. Imunomarcagem da proteína Cyt2BaHis expressa em <i>B. thuringiensis</i>	94
Figura 30. Análise dos ensaios de citotoxicidade Cry4Aa e Cry11A em células de inseto.....	96
Figura 31. Ativação de Cyt2BaHis e análise dos ensaios de citotoxicidade de Cyt2Ba em células de inseto	97

Figura 32. Análise dos ensaios de citotoxicidade das combinações de Cyt2Ba com as toxinas Cry4Aa e Cry11A em células de inseto	99
Figura 33. Análise por SDS-PAGE da ativação proteolítica de Cry4Aa e Cry11A.....	101
Figura 34. Análise <i>in vitro</i> da atividade tóxica de Cry e Cyt para células humanas MCF-7....	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação e divisão das proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> proposta pelo comitê internacional de 1993.....	26
Tabela 2 Classificação e divisão das proteínas Cyt de <i>B. thuringiensis</i> proposta pelo comitê internacional de 1993.....	37
Tabela 3-Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.	66
Tabela 4- Porcentagem de células mortas de mamífero e inseto em ensaios de citotoxicidade para células não tratadas/tratadas, ou células incubadas com tripsina ou suco gástrico (GJ) obtido de extrato de intestino de Lepidoptera, ou com cada uma das protoxinas ativadas com GJ.....	103

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Amp	resistente à ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
BtI	promotores de <i>B. thuringiensis</i>
cDNA	DNA complementar
EDTA	cido etilenodiaminotetraacético
EGTA	cido etilenoglicol tetraacético
dH ₂ O	gua destilada
dNTP	Desoxinucleotídeos
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
Gentam.	Gentamicina (antibiotico)
h.p.i.	horas pós-infecção
kb	quilobase = 1000 pares de base
kDa	quilodalton
µl	microlitro
M	molar: mol/L
mg	miligrama
µg	micrograma = 10 ⁻⁶ grama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma = 10 ⁻⁹ grama
pb	pares de base
PCR	reação de polimerase em cadeia
pH	potencial de hidrogênio

pfu	unidade formadora de placa
PMSF	fenilmetanosulfonilfluoreto (inibidor de proteases)
Ppolh	promotor do gene da poliedrina
pSynXIVVI+X3	vetor de transferência para recombinação homóloga
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS
Tn7L e Tn7R	elementos de transposição sítio-específica
Tris	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
U	unidade enzimáticav
vSynVI-gal	vírus com gene β -galactosidase no lócus do gene da poliedrina

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva que produz proteínas formadoras de cristal ou δ -endotoxinas que compreendem as toxinas Cry, com atividade inseticida específica, e Cyt, com atividade citolítica inespecífica. Diferentes δ -endotoxinas mostram-se específicas para diferentes insetos-alvos. Esta especificidade deve-se a receptores de membrana distintos nas células do intestino dos insetos e à presença de diferentes proteases próprias dos insetos, necessárias para ativação proteolítica da prótoxina produzida na fase de esporulação do *B. thuringiensis*. Os genes *cry4Aa*, *cry11A* e *cyt2Ba* foram amplificados por PCR a partir das estirpes de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, S-1989 ou S-1806. Os produtos das PCR foram clonados em um vetor de expressão em *B. thuringiensis*, pSVP27A. O gene *cyt2Ba* foi também clonado em vetores de transferência para construção de baculovírus recombinantes para expressão da proteína Cyt2Ba nativa ou fusionada à proteína Poliedrina. Estirpes de *B. thuringiensis* acristalíferas foram usadas para expressão individual das proteínas. Após purificação e solubilização das proteínas heterólogas, as mesmas foram ativadas com tripsina ou suco gástrico de *Spodoptera frugiperda*, para a realização de ensaios de atividade em culturas de células de Lepidoptera, Diptera e mamífero. Foram usados, nos ensaios de citotoxicidade, 20 $\mu\text{g/mL}$ de cada toxina Cry individual ou em combinações e 20 $\mu\text{g/mL}$ ou 5 $\mu\text{g/mL}$ da toxina Cyt2Ba. Atividades tóxicas das toxinas heterólogas ativadas por tripsina foram detectadas para todas as linhagens de células de insetos testadas, fato que não ocorreu após ativação das mesmas toxinas com suco gástrico de *S. frugiperda*. Para células humanas, apenas Cyt2Ba mostrou-se tóxica. Entretanto, a combinação entre Cyt2Ba e as toxinas Cry4Aa e Cry11A apresentou citotoxicidade maior que Cyt2Ba isoladamente, o que pode sugerir que Cyt2Ba funcione como receptor para Cry4Aa e Cry11A em células humanas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that produces crystal forming proteins, δ -endotoxins, which consist of Cry toxins harboring specific insecticidal activity, and Cyt toxins that contain non-specific cytolytic activity. Different δ -endotoxins are specific to different target insects. This specificity is due to distinct membrane receptors on the surface of the insect's midgut cells and to the presence of different host's proteases, which are necessary to proteolytic activation of the protoxin expressed during *B. thuringiensis* sporulation phase. The *cry4Aa*, *Cry11A* and *cyt2Ba* genes were amplified from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Brazilian strains, S-1989 or S-1806 by PCR. The PCR products were cloned into the *B. thuringiensis* expression vector, pSVP27A. The *cyt2Ba* gene was also cloned into transfer vectors to allow construction of recombinant baculoviruses, in order to express the native Cyt2Ba protein, or Cyt2Ba fused to the Polyhedrin protein. Acrysaliferous *B. thuringiensis* strains were used for the expression of the proteins individually. After purification and solubilization of the heterologous proteins, toxin activation by either trypsin or *Spodoptera frugiperda*'s gastric juice was carried out to perform cytotoxicity assays using Lepidopteran, Dipteran and human cultured cells. Each Cry toxin was used at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$, while Cyt2Ba was used at two different concentrations: 20 $\mu\text{g/mL}$ or 5 $\mu\text{g/mL}$. Cytotoxic activities of the trypsin activated heterologous proteins were detected to all insect cell lines tested, but when the same proteins were digested by *S. frugiperda*'s gastric juice, no toxic activities were detected. Only Cyt2Ba was shown to be toxic to the human cells tested. Nevertheless, the combination of Cyt2Ba and both *Cry4Aa* and *Cry11A* toxins yielded a higher toxicity than that produced by Cyt2Ba isolatedly, which could suggest that Cyt2Ba could be functioning as a receptor for *Cry4Aa* and *Cry11A* on the surface of human cells.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Revisão bibliográfica

Insetos têm sido agentes causadores de danos de grande relevância na agricultura, sendo responsáveis por perdas na produção de alimentos a cada ano (Estruch *et al.*, 1997). Acredita-se que cerca de sessenta e sete mil espécies causem danos a plantações, principalmente em regiões tropicais, já que estas sofrem mais com a maior diversidade de insetos-praga (Herrera-Estrella, 1999). O uso de inseticidas químicos para a proteção das culturas produz um investimento comercial global de inseticidas de alto custo que gira em torno de US\$ 28 bilhões. No Brasil, este valor corresponde anualmente a US\$ 7 bilhões (ANVISA, 2009). A busca por métodos alternativos para o controle de insetos-praga tem sido realizada com exaustão por centros de pesquisa mundo a fora no intuito de gerar uma agricultura mais sustentável e desenvolvida com uma maior preocupação com a preservação do meio ambiente.

Do mesmo modo, o controle de insetos vetores de doenças humanas é um dos aspectos mais relevantes em saúde pública, na atualidade, principalmente nos grandes centros urbanos com crescimento demográfico não controlado e a falta de saneamento básico adequado (WHO, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o mosquito é o mais perigoso de todos os insetos vetores, pois é o transmissor da malária, da dengue e da febre amarela. Essas doenças, combinadas, matam todo ano, milhões de pessoas e fazem adoecer outras centenas de milhões. Pelo menos 40% da população mundial corre risco de contrair malária, e cerca de 40% de contrair dengue. Em muitos lugares, as pessoas podem contrair ambas as doenças.

O termo controle biológico foi empregado pela primeira vez em 1919 por H.S. Smith, para designar o uso de inimigos naturais para o controle de insetos-praga.

Posteriormente, essa expressão foi usada para designar todas as formas de controle, alternativas aos produtos químicos, que envolvessem métodos biológicos.

A utilização do controle biológico tem-se mostrado promissora pela segurança e eficiência que oferece e, principalmente, por ser alternativa economicamente viável e socialmente desejável (Cook, 1993).

Neste início de milênio, o Brasil se encontra com todas as condições para se consagrar como um dos principais pólos mundiais de pesquisa, desenvolvimento e uso de agentes de controle biológico de pragas e de vetores de doenças. A sua rica biodiversidade, sem dúvida, facilita a busca de inimigos naturais que podem ser empregados no controle de plantas daninhas, nematóides, microrganismos, insetos-praga, e, mais ainda, no controle de insetos-vetores de doenças humanas e de animais. Tradicionalmente, o controle químico tem sido o principal método de controle desses agentes etiológicos, mas o meio ambiente tem sofrido consequências nocivas com a utilização descontrolada dos pesticidas químicos. Em contrapartida, a crescente demanda pela proteção ambiental tem incentivado a busca e a adoção de métodos alternativos de controle e erradicação de pragas e doenças. Neste contexto, o levantamento, coleta, isolamento, identificação, caracterização, seleção de inimigos naturais e sua conservação são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento do controle biológico.

1.1.1-*Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria largamente empregada no controle biológico de insetos-praga e insetos vetores de doenças humanas, Gram positiva, ubíqua, aeróbia facultativa, esporulante, que produz inclusões protéicas cristalinas

durante sua esporulação, na fase estacionária de seu ciclo de crescimento (Schnepf *et al.*, 1998). Esta espécie possui estruturas de locomoção denominadas flagelos peritríquios, que são compostos por um grupo de proteínas imunogênicas chamadas flagelinas, que possibilitam a obtenção de anticorpos, antígenos-H (de Barjac & Frachon, 1990). Os anticorpos obtidos para as diferentes flagelinas permitem realizar reações de aglutinação *in vitro* que distinguem as sorovariedades de *B. thuringiensis* (Lecadet *et al.*, 1999; Rabinovitch *et al.*, 2000). Esta classificação baseada em antígenos-H flagelares, possui, no entanto, duas limitações para linhagens que não possuem inclusões paraesporais e linhagens autoaglutinadas, como descrito por Lecadet e colaboradores (1999). Algumas linhagens de *B. cereus* possuem antígenos que reagem cruzadamente com soros específicos para sorotipos-H de *B. thuringiensis* (de Barjac & Bonnefoi, 1973), e tais linhagens podem ter tido origem a partir de *B. thuringiensis* ancestrais que perderam plasmídeos responsáveis pela expressão de cristais (Lecadet *et al.*, 1999). As linhagens autoaglutinadas perfazem quase 3% da coleção de *B. thuringiensis* do Centro Internacional de *Bacillus* entomopatogênicos (Burges *et al.*, 1982), no Instituto Pasteur, Paris, França. Entretanto, a classificação-H é totalmente inútil para estas linhagens. Além disso, algumas linhagens de *B. thuringiensis* sem locomoção, tal com *B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis* também escapam da sorotipagem-H (de Barjac & Frachon, 1990).

O *B. thuringiensis* pertence à família *Bacillaceae* e apresenta-se na forma de bastões isolados, aos pares ou em cadeias com tamanhos que variam entre 0,5 a 2,5µm de largura e 1,2 a 10µm de comprimento (Miralles & Peres, 2004) (Figura 1).

Taxonomicamente, *B. thuringiensis* pertence ao gênero *Bacillus* que compreende um amplo grupo de bactérias Gram-positivas formadoras de esporos. Devido à alta homologia genética, os taxonomistas criaram um único grupo denominado *B. cereus*,

que compreende as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* e *B. weihenstephanensis*. Tradicionalmente, esses organismos têm sido diferenciados baseado em suas características fenotípicas. Apesar do fato de que as quatro primeiras espécies compartilhem uma variedade de genes de virulência, há pouca evidência que indique que *B. thuringiensis* possua patogenicidade a mamíferos, e produtos à base de *B. thuringiensis* possuem um histórico de uso seguro (Crickmore, 2005). Por definição, *B. thuringiensis* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (Luthy & Wolfersberger, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase, embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (Lysenko, 1983). Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídios, comparação da seqüência 16S rRNA, entre outros, mostram que as duas espécies, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, são na verdade, somente uma. Esta semelhança é devido à transferência de plasmídeos que codificam as proteínas formadoras de cristal, Cry, de *B. thuringiensis* para *B. cereus* e, por outro lado, *B. thuringiensis* pode perder a capacidade de produzir estas toxinas, tornando-se *B. cereus*. Portanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Glare & O'Callaghan, 2000; Hansen & Salamitou, 2000; Schnepf *et al.*, 1998). A utilização de metodologias baseadas em PCR, usando seqüências repetitivas de DNA, como por exemplo REP ("Repetitive Extragenic Palindromic"), também referida com rep-PCR, tem-se tornado frequente e permite a comparação de possíveis similaridades genéticas entre genomas bacterianos distintos (Versalovic *et al.*, 1991).

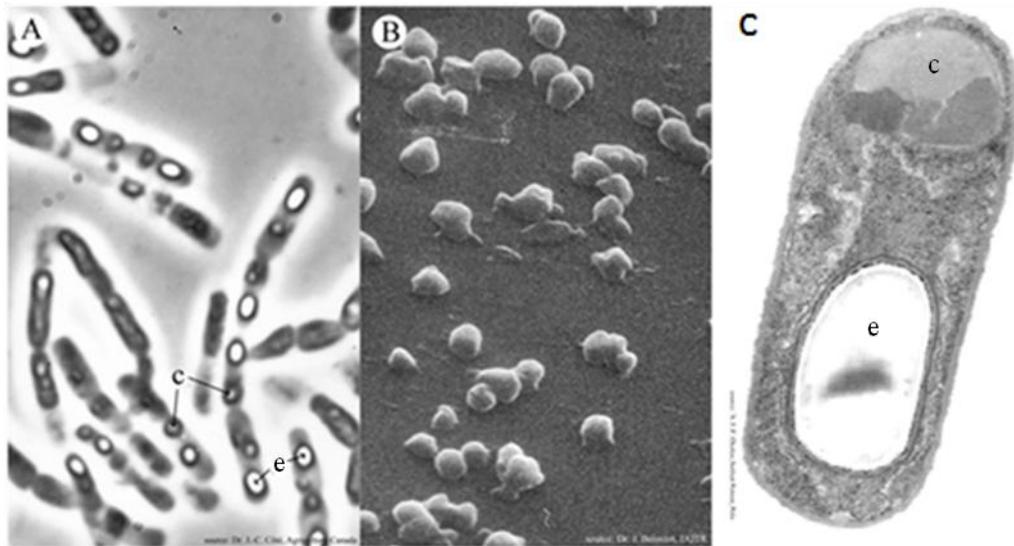


Figura 1. Microscopia de contraste de fase e eletrônica do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. **A**, microscopia de contraste de fase de células esporuladas contendo esporos (e) e cristais (c). **B**, micrografia eletrônica de varredura mostrando cristais purificados. **C**, micrografia eletrônica de transmissão de uma célula de *B. thuringiensis* mostrando: cristais(c) e esporos (e). Adaptado de <http://www.phyteauvergne.ecologie.gouv.fr /article>

A característica marcante que distingue o *B. thuringiensis* de *B. cereus* e *B. anthracis* é a produção de grandes inclusões cristalinas na célula mãe durante a esporulação sob certas condições restritivas de crescimento. Os cristais são formados de δ -endotoxinas que compreendem as proteínas da família Cry, que apresentam atividade inseticida específica, e da família Cyt, com atividade citolítica inespecífica. Em testes laboratoriais, constatou-se que é produzido cerca de 0,5 mg de δ -endotoxinas/mL de meio de cultura, e o tamanho dos cristais indicam que cada célula deve sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de proteína, sendo estas responsáveis por 20-30% do peso seco das células (Lereclus *et al.*, 1989; Arantes *et al.*, 2002).

O *B. thuringiensis* foi, pela primeira vez, descrito por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou um bacilo de larvas mortas da traça da farinha, *Anagasta*

kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae). Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado. Também foi reportada a presença de cristais, porém ainda sem relacioná-los com alguma atividade tóxica a insetos. Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome de *B. thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento deste patógeno. Em 1901, o biólogo Sotto Ischiwata, isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease” a partir de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho da seda) (Lepidoptera: Bombycidae). Esta bactéria foi denominada *B. sotto* Ishiwata, mas este nome não foi mantido, sendo substituído pelo nome *B. thuringiensis* (Glare & O’Callaghan, 2000), podendo ser sistematicamente classificada como: Filo: Firmicutes Classe: Bacilli; Ordem: Bacillales; Família: Bacillaceae; Gênero: *Bacillus*; Espécie: *thuringiensis*.

Em 1920, fazendeiros começaram a utilizar o *B. thuringiensis* como estratégia para o controle de insetos na agricultura e a primeira formulação à base de *B. thuringiensis* foi produzida na França em 1938 (Weisier, 1986; Polanczyk & Alves, 2003). Na década de 1950, inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* passaram a ser fabricados na Rússia, Checoslováquia, Alemanha e Estados Unidos (Martins, 2005). Inicialmente, o produto foi utilizado somente para o controle de lepidópteros, pois a maioria das subespécies descritas era tóxica somente para larvas de insetos dessa ordem (Monnerat & Bravo, 2000). A partir da década de 1970, novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes contra insetos das ordens Diptera, Coleoptera (Weiser, 1986; Edwards *et al.*, 1998), Himenoptera, Homoptera e Ortoptera (Feitelson, 1994). Também foi relatada toxicidade para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (Edwards *et al.*, 1998; Feitelson, 1994). Nos anos 1980, a utilização de *B. thuringiensis* aumentou sensivelmente, sobretudo quando começaram a surgir populações de insetos apresentando alta resistência aos inseticidas químicos convencionais. Além disso,

estudos de cientistas e ambientalistas começaram a relatar os problemas causados pelos produtos químicos ao meio ambiente (Monnerat & Bravo, 2000). Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (Monnerat *et al.*, 2001). O *B. thuringiensis*, como biolarvicida, mostrou-se inócuo em testes que avaliaram o potencial tóxico das toxinas Cry para células de mamíferos, além de organismos vertebrados e invertebrados não-alvo (Thomas & Ellar, 1983). Além das toxinas do cristal, ou δ -endotoxinas, algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem outras toxinas, denominadas exotoxinas, como a α - exotoxina e a β -exotoxina que possuem atividade citolítica para um amplo espectro de ação em insetos e alguns vertebrados. Devido a este fato, os biolarvicidas são obtidos a partir de cepas de *B. thuringiensis* que não produzem α e β -exotoxinas (Polanczyk & Alves, 2003).

1.1.2-Toxinas produzidas por *B. thuringiensis*

O entomopatógeno *B. thuringiensis* também produz outros fatores de virulência, incluindo outras proteínas com atividade tóxica para insetos, como as α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases, além de inclusões sem atividade inseticida, denominadas parasporinas (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 2004). A contribuição de cada fator na virulência da bactéria ainda permanece indeterminada, sendo uma dificuldade estabelecer o espectro tóxico de um isolado que sintetiza mais de uma proteína. Isso porque, quando os fragmentos tóxicos das toxinas que têm como alvo o intestino médio do inseto vão se ligar aos receptores da membrana, ocorre uma competição pelos sítios de ligação, que pode interferir na toxicidade do isolado (Pinto *et al.*, 2009). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a patogenicidade, através da ação sinérgica com as proteínas Cry (Johnson & McGaughey, 1996).

1.1.3- α -exotoxinas

A α -exotoxina é uma toxina termolábil, solúvel em água que possui atividade citolítica agindo sobre os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. Esta enzima é altamente tóxica a alguns insetos, através da administração oral ou intra-hemocélica, entretanto apresenta toxicidade para ratos e outros vertebrados. Esta toxina é encontrada no sobrenadante de algumas culturas, durante a fase logarítmica de crescimento de certas estirpes de *B. thuringiensis*, e atua causando a degeneração e lise de hemócitos (Habib & Andrade, 1998; Hansen & Salamitou, 2000).

A atividade da α -exotoxina para vertebrados se deve ao fato de que esta apresenta uma função enzimática citolítica ao atuar sobre os fosfolípidos que formam as membranas de diversos tipos celulares, mas para que isso ocorra precisa ser ministrada em altas doses. A α -exotoxina é também conhecida como fosfolipase C, lecitinase C ou fosfatidilcolina fosfohidrolase (Faust & Bulla Jr., 1982; Luthy & Ebersol, 1981).

1.1.4- β -exotoxina

Também conhecidas como Thuringiensinas, as β -exotoxinas são termoestáveis, produzidas por certas estirpes de *Bt* durante a fase vegetativa e secretadas no meio de cultura. Existem dois tipos de β -exotoxinas. A toxina tipo I é um análogo do ATP, sendo composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, apresentando massa molecular de 701 Daltons (Farkas *et al.*, 1969). Esta toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP, além de prejudicar a formação do fuso mitótico, sendo altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamitou,

2000). A β -exotoxina do tipo II é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à do tipo I, principalmente para coleópteros. Os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxinas estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa (Levinson *et al.*, 1990).

1.1.5-Toxinas VIP

As toxinas “Vip” (do inglês: *vegetative insecticidal proteins*) são produzidas e secretadas pelas células bacterianas durante a fase vegetativa e foram primeiramente descritas por Estruch e colaboradores (1996). Essas toxinas apresentam atividade tóxica sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas proteínas Cry. As subfamílias Vip1 e Vip2 são componentes de uma proteína binária com atividade inseticida contra *Diabrotica virgivera* e *D. longicornis* (Han *et al.*, 1999; Warren, 1997). As toxinas Vip3 são ativas contra lepidópteros como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*. Seu modo de ação está relacionado à formação de poros na membrana do epitélio do intestino médio (Yu *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo que a Vip3 apresenta toxicidade sobre lepidópteros, a mesma não mostrou efeitos sobre insetos não-alvo (Whitehouse *et al.*, 2007).

Devido à sua atividade inseticida relacionada a *Heliothis zea*, as proteínas Vip3A tem sido expressas em plantas de algodão, conferindo resistência a este inseto (Bommireddy *et al.*, 2000). A variedade transgênica do algodoeiro, Coker 312, contendo o gene vip3A, é produzida comercialmente pela empresa Syngenta®, bem como o “Milho ICP4 Pacha”, uma variedade transgênica de milho e igualmente importante economicamente, que contem o gene vip3A.

Os genes responsáveis pela síntese das proteínas Vip estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com os genes cry (Estruch *et al.*, 1996). As Vip são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em

cultura, antecipando, assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não apenas se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat & Bravo, 2000; Soberón & Bravo, 2002).

1.1.6-Parasporinas

A descoberta de cepas de *B. thuringiensis* que expressavam um novo tipo de proteína paraesporal levou à criação de uma nova categoria de proteínas, as parasporinas, definidas como proteínas bacterianas paraesporais capazes de, discriminadamente, matar células cancerosas (Ohba *et al.*, 2009). As parasporinas constituem um grupo de proteínas formado por quatro famílias: PS1, PS2, PS3 e PS4. As proteínas PS1Aa1 e PS3Aa1 possuem uma estrutura terciária do tipo três-domínios, cujas sequências de aminoácidos contém cinco blocos de regiões conservadas, comumente encontradas em proteínas inseticidas Cry. Entretanto, a homologia encontrada entre as parasporinas e as proteínas Cry é bastante baixa, menor que 25%. As parasporinas das famílias PS2 e PS4 não possuem suas estruturas baseadas em três domínios e, tampouco, os blocos de sequências de aminoácidos conservados. O modo de ação das parasporinas parece ser distinto para cada família. Há evidências de que as proteínas PS2Aa1 e PS3Aa1 aumentam a permeabilidade de células suscetíveis, como demonstrado pelo extravazamento de lactato hidrogenase celular, enquanto que iodeto de propídeo é capaz de adentrar o citoplasma de células tratadas. Já proteína PS1Aa1 leva à degradação de proteínas relacionadas à apoptose, como por exemplo, a procaspase-3, além de diminuir o nível de síntese de DNA (Ohba *et al.*, 2009).

1.1.7- δ -endotoxinas (Proteínas Cry e Cyt)

O *B. thuringiensis* produz, a partir do estágio II da esporulação, durante a fase estacionária, corpos de inclusões protéicos compostos pelas δ -endotoxinas. Estas acumulam-se no compartimento da célula-mãe e, no final da esporulação, são liberadas juntamente com o esporo (Schnepf *et al.*, 1998). As δ -endotoxinas são compostas por dois tipos de proteínas, Cry e Cyt. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas, como, por exemplo, no *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A massa molecular das toxinas Cry está compreendida entre 30 e 140 kDa (Serafini *et al.*, 2002). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib & Andrade, 1998). A habilidade de cristalização das protoxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (Schnepf *et al.*, 1998). Interações complexas como hidrofobicidade, pontes de hidrogênio e, principalmente, pontes dissulfeto, mantem as proteínas associadas e estáveis na inclusão parasporal (Gill *et al.*, 1992). As longas protoxinas Cry, com massa molecular de 130 kDa, são divididas em duas regiões estruturais distintas: a região N-terminal, contendo a toxina ativa, e carboxy-terminal (C- terminal), cuja função ainda não está totalmente elucidada (Höfte & Whiteley, 1989). Alguns estudos demonstram que a porção C-terminal é necessária para a formação do cristal dentro da bactéria (Park *et al.*, 2000; de Maagd *et al.*, 2003; Samir *et al.*, 2006).

As toxinas Cry e Cyt pertencem a um grupo de toxinas formadoras de poros (TFP). Existem dois grupos principais de TFP: as toxinas α -hélice (α -helicoidais), nas quais a região α -hélice forma um poro na membrana, e as toxinas β -barril, que se

inserir na membrana formando um β -barril composto de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas (Parker & Feil, 2005). A primeira classe de TFP inclui as toxinas constituídas de três domínios, Cry, enquanto a segunda classe inclui as toxinas formadoras de β -barril, como as Cyt (Parker & Feil, 2005).

Proteínas Cry são especificamente tóxicas para insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Em contraste, as proteínas Cyt são produzidas por estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas para Dípteros (Bravo *et al.*, 2007).

No final da década de 80, Hofte e Whiteley (1989) propuseram uma classificação para as toxinas de *B. thuringiensis*, baseada na combinação de suas seqüências de aminoácidos e espectro inseticida. Nesta classificação 42 genes foram agrupados em 5 classes diferentes. As quatro classes Cry continham toxinas com atividade contra Lepidoptera (I), Lepidoptera e Diptera (II), Coleoptera (III), Diptera (IV) e Cyt (associada a CryIV) que, por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi reconhecida como uma classe a mais (Tailor *et al.*, 1992). No entanto, essa classificação mostrou certas limitações, pois tentou relacionar toxinas com seqüências de aminoácidos similares a diferentes atividades inseticidas. Durante a década de 90, uma nova classificação foi proposta por Crickmore *et al.* (1998), baseada somente na identidade entre as seqüências de aminoácidos. Essa mudança permitiu uma alta relação entre as toxinas e eliminou a necessidade de bioensaios contra um grande número de insetos (Polanczyk & Alves, 2003). Até o momento, já foram descritos mais de 400 genes *cry* e agrupados em 70 grupos de proteínas Cry (Cry1 a Cry70) (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação e divisão das proteínas Cry de *B. thuringiensis* proposta pelo comitê internacional de 1993.

Proteína	Atividade
Cry1, Cry2, Cry9, Cry15, Cry56	Lepidoptera
Cry1, Cry3, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry14, Cry18, Cry34, Cry35, Cry36, Cry38, Cry43, Cry51, Cry55	Coleoptera
Cry1, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry24, Cry25, Cry27, Cry29, Cry30, Cry32, Cry39, Cry40, Cry44, Cry47, Cry50, Cry56, Cry60	Diptera
Cry5, Cry8, Cry22	Himenoptera
Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry21, Cry55	Nematoda
Cry8, Cry51	Hemiptera
Cry5, Cry6, Cry12	Acari
Cry23, Cry26, Cry28, Cry31, Cry32, Cry33, Cry37	Sem atividade conhecida
Cry41, Cry42, Cry45, Cry46, Cry63, Cry64, Cry65	Citotoxicidade (células cancerosas)

A descrição completa das atuais toxinas de *B. thuringiensis* classificadas pode ser encontrada no site: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html, atualizado em 20/08/2011.

As toxinas Cry tem sido classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos, na qual a denominação mnemônica Cry (“crystal”) apresenta quatro categorias hierárquicas representadas por números e letras (maiúsculas e minúsculas), como por exemplo, Cry4Aa. As proteínas Cry com 45% de homologia em sua sequência são colocadas no primeiro nível e, quando apresentam 78 e 95% de identidade, constituem o segundo e o terceiro nível, respectivamente. O quarto nível, indicado por um número, apresenta identidade maior que 95% (Cry4Aa1) (De Maagd *et al.*, 2001).

Höfte & Whiteley (1989) compararam sequências de aminoácidos entre diferentes proteínas Cry conhecidas, apresentando especificidades variadas. A análise do alinhamento das sequências levou à identificação de cinco blocos bem conservados na região amino-terminal que codifica a toxina ativa, intercalados por regiões de sequências variáveis (Lereclus *et al.*, 1993, Knowles, 1994). Schnepf *et al.* (1998) descreveram ainda, outros três blocos localizados na região da protoxina. Esses resultados sugerem que as regiões conservadas sejam importantes para o desempenho do papel biológico das proteínas Cry e que, estas formam uma família com blocos similares e mecanismos de ação semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000). No entanto, com o avanço da biologia molecular de *B. thuringiensis*, novos genes *cry* foram sequenciados e catalogados, originando diversas exceções.

Na figura 2, são apresentados os grupos desta família de toxinas, organizados de acordo com a identidade e homologia das sequências. O primeiro grupo é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 e Cry10, que são muito relacionadas e suas toxinas ativas compartilham cinco blocos de significativa homologia (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1993; Baum & Malvar, 1995). Um segundo grupo é formado pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry 21, onde se observa homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, sendo encontrada uma variabilidade do bloco conservado 1 em relação aos grupos 1 e 2. As proteínas do segundo grupo apresentam uma variante no bloco 2 e o terceiro bloco completamente ausente (Schnepf *et al.*, 1998). Para ambos os grupos, quando a proteína apresenta a região C-terminal, os blocos 6, 7 e 8 estão invariavelmente presentes. O terceiro grupo é formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, constituído pelo bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2, mas existindo significativa homologia com os outros blocos conservados (Lereclus *et al.*, 1989).

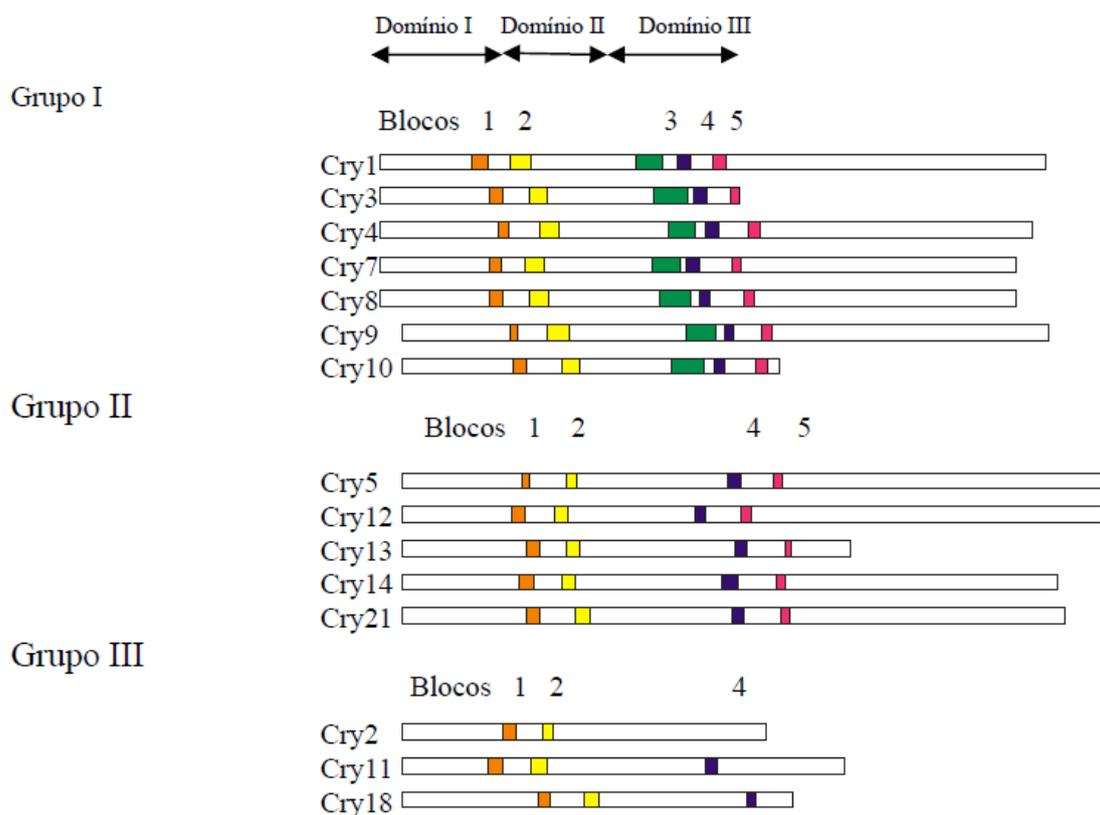


Figura 2. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Comprimentos relativos das proteínas Cry e a posição dos blocos conservados. Os retângulos coloridos correspondem às sequências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa. Adaptado de: De Maagd *et al.*, 2001.

1.1.7.1-Estrutura tridimensional das proteínas Cry

Até agora, a estrutura terciária de algumas proteínas de três domínios Cry, tais como Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa e Cry4Ba, foi determinada por cristalografia de raio-X, sendo que a primeira estrutura molecular a ser determinada foi da proteína Cry3Aa (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Galitsky *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005, 2006). Esse estudo contribuiu para o conhecimento do modo de ação dessas toxinas. Todas essas estruturas apresentam um

alto grau de similaridade com uma organização de três domínios, sugerindo um modo de ação similar para família de proteínas Cry. O domínio N-terminal (domínio I) é constituído de sete α -hélices, sendo que a hélice- $\alpha 5$ central é hidrofóbica e é circundada pelas outras seis hélices anfipáticas. Esse domínio é responsável pela inserção e formação do poro na membrana (Howlader *et al.*, 2009). O domínio II consiste de três folhas β antiparalelas conectadas por regiões de alças expostas, com alto grau de variação entre proteínas Cry, ao redor de um centro hidrofóbico (Boonserm *et al.*, 2006). O domínio III C-terminal, também chamado de β -prisma, é um sanduíche de folhas- β . As regiões expostas nos domínios II e III estão envolvidas na ligação ao receptor (Bravo *et al.*, 2005). O domínio I compartilha similaridades estruturais com outras TFP como colicina Ia e N, e toxinas da difteria, o que corrobora o papel de formação de poro desse domínio. No caso do domínio II, similaridades com várias proteínas ligadoras a carboidratos, como a vitelina, lectina jacalina e lectina Mpa foram relatadas (De Maagd *et al.*, 2003). O domínio III compartilha similaridades estruturais com outras proteínas ligadoras á carboidratos, como o domínio de ligação à celulose 1,4- β -glucanase C, galactose oxidase, sialidase, β -glicoronidase, o domínio de ligação a carboidrato da xilanase U e β -galactosidase (De Maagd *et al.*, 2003). Acredita-se ainda que o domínio III proteja a toxina de degradação durante o processamento proteolítico e atue no controle das interações toxina-toxina, podendo agir em conjunto com o domínio I na formação do poro (Rukmini *et al.*, 2000) (Figura 3).

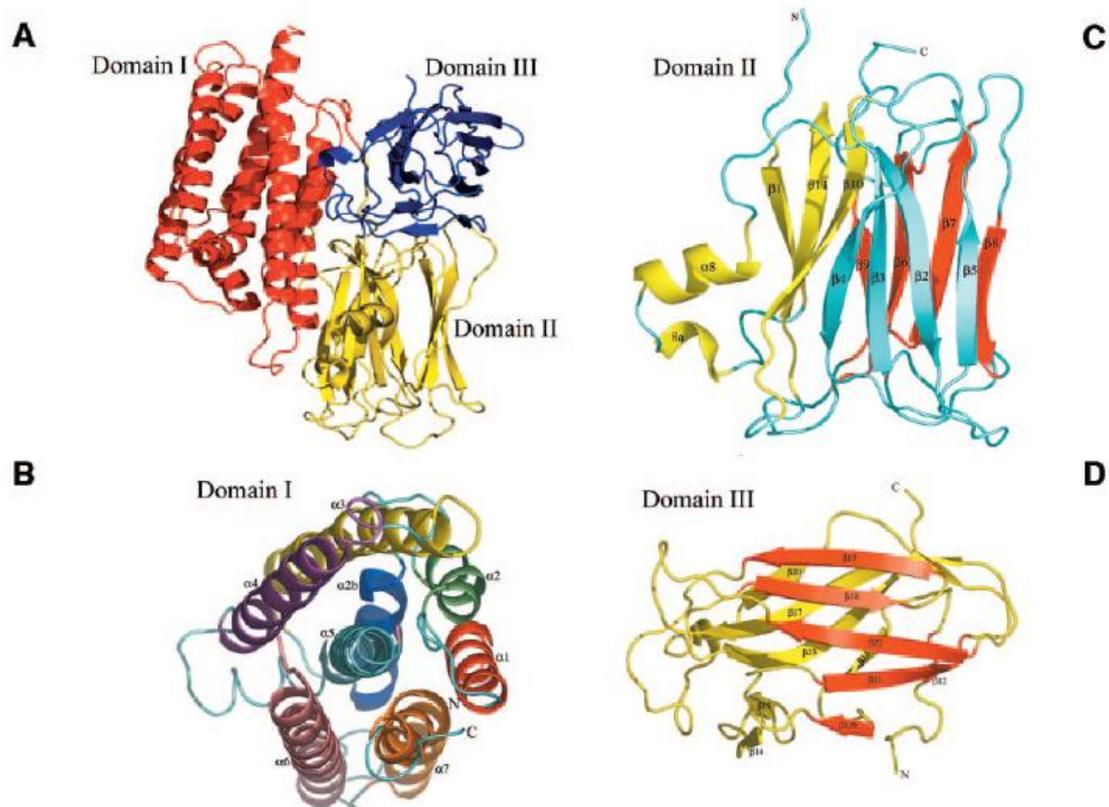


Figura 3. Representação da estrutura terciária baseada na modelagem da toxina Cry4Aa. A, visão geral da toxina Cry4Aa, composta de três domínios. O domínio I, envolvido na formação do poro, está representado em vermelho. O domínio II, provável responsável pela ligação ao receptor, está representado em amarelo, e o domínio III, em azul. Os elementos da estrutura secundária de cada um dos três domínios estão apresentados em B, C e D (Adaptado de Boonserm *et al.*, 2006).

1.1.7.2-Modo de ação das proteínas Cry

A maior parte das informações existentes sobre o modo de ação do *B. thuringiensis* foram caracterizadas a partir de estudos de sorovarietades como o *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis tenebrionis*, e outras de grande aplicação no controle de lepidópteros e coleópteros.

Diferentes modelos para descrever o mecanismo de ação de toxinas Cry tem sido propostos. Há muito que toxinas Cry vem sendo descritas como toxinas formadoras de poros, induzindo a morte celular por formação de poros iônicos (Schnepf *et al.*, 1998; Pigott & Ellar, 2007). Como mencionado, o modo de ação primário de toxinas Cry é a lise das células epiteliais do intestino médio do inseto-alvo pela formação de poros nas microvilosidades da membrana apical das células (Aronson & Shai, 2001; Bravo *et al.*, 2005). Entretanto, mais recentemente foi sugerido que a toxicidade pode estar relacionada à apoptose mediada por proteína-G, seguido de ligação ao receptor (Zang *et al.*, 2006). Vale salientar que este modelo alternativo foi proposto com base no efeito tóxico de Cry1Ab para cultura de células de inseto, High Five (H5), de *Trichoplusia ni* expressando o receptor de toxina de *Manduca sexta*, Bt-R₁. Ainda, um terceiro modelo sugere que além da destruição da membrana, outras bactérias do intestino médio são necessárias para produzir septicemia resultando na morte da larva (Broderinck *et al.*, 2006).

As toxinas Cry nativas de *B. thuringiensis* são sintetizadas como protoxinas contidas nos corpos de inclusão (Aronson *et al.*, 1986). Após a ingestão por larvas de insetos suscetíveis e dissolução no lúmen do intestino médio, em pH alcalino, as protoxinas solubilizadas são clivadas por proteases do intestino médio produzindo fragmentos tóxicos de 60-70 kDa que são relativamente resistentes a proteólises posteriores (Aronson *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 2005) (Figura 4). Ao tornarem-se ativas, as protoxinas tem um peptídeo N-terminal removido (25-30 aminoácidos para toxinas Cry1, 58 resíduos para Cry3A e 49 para Cry2Aa) e aproximadamente metade da proteína restante da extremidade C-terminal, no caso de longas protoxinas Cry (Bravo *et al.*, 2007). Também pode ocorrer clivagem da extremidade N-terminal,

aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, pela ação de metaloproteases sintetizadas pela própria bactéria durante a esporulação (Rukmini *et al.*, 2000).

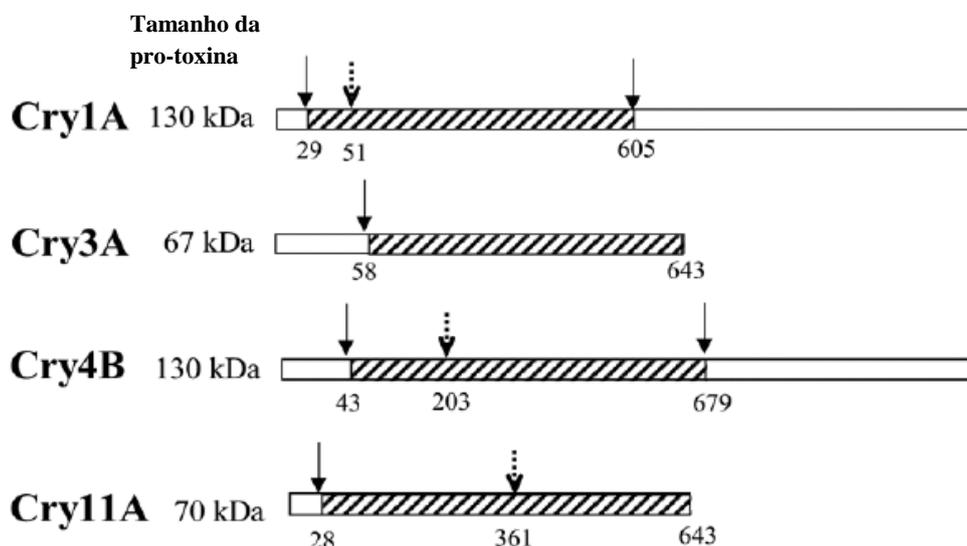


Figura 4. Esquema da ativação proteolítica de algumas proteínas Cry. As caixas brancas representam os fragmentos da pro-toxina clivados, enquanto as regiões listradas representam as toxinas ativas. As setas sólidas demonstram os sítios de clivagem nas porções N-terminal e C-terminal das toxinas ativas. As setas pontilhadas representam sítios de clivagens intramoleculares das proteínas ativas (Bravo *et al.*, 2007).

Diferenças relevantes na fisiologia do intestino e, conseqüente variação na atividade proteolítica entre as diferentes ordens de inseto, pode determinar a especificidade das toxinas. Como exemplo, as principais proteases digestivas de Lepidoptera e Diptera são serino-proteases, ao passo que aquelas de Coleoptera constituem-se principalmente por cisteíno e aspártico-proteases (De Maagd *et al.*, 2001).

O *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* produz inclusões protéicas compostas por proteínas Cry altamente tóxicas para mosquitos. Proteínas sintetizadas por esta bactéria como Cry11A, Cry4A e Cry4B compartilham estruturas similares com a toxina de

Lepidoptera, Cry1Aa, sugerindo um modo de ação similar dessas proteínas em mosquitos (Bravo *et al.*, 2007).

Como em insetos lepidópteros, os cristais ingeridos por larvas de mosquitos são dissolvidos no ambiente alcalino do intestino da larva, liberando proteínas solúveis. No caso da protoxina de 70 kDa, Cry11Aa, a ativação proteolítica no intestino remove 28 resíduos da porção N-terminal e cliva intramolecularmente a proteína em fragmentos de massas moleculares de aproximadamente 38 e 32 kDa (Dai & Gill, 1993; Beltrão & Silva-Filha, 2006), mas esses fragmentos permanecem associados e mantêm a toxicidade (Yamagiwa *et al.*, 2004). Da mesma forma acontece com a protoxina de 130 kDa, Cry4Ba. Nesta também ocorrem clivagens nas porções N-terminal, C-terminal e intramolecular, resultando em uma toxina ativa composta de um fragmento de 18 kDa e outro de 46 kDa (Angsuthanasombat *et al.*, 1993).

1.1.7.2.1-Ligação ao receptor

Os estudos relacionados à cinética de ligação de proteínas Cry a receptores específicos provem de metodologias utilizando proteínas marcadas com biotina e vesículas de membrana das microvilosidades apicais (VMMA) ou “brush border membrane vesicles” (BBMVs).

Até o momento, sabe-se que pelo menos quatro tipos de receptores, situados na superfície das células intestinais de larvas de Lepidoptera, podem ligar-se às toxinas Cry. Uma aminopeptidase N (APN), que está ligada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina (CADR), uma proteína glicoconjugada de 270 kDa (GCR) e uma fosfatase alcalina (ALP) ancorada a GPI (Figura 5) (Knight *et al.*, 1994; Gómes *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007). Os receptores

do tipo APN e ALP ancorados a GPI encontram-se dentro de plataformas de lipídeos (“Lipid Rafts”) que formam pequenos domínios na membrana celular. Essas estruturas contêm ainda, maiores concentrações de colesterol e glicosfingolipídeos. Já foi sugerido também que os glicolipídeos são importantes moléculas receptoras de proteínas Cry em insetos e nematóides (Griffits *et al.*, 2005)

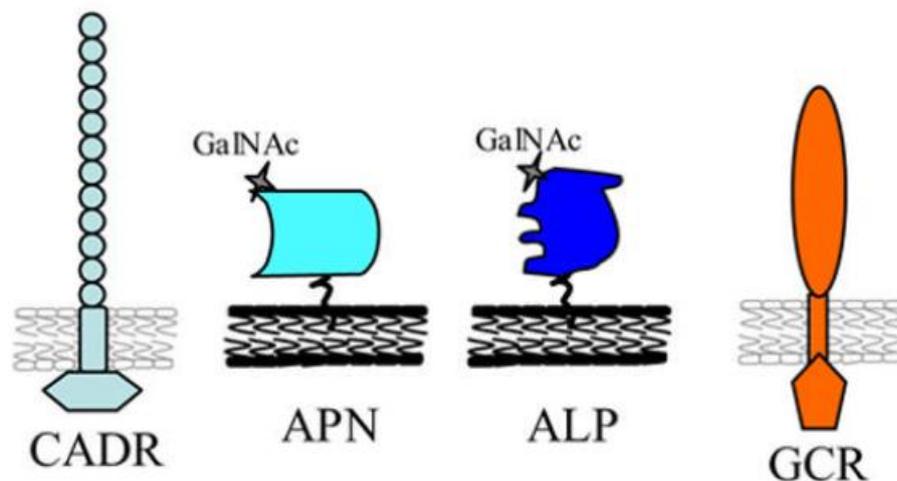


Figura 5. Receptores moleculares da proteína Cry1Aa. CADR, receptor caderina; APN, receptor aminopeptidase-N; ALP, receptor fosfatase alcalina; GCR, receptor glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

Em lepidópteros, no que diz respeito aos modelos de formação de poros e transdução de sinal, a toxina Cry1A liga-se às proteínas do tipo caderina (Bt-R1, no caso de *Manduca sexta*) de 210 kDa e a APN de 120 kDa (Juaréz *et al.*, 2008). Após ativação proteolítica da protoxina Cry1A por proteases do inseto, a toxina se liga ao receptor Bt-R1. Esta interação facilita uma clivagem adicional da porção N-terminal da toxina, eliminando a hélice α -1 e resultando na formação de uma estrutura oligomérica denominada pré-póro. Tal estrutura liga-se a um segundo receptor do tipo APN ancorado a GPI, facilitando a inserção do oligômero na membrana lipídica para a formação do

poro (Zhuang *et al.*, 2002). A observação de que os domínios II e III podem atuar separadamente em um processo composto de duas etapas de ligação de Cry1Ac a uma aminopeptidase N, poderia ajudar a explicar por que novas combinações de domínios II e III podem gerar uma mudança de especificidade (De Maagd *et al.*, 2001). Outra importante proteína ancorada a GPI, uma fosfatase alcalina, foi reconhecida como receptora de Cry1Ac em *Heliothis virescens* e *M. sexta*. A ALP também pode facilitar a inserção do oligômero na membrana lipídica, explicando o porquê de mutações na toxina Cry1Ac afetarem severamente a ligação a APN, mas ainda mantêm atividade tóxica para larvas de *M. sexta* (Jenkins *et al.*, 1999). No modelo de formação do poro, o oligômero pré-poro é responsável pelo início da morte celular. Em contraste, no modelo de transdução de sinal, apenas a ligação da forma monomérica da toxina Cry ao receptor Bt-R1 é responsável pela toxicidade (Juaréz *et al.*, 2008). Este passo do modo de ação possivelmente ativa uma proteína G e adenilato- ciclase que promove a produção de cAMP intracelular. O aumento dos níveis de cAMP ativa uma proteína quinase A que causa a morte celular (Zhang *et al.*, 2006) (Figura 6). Pigott & Ellar (2007), fazem observação sobre o modo de ação proposto por Zhang, já que outros trabalhos (Knowles & Farndale, 1988), haviam mostrado anteriormente que toxinas Cry aumentavam os níveis de cAMP em células de *Mamestra brassicae*, e que os efeitos sobre a adenilato ciclase, eram mais efeitos secundários, da interação da toxina com a membrana, do que do efeito citolítico realmente. Pigott & Ellar (2007), sugerem que mais trabalhos devem ser realizados para corroborar o modelo proposto por Zhang e confirmar a ligação entre a citotoxicidade das toxinas Cry e o aumento de cAMP celular, mostrando principalmente como a proteína quinase A age *in vivo*.

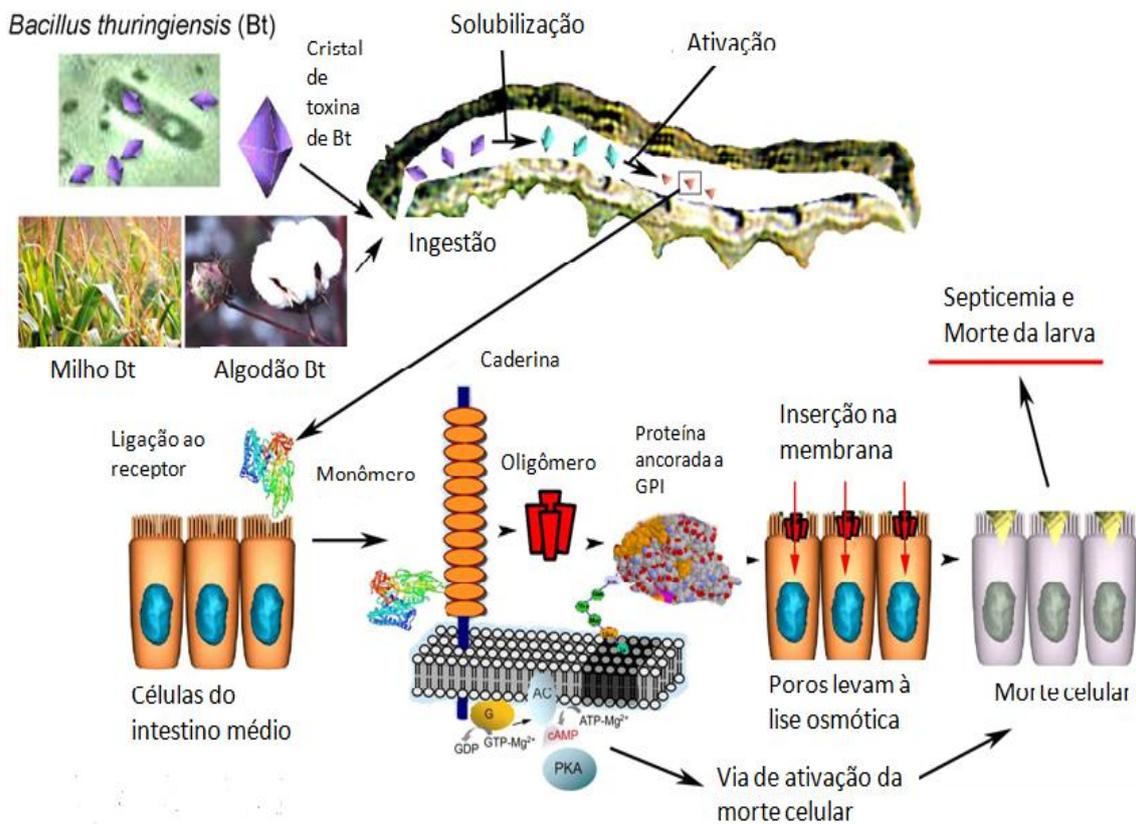


Figura 6. Representação esquemática do modo de ação de toxinas Cry de *B. thuringiensis*. Ao ser ingerido pela larva, o cristal paraesporal formado por proteínas Cry é dissolvido no ambiente alcalino do intestino médio do inseto e ativado por proteases do inseto. As toxinas ativas ligam-se então a um receptor primário do tipo caderina, presente na membrana das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio. Esta interação promove uma clivagem adicional da toxina, facilitando a formação de um oligômero. Este, liga-se a um segundo receptor do tipo APN ou ALP para que ocorra a inserção da estrutura oligomérica na membrana celular provocando lise osmótica. Uma outra via para ação de toxinas Cry, seria a ativação sequencial de uma proteína G e uma adenilato ciclase, o que levaria a um aumento nas concentrações de AMP cíclico (cAMP) e resultaria na ativação da proteína quinase A (PKA) culminando na morte celular. Adaptado de <http://web.utk.edu/~jurat/>.

1.1.7.3-Proteínas Cyt

Toxinas citolíticas que não são estruturalmente relacionadas às proteínas Cry e, tampouco apresentam homologia de sequência de aminoácidos com tais proteínas compõem um subgrupo distinto de δ -endotoxinas denominadas Cyt. Estas proteínas são produzidas pelo *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e algumas outras subespécies. Em

contraste com as proteínas Cry, que são específicas majoritariamente para lepidópteros e coleópteros, as Cyt são tóxicas *in vivo*, principalmente, para larvas de dípteros (Butko, 2003) (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação e divisão das proteínas Cyt de *B. thuringiensis* proposta pelo comitê internacional de 1993.

Proteína	Subgrupos	Atividade
Cyt1	5	Dípteros
Cyt2	5	Dípteros/Coleópteros
Cyt3	1	Coleópteros

A primeira tentativa de propor um modelo para a estrutura tridimensional das proteínas Cyt1A foi realizada por Ward e colaboradores em 1988. Apesar desse trabalho não conseguir propor um modelo, os autores identificaram algumas características da estrutura da toxina, como apenas um domínio apresentando duas α -hélices antiparalelas e abundância de folhas- β . O modelo da estrutura da proteína Cyt1A (Butko, 2003) (Figura 7) foi sugerido a partir do modelo da proteína Cyt2Aa1, que foi proposto, através de técnicas de cristalografia de raios-X, por Li e colaboradores em 1996. O alinhamento das sequências das proteínas Cyt1Aa e Cyt2Aa mostra que a arquitetura α/β é, presumivelmente, bem conservada entre as diferentes toxinas Cyt (Li *et al.*, 1996).

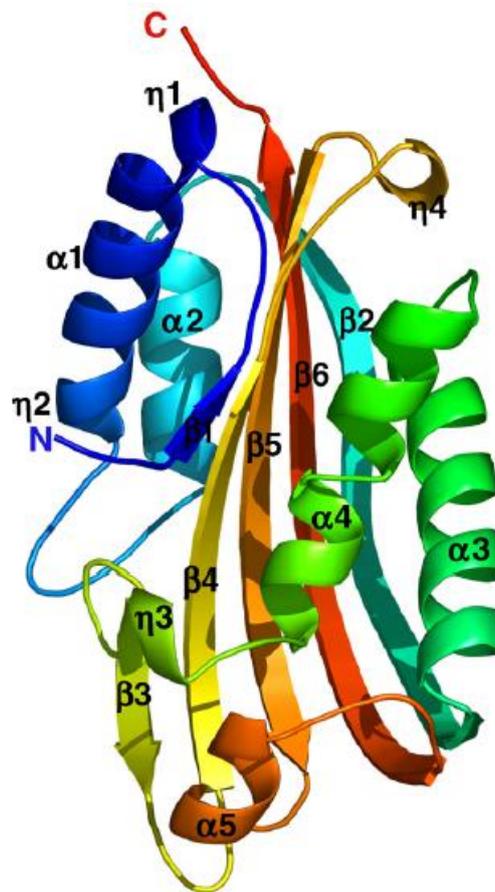


Figura 7. Representação esquemática da estrutura da toxina Cyt1Aa. A proteína Cyt1Aa consiste de um único domínio α - β constituído de quatro α -hélices (α 1, α 2, α 3, α 4) que flanqueiam um conjunto de folhas- β (β 4, β 5, β 6, β 2). Acredita-se que as folhas- β inserem-se na membrana plasmática, promovendo a formação do poro (Adaptado de Butko, 2003).

Até o momento, 37 genes *cyt* já foram descritos e suas sequências depositadas no banco, divididas em 3 grupos e em diferentes subgrupos (Tabela 2). A atualização constante desses dados pode ser acessada via internet no endereço: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html.

Embora o espectro de atividade de Cyt1Aa, que é a proteína mais estudada da subfamília Cyt, *in vivo* seja restrito, *in vitro* esta exhibe ampla atividade citolítica para

uma variedade de células de inseto e mamífero, incluindo eritrócitos, linfócitos e fibroblastos (Knowles & Ellar, 1987; Thomas & Ellar, 1983).

1.1.7.3.1-Modo de ação das proteínas Cyt

A toxina citolítica Cyt1Aa, quando solubilizada no ambiente alcalino do intestino médio de mosquitos, é liberada como uma protoxina dimérica. Sob ativação proteolítica da protoxina, em ambas as extremidades N e C terminais, uma toxina monomérica de 22-25 kDa é produzida e atua na membrana das células epiteliais do intestino médio (Armstrong *et al.* 1985; Gill *et al.*, 1987). O mecanismo de ação das toxinas Cyt ainda encontra-se sob controvérsia. É sugerido que as duas alças de α -hélices externas distanciam-se das folhas β quando entram em contato com a membrana, permitindo assim, que as três últimas folhas β inseriram-se na membrana. Consequentemente, a oligomerização com outros monômeros e a formação de um poro tipo β -barril pode ocorrer, resultando em lise osmótica (Cohen *et al.*, 2008). Outro modelo sugere que a porção hidrofílica das hélices interaja com resíduos de outros monômeros para formar um oligômero. Isto resulta em uma agregação não específica de toxinas Cyt na superfície da bicamada lipídica, levando a uma ação do tipo detergente e desestruturação da membrana (Thomas & Ellar, 1983; Manceva *et al.*, 2005) (Figura 8).

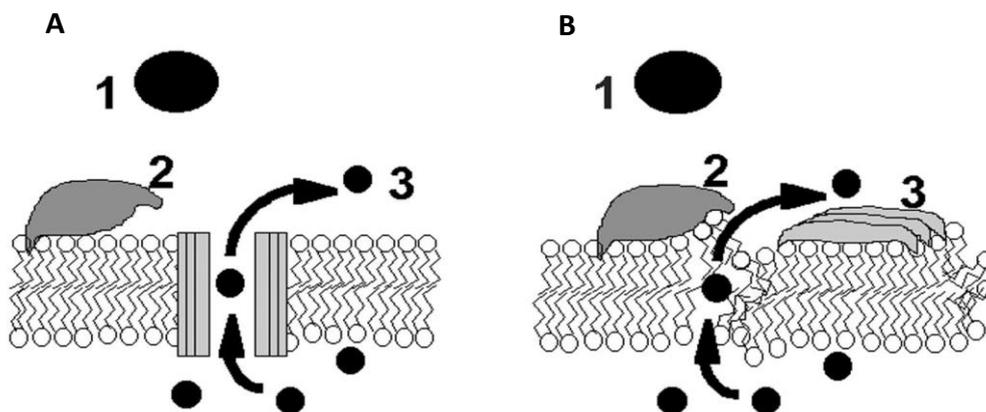


Figura 8. Representação esquemática das hipóteses do modo de ação das proteínas Cyt1A. A) Modelo de formação dos poros. 1) Solubilização da proteína. 2) Ligação e inserção da proteína na membrana plasmática. 3) Formação do poro e disfunção osmótica. B) Modelo do funcionamento da proteína como detergente. 1) Solubilização da proteína. 2) Ligação das proteínas na superfície da membrana plasmática. 3) Formação de agregados lipídios-toxinas e destruição da membrana plasmática (Adaptado de Butko, 2003).

Thomas & Ellar (1983) demonstraram que as toxinas Cyt perdiam sua atividade após incubação com lipídeos. Estes autores demonstraram que fatores determinantes para a ligação da toxina residem na natureza da cabeça polar lipídica (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline) e na presença de cadeias de ácidos graxos insaturadas.

1.1.7.4-Sinergismo entre proteínas Cyt e Cry

As toxinas citolíticas também são tóxicas para mosquitos, embora sua atividade seja geralmente menor do que a atividade de proteínas Cry tóxicas para estes insetos (Chang *et al.*, 1993). Entretanto, as toxinas Cyt agem sinergicamente com toxinas Cry, funcionando como receptores para essas toxinas, tendo portanto, um papel crucial na atividade geral das inclusões paraesporais (Poncet *et al.*, 1995; Crickmore *et al.*, 1995).

Dessa forma, o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* torna-se uma alternativa natural e eficiente para o combate ao surgimento de populações de mosquitos resistentes às proteínas Cry, pois esta bactéria pode expressar tanto suas toxinas, como seus receptores ativos (Bravo & Soberón, 2008). Populações de *Culex quinquefasciatus*, selecionadas em laboratório, apresentaram resistência às proteínas Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa, porém nenhuma resistência foi adquirida quando estas proteínas foram testadas juntamente com a proteína Cyt1Aa (Wirth *et al.*, 1997). Além disso, as toxinas do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, quando testadas separadamente, apresentam baixa toxicidade, no entanto, quando estas são testadas juntamente com as proteínas Cyt apresentam alta atividade. A ligação de Cry11Aa a BBMV de larvas *A. aegypti* é aumentada pela presença de Cyt1Aa ligado à membrana (Cohen *et al.*, 2011). De acordo com Pérez e colaboradores (2005), dois epítomos de ligação de Cyt1Aa – $_{196}\text{EIKVSAVKE}_{204}$ (localizado em $\beta 7$ e $\alpha 6$) e $_{220}\text{NIQSLKFAQ}_{228}$ (localizado em $\beta 8$) foram identificados como estando envolvidos na interação de ligação com Cry11Aa e, mutações pontuais em Cyt1Aa afetam a ligação e interação com Cry11Aa e, portanto, o sinergismo entre essas toxinas. Também foi demonstrado pelos mesmos autores que as regiões de alças do domínio II de Cry11Aa estavam envolvidas na ligação e sinergismo com Cyt1Aa. Esses dados mostraram que a ligação de Cry11Aa a Cyt1Aa facilita a formação de oligômeros de Cry11Aa, indicando que Cyt1Aa pode atuar como um receptor primário tipo caderina (Pérez *et al.*, 2007). Toxinas Cyt1Aa mutadas também foram utilizadas para avaliação de sinergismo com a toxina Cry4Ba nativa ou com mutações nas alças de seu domínio II. Esses experimentos foram conduzidos por Cantón e colaboradores (2010) e os resultados obtidos também indicam uma interação entre Cyt1Aa e Cry4Ba.

1.1.7.5-Regulação da expressão das δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas são produzidas durante a fase estacionária do crescimento bacteriano e, apesar do baixo número de cópias dos genes responsáveis pela expressão dessas toxinas, ocorre um acúmulo de δ -endotoxinas no compartimento da célula-mãe sob forma de cristais que correspondem a 25-30% das proteínas totais da bactéria em esporulação (Agaisse & Lereclus, 1995). Este fato indica a existência de um controle de expressão eficiente baseado em mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (Schnepf *et al.*, 1998). De acordo com a expressão, os genes *cry* podem ser agrupados em dependentes e não dependentes da esporulação.

1.1.7.6-Expressão de genes dependentes da esporulação

A esporulação é um mecanismo de reposta das células de *B. thuringiensis* a condições de crescimento desfavoráveis, cuja finalidade é produzir uma forma de resistência ao ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento. Os diferentes mecanismos que regulam a esporulação tem sido estudados principalmente em *B. subtilis*, uma espécie semelhante ao *B. thuringiensis*. De modo que, os estudos morfológicos e genéticos mostraram alta similaridade entre o mecanismo de esporulação entre estas duas espécies (Driks, 2002). Estes estudos têm fornecido informações detalhadas a respeito de mecanismos complexos de controle temporal e espacial do processo de diferenciação.

Em nível transcricional, o desenvolvimento da esporulação é controlado por ativações sucessivas de fatores que se ligam à RNA polimerase para direcionar a transcrição a partir de promotores específicos da esporulação (Moran, 1993). Estes fatores são compostos do fator σ^A que é o principal fator ativo durante a fase vegetativa,

e cinco outros fatores denominados σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K , que aparecem nessa ordem temporal durante o processo. Os fatores σ^A e σ^H são ativos na célula pré divisionária, σ^E e σ^K são ativos na célula-mãe e σ^F e σ^G são ativos no pré-esporo (Schnepf *et al.*, 1998).

O gene *cryIAa* é um exemplo típico de gene dependente da esporulação expresso apenas no compartimento da célula-mãe de *B. thuringiensis*. Wong e colaboradores (1983) identificaram dois promotores sobrepostos, BtI e BtII, a partir dos quais *cryIAa* é transcrito. O promotor proximal (BtI), relativo à região codificadora de *cryIAa*, é reconhecido pelo fator σ^E de *B. thuringiensis*, enquanto que o promotor mais distal ao sítio de início de transcrição de *cryIAa* é reconhecido pelo fator σ^K . BtI é ativo entre T^2 e T^6 da esporulação e BtII é ativo a partir de T^5 em diante (onde T_n é o número de horas depois do final da fase exponencial). Brown & Whiteley (1988; 1990), isolaram dois fatores σ^{35} e σ^{28} que especificamente direcionam a transcrição de *cryIAa* pela ativação de BtI e BtII, respectivamente. Os genes que codificam estes dois fatores sigma foram clonados e seqüenciados (Adams *et al.*, 1991). As seqüências de aminoácidos deduzidas dos fatores σ^{35} e σ^{28} apresentam identidade de 88% e 85% com os fatores σ^E e σ^K de *B. subtilis*, respectivamente. Este alto grau de identidade e a habilidade em conduzir a transcrição a partir de promotores de *B. subtilis*, especificamente reconhecidos por σ^E e σ^K , indicam uma homologia funcional entre os respectivos pares de fatores sigma. Outros genes como os das classes *cry2*, *cry4*, *cry11*, *cry15* e *cyt*, possuem regiões contendo promotores similares. Dessa forma, a regulação temporal da síntese da proteína formadora de cristal é, em parte, assegurada por sucessivas trocas de fatores sigma (Schnepf *et al.*, 1998).

1.1.7.7-Genes não dependentes da esporulação

O gene *cry3Aa*, isolado de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, com atividade para a ordem Coleoptera é expresso durante o crescimento vegetativo, embora também seja expresso em menor grau na fase estacionária (de Souza *et al.*, 1993; Malvar *et al.*, 1994). Ao contrario dos promotores BtI (reconhecido pelo fator sigma do tipo σ^E) e BtII (reconhecido pelo fator sigma do tipo σ^K) todos da fase de esporulação de *Bt*, o promotor de *cry3A*, embora incomumente localizado distante do códon de início (posição -558), assemelha-se aos promotores reconhecidos pelo fator sigma σ^A da fase vegetativa da bactéria. Análise gênica de *Bt* (Salamitou *et al.*, 1996; Pérez, 2004) e *B. subtilis* (Agaisse & Lereclus, 1994), mostra que a transcrição do gene *cry3A* é dependente dos fatores sigma σ^A na fase vegetativa, e continua sendo transcrito pelo fator sigma σ^H durante a fase de esporulação, além de ter sua transcrição aumentada em isolado de mutante incapaz de iniciar a esporulação (Lereclus *et al.*, 1995).

1.1.7.8-Mecanismos pós-transcricionais

A estabilidade do mRNA é um importante fator para o alto nível de produção de toxina em *B. thuringiensis*. A meia-vida do mRNA dos genes *cry*, em torno de dez minutos, é pelo menos cinco vezes maior do que a meia-vida de mRNA bacteriano em geral (Glatron & Rapoport, 1972).

Wong & Chang (1986) mostraram que a presença de um possível terminador transcricional do gene *cryIAa* contendo seqüências repetidas com orientação invertida palindrômica, localizadas na extremidade 3' do mRNA atuaria como um protetor contra degradação por exorribonucleases com atividade 3' - 5', devido à capacidade das

seqüências repetidas invertidas de formar estruturas em alça. Seqüências terminadoras similares, potencialmente capazes de formar alças, são encontradas *downstream* de vários genes *cry* e podem contribuir para seus altos níveis de expressão por estabilizar os transcritos (Wong & Chang, 1986).

A inserção da região não-traduzida 5' de *cry3Aa* (extendendo-se dos nucleotídeos -129 a -12), entre o promotor *xyIA* de *B. subtilis* e o gene repórter *lacZ* aumentou, cerca de dez vezes, tanto a estabilidade do mRNA fusionado do *lacZ*, como a produção de β -galactosidase (Agaisse & Lereclus, 1994). Análise de mutação e deleção indicam que a seqüência requerida para o efeito de estabilização é uma seqüência Shine-Dalgarno (GAAAGGAGG) localizada entre os nucleotídeos -125 a -117. A estabilidade do mensageiro de *cry3Aa* pode ser devida a uma interação entre a extremidade 3' do rRNA 16S e a seqüência Shine-Dalgarno. A ligação da subunidade ribossomal 30S a esta seqüência pode proteger o mRNA de ribonucleases com atividade 5'-3', resultando em um transcrito estável com a extremidade 5' no nucleotídeo -129. Seqüências Shine-Dalgarno potenciais estão presentes em posições similares *upstream* dos genes *cry3Ba*, *cry3Bb* e *cry3Ca* (Donavan *et al.*, 1992; Lambert *et al.*, 1992).

1.1.8-*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

O *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) é altamente eficaz como larvicida contra diversas espécies de mosquitos como *Culex spp.*, *Aedes spp.*, e *Anopheles spp.*, vetores de doenças humanas. O principal componente inseticida do *Bti* é um corpo paraesporal produzido durante a esporulação, composto pelas proteínas δ -endotoxinas, Cyt1Aa, Cyt2Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa e Cry11Aa (Wirth *et al.*, 2005; Porter *et al.*, 1993), cujos genes responsáveis por suas expressões encontram-se em um

megaplasmídeo de 128 kb, pBtoxis (Figura 9). Além disso, o plasmídeo contém sequências que codificam duas outras proteínas (P19 e P20) que atuam, possivelmente, como chaperonas, auxiliando na formação dos cristais (Berry *et al.*, 2002).

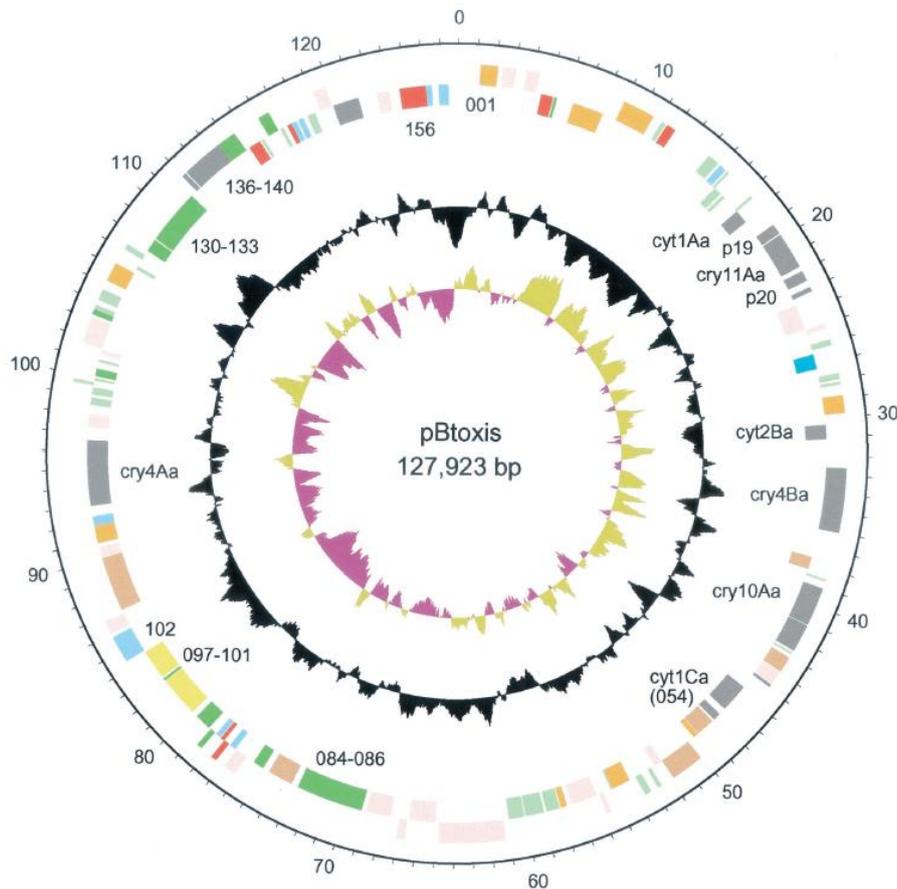


Figura 9. Representação circular do pBtoxis. O círculo mais interno mostra a razão GC [(G-C)/(G+C)], com valores positivos em amarelo e valores negativos em rosa. O segundo círculo representa o conteúdo de G+C. Os círculos externos representam os genes em ambas as fitas do plasmídeo com os números de referência das sequências codantes gênicas (Berry *et al.*, 2002).

Estas δ -endotoxinas são de grande interesse para o desenvolvimento de novos bioinseticidas que causem o mínimo impacto ecológico sendo, por isso, alternativas interessantes para o controle de insetos.

Atualmente, o *Bti* é comercializado em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos, e vários produtos eficientes estão disponíveis no mercado. O *Bti* foi

usado em campanhas intensivas de controle realizadas nos EUA e Alemanha para o controle de pernilongos, e na África para o combate a simulídeos vetores da Oncocercose (Glare & O'Callaghan, 2000). Em 1983, os primeiros estudos conduzidos no Brasil avaliaram a eficiência de agentes biológicos no controle de simulídeos. Em 1986, devido aos resultados promissores, iniciou-se a substituição dos organofosforados por produtos à base de *Bti*. Desde então, tornou-se a única tática de controle de simulídeos. *O Bti* foi usado também com grande sucesso no Peru, Equador e na região Amazônica do Peru (Kroeger *et al.*, 1995). Recentemente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que vem trabalhando em conjunto com uma companhia privada, introduziu um novo produto à base de *Bti*, lançado no mercado em 2005 (Andrade, 2008).

Segundo de Barjac (1978), foi observado que as toxinas de *Bti* causam paralisia de movimento e morte subsequente de larvas de *Aedes aegypti*, além de demonstrar a evidência histopatológica de que o epitélio do intestino é o alvo primário. Este epitélio também apresentou um inchaço típico seguido de lise tecidual generalizada.

1.1.8.1- δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

As toxinas Cry4Aa e Cry4Ba de 128 e 134 kDa, respectivamente, produzidas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, são especificamente tóxicas, quando ativadas proteoliticamente, para larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). Estes mosquitos são responsáveis pela transmissão de sérias doenças humanas atuando como vetores do vírus da dengue, malária e parasitas filariais.

As protoxinas Cry4Aa e Cry4Ba são moléculas intimamente relacionadas, exibindo uma taxa de identidade de seqüência de aminoácidos de 78%. As regiões C-terminais das protoxinas de 130 kDa Cry4Aa e Cry4Ba são praticamente idênticas, no entanto, suas porções N-terminais proteoliticamente ativadas, apresentam apenas cerca de 55% de similaridade de seqüência (Chungjatupornchai *et al.*, 1988; Ward & Ellar, 1988). Essas toxinas também sofrem clivagem intramolecular resultando em fragmentos de 45 e 18 kDa para Cry4Aa e, 46-48 e 16-18 kDa para Cry4Ba (Boonsern *et al.*, 2005). Apesar da similaridade, essas toxinas exibem diferentes níveis de toxicidade contra várias espécies de mosquitos. Enquanto Cry4Ba é altamente tóxica para larvas de *Aedes* e *Anopheles* (vetores do dengue e febre amarela e da malária, respectivamente), esta toxina apresenta baixa atividade contra larvas de *Culex*. Em contraste, Cry4Aa exibe um alto nível de toxicidade contra larvas de *Culex* e *Aedes*, porém um pouco menos tóxica para *Anopheles* (Poncet *et al.*, 1995). Experimentos de mutagêneses sítio-dirigidas com toxinas Cry identificaram regiões do domínio II como os principais determinantes para a especificidade de insetos (Abdullah *et al.*, 2003; Rajamohan *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000).

A família de δ -endotoxinas Cry11 compreende proteínas de 66-72 kDa ativas para dípteros. A ativação proteolítica desta toxina remove 28 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da protoxina e promove uma clivagem intramolecular resultando em fragmentos de aproximadamente 38 e 32 kDa (Yamahiwa *et al.*, 2002). A toxina Cry11Aa é a mais ativa encontrada no cristal de *Bti* contra *A. aegypti*. Esta toxina apresenta, ainda, atividade para larvas de *Culex ssp.* e *Anopheles ssp.* (Fernández *et al.*, 2005). A proteína Cry11Aa necessita de algumas proteínas acessórias que ajudem em seu processo de cristalização, já que são proteínas truncadas e não possuem a porção C-terminal presente nas proteínas Cry de 130 kDa. As proteínas P19 (19 kDa) e P20 (20

kDa) são expressas pelo operon do gene *cry11Aa* e proporcionam uma maior eficiência na produção de Cry11Aa (Wu & Federici, 1995). O domínio II da toxina Cry11Aa está envolvido no reconhecimento do receptor e, por isso, é considerado como a região determinante para especificidade desta toxina.

A proteína Cry10Aa é expressa como uma protoxina de 78 kDa que é, posteriormente, clivada em uma toxina ativa de 60 kDa. Sua atividade foi primeiramente descrita para insetos da ordem Diptera (Thorne *et al.*, 1986). Interessantemente, o gene *cry10Aa* é um operon já que este inclui duas ORFs (ORF1 e ORF2, respectivamente), separadas por uma sequência não traduzida de 48 pb. A ORF1 contém a sequência completa da δ -endotoxina. A ORF2 apresenta alta identidade à sequência da metade C-terminal das proteínas do tipo Cry4, com capacidade para codificar uma proteína de 56 kDa. Por isso, acredita-se que um possível gene ancestral, *cry10Aa*, seria similar em tamanho aos genes tipo *cry4*. Entretanto, uma pequena sequência pode ter-se inserido no gene, ou mutações produziram códons de terminação nesta região (Hernández-Soto *et al.*, 2009).

Cyt1Aa foi a primeira toxina citolítica a ser isolada e caracterizada. Esta toxina é citolítica para células de insetos da ordem Diptera, e em concentrações várias vezes maiores, também apresenta toxicidade para uma gama de células de vertebrados e invertebrados (Gill *et al.*, 1992). Já foi demonstrado que a protoxina nativa, Cyt1Aa, é tóxica, *in vitro*, para eritrócitos e outras células de mamíferos, e também letal para camundongos via injeção intravenosa (Thomas & Ellar, 1983; Knowles *et al.*, 1992). A máxima toxicidade de Cyt1Aa ocorre após solubilização alcalina e proteólise das extremidades N- e C-terminais, convertendo a protoxina de 27 kDa em uma forma ativa de 22-25 kDa. Vários estudos já demonstraram que a combinação de Cyt1Aa com outras endotoxinas Cry, como naturalmente acontece na linhagem selvagem de *Bti*, é

responsável pela não ocorrência de resistência em larvas de mosquitos a essa bactéria (Wirth *et al.*, 2005).

A toxina Cyt2Ba é um menor componente do complexo de proteínas formadoras do cristal paraesporal produzido pelo *Bti*. Esta toxina é composta de 263 aminoácidos com cerca 41% de identidade com Cyt1Aa (Guerchicoff *et al.*, 2001). Apesar das similaridades nas sequências entre as duas proteínas Cyt, nenhuma reação cruzada antigênica foi relatada entre elas (Held *et al.*, 1990). A protoxina Cyt2Ba apresenta massa molecular de 24 kDa e, quando ativada proteoliticamente, sua massa é de 22 kDa (Cohen *et al.*, 2008).

1.1.9-Baculovírus

Dentre os vírus de insetos, os baculovírus compreendem o maior e mais estudado grupo e é o que tem sido mais aplicado como bioinseticida devido ao seu relativamente restrito espectro de hospedeiros (Bonning & Hammock, 1996). São grandes vírus em forma de bastão, envelopados, contendo DNA circular dupla fita “super-coiled” como genoma, variando de 80 a 200 pkb (Arif, 1986). Infectam invertebrados, principalmente, insetos da ordem Lepidoptera, mas também das ordens Diptera e Hymenoptera (Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi, 1999). Os baculovírus tem sido amplamente utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos, já que são capazes de produzir e processar, em grande quantidade, proteínas de procariotos e eucariotos, o que o faz apropriado para o uso, por exemplo, como agentes profiláticos (vacinas) e para diagnose (O’Reilly *et al.*, 1992; Castro *et al.*,1999). Baculovírus também têm sido usados para o propósito de transferência gênica em células de mamíferos. Os tipos celulares que são suscetíveis constituem uma lista em expansão de

células humanas saudáveis e tumorais de várias origens (Guo *et al.*, 2011), resultando na utilização do vírus como um potente sistema de entrega em terapia gênica.

1.1.9.1-Classificação dos baculovírus

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a família *Baculoviridae* é classificada em dois gêneros, *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Os dois gêneros produzem partículas virais envoltas por uma oclusão cristalina de natureza protéica, também denominada corpo de oclusão, constituído principalmente pelas proteínas poliedrina ou granulina, respectivamente, dependendo do gênero (Murphy, 1995). Os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) possuem corpos de oclusão denominados poliedros variando entre 0,15 a 15µm (Bilimoria, 1991). Cada poliedro pode conter um ou vários nucleocapsídeos por vírion (Ribeiro & Crook, 1998; Castro e Souza, 2006) (Figura 10). O gênero *Granulovirus*, ou vírus da granulose, possui um corpo de oclusão denominado grânulo na forma ovicilíndrica com cerca de 0,3 a 0,5µm e cada grânulo contém um vírion, raramente dois ou três (Crook, 1991; Ribeiro *et al.*, 1998). Entretanto, Jehle e colaboradores (2006) propuseram uma reclassificação e renomeação dos gêneros de baculovírus, baseadas em evidências filogenéticas, composição do genoma e características morfológicas e patológicas. Esta nova classificação compreende os Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Gammabaculovirus e Deltabaculovirus.

Os Alphabaculovírus incluem todos os nucleopolyhedrovírus específicos para lepidópteros. Os Betabaculovírus compreendem todos os granulovírus de lepidópteros. Os Gammabaculovírus abrangem os nucleopolyhedrovírus de hymenopteros e os Deltabaculovírus os nucleopolyhedrovírus de dípteros. (Jehle *et al.*, 2006).

Como característica singular, os baculovírus apresentam dois fenótipos durante seu ciclo de infecção (Figura 10). O vírus extracelular BV (“Budded Virus”), que é responsável pela infecção sistêmica, isto é, de célula-a-célula no inseto, e o vírus ocluso, também denominado vírus derivado de oclusão ODV (“Occlusion Derived Virus”), sendo este responsável pela transmissão inseto-a-inseto (Smith *et al.*, 1983).

Apesar de serem morfológicamente distintos na composição de seus envelopes, não possuem as mesmas proteínas estruturais e terem sítios celulares de produção e maturação diferentes, os dois fenótipos são idênticos geneticamente (Smith & Summers, 1978).

O envelope dos vírus extracelulares (BV) é adaptado para o movimento e infecção dos tecidos do inseto. Em um dos pólos do envelope, existem projeções denominadas peplômeros, constituídos pela proteína GP64, no grupo I dos NPVs (Volkman *et al.*, 1984), ou pela proteína LD130 nos GVs e no grupo II dos NPVs (Pearson *et al.*, 2000). Durante a infecção, essas proteínas localizam áreas específicas na membrana celular direcionando a entrada do vírus na célula hospedeira através da endocitose mediada por receptores específicos (Blissard & Rohrmann, 1989).

Os vírus oclusos apresentam, no seu envelope e exposta ao meio exterior, a proteína P74. Uma das possíveis funções desta proteína é a ligação dos ODVs nas células epiteliais do intestino médio do inseto (Faulkner *et al.*, 1997). As partículas virais encontram-se imersas em uma matriz protéica formada predominantemente pela poliedrina (NPVs) ou granulina (GVs). Esta estrutura cristalina é solúvel apenas em condições alcalinas, proporcionando assim, estabilidade física e biológica aos vírions (Hu *et al.*, 1999).

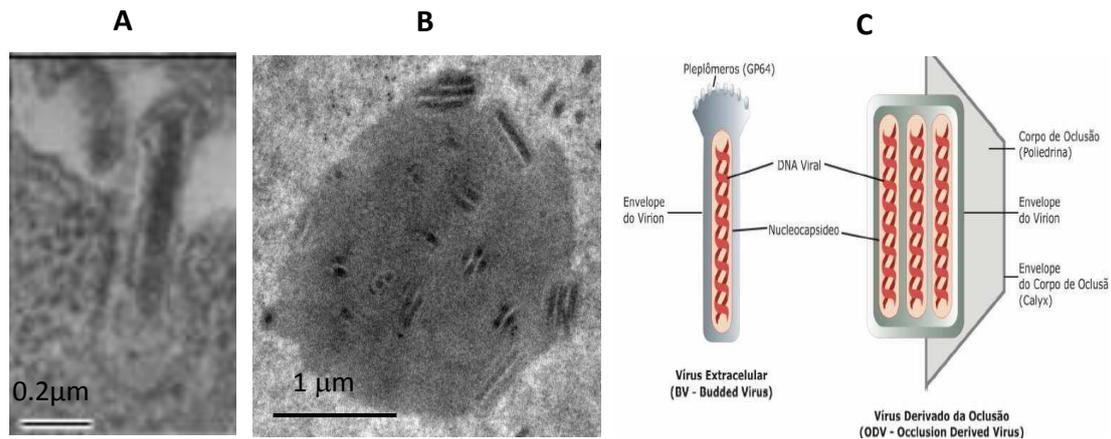


Figura 10. Ultraestrutura de um baculovírus. A, Microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma partícula viral extracelular ("budded virus") entrando em uma célula por endocitose. B, – Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas virais oclusas (ODV) em uma matriz protéica (corpo de oclusão). (Fonte: Bergmann Morais Ribeiro. Fotos não publicadas). C, Representação dos fenótipos BV (vírus extracelulares) e ODV (vírus derivados da oclusão). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

1.1.9.2-Modo de infecção

A principal rota natural de infecção é através da ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída (ODV). No ambiente altamente alcalino do intestino médio da larva do inseto-alvo, os poliedros são rapidamente dissolvidos e as partículas virais são liberadas, dando início à infecção das células epiteliais do intestino médio (Volkman & Keddie, 1990) (Figura 11).

Após a entrada no núcleo, o DNA viral é replicado, apresentando uma progênie de novos nucleocapsídeos após 8 horas de infecção. Esses nucleocapsídeos atravessam a membrana nuclear e são transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio, sendo liberados para infectar células do sistema respiratório e circulatório (Engelhard *et al.*, 1994). Alternativamente, os vírus oriundos da dissolução dos poliedros entram na célula colunar e a atravessam para infectar as células do sistema traqueal ou hemolinfa (Barrett *et al.*, 1998) (Figura 12).

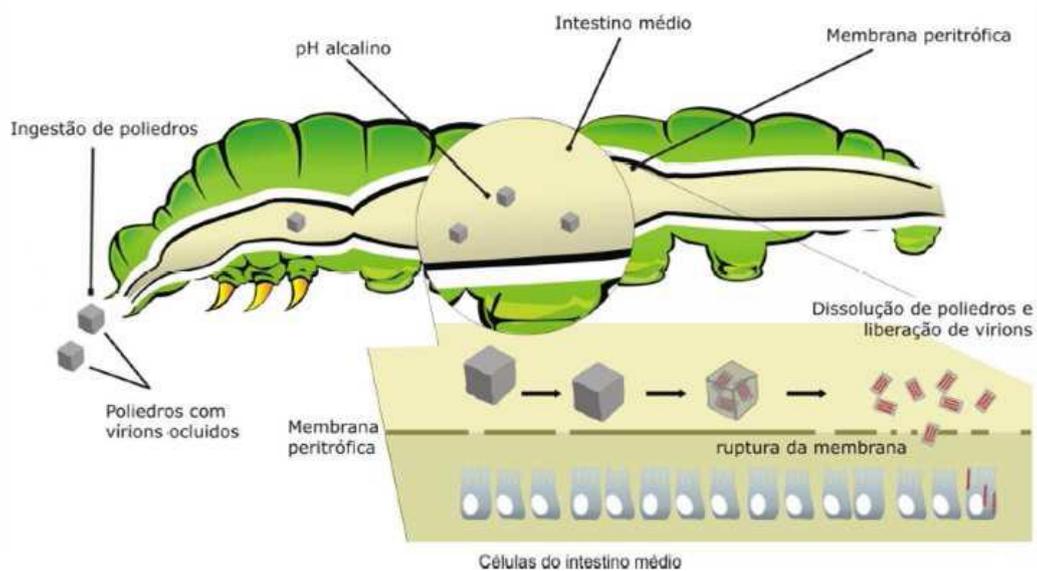


Figura 11. Início de infecção viral no intestino médio de uma lagarta infectada por baculovírus. A larva do inseto ingere os poliedros e, após a ingestão, estas seguem pelo trato digestivo. No intestino médio, devido ao pH altamente alcalino, as partículas virais são liberadas, passando pela membrana peritrófica e infectando as células colunares (caracterizando a infecção primária). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

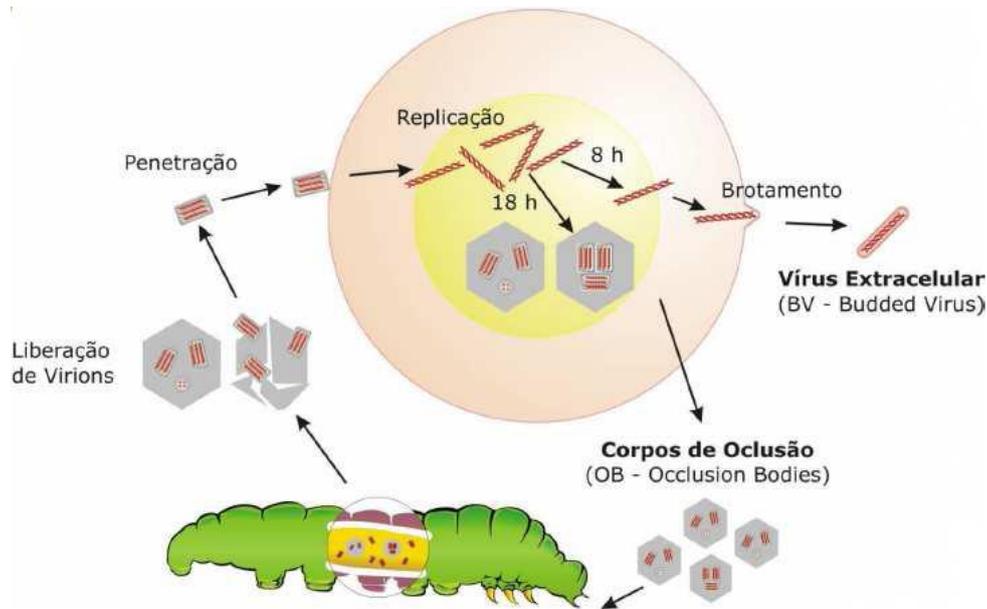


Figura 12. Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. O ciclo tem início com a ingestão de poliedros pela larva do inseto e, estes seguem pelo trato digestivo até chegarem ao intestino médio e sofrem dissolução pelo alto pH e liberam as partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (caracterizando a infecção primária). Depois da entrada do vírus na célula, o material genético segue em direção ao núcleo da célula hospedeira para a replicação viral e formação de novas partículas, os vírus extracelulares (BV), para o estabelecimento de uma infecção secundária. Com 18h pós-infecção, pode-se observar a formação de víriões envolvidos pela proteína poliedrina formando os vírus oclusos (ODV). Fonte: Castro & Souza, 2006 – ilustração adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003.

Um dos baculovírus melhor caracterizados é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrosis vírus* (AcMNPV), cujo genoma abriga pelo menos 154 ORFs (Ayres *et al.*, 1994). A expressão gênica do AcMNPV pode ser regulada, principalmente, em nível transcricional, e o ciclo de replicação viral pode ser intimamente regulado por fatores virais e ambiente celular, expressando sequencialmente genes nas fases de infecção precoce, tardia, e muito tardia (Friesen, 1997; Jiang *et al.*, 2006).

Os transcritos precoces (*early*) do AcMNPV são sintetizados pela RNA polimerase II do hospedeiro, enquanto os transcritos tardios (*late*) são produzidos por

uma RNA polimerase viral (Huh & Weaver, 1990). Para utilizar a maquinaria transcricional do hospedeiro, os baculovírus desenvolveram promotores que se assemelham aos promotores que contem elementos TATA responsivos à RNA polimerase II celular. Outros elementos regulatórios *cis*, como o motivo iniciador CAGT e elementos ativadores *downstream* foram também encontrados em promotores de vários genes precoces do AcMNPV (Pullen & Friesen, 1995). Ainda, transativadores virais potentes são sintetizados na fase precoce para estimular a expressão gênica viral, enquanto a concentração de DNA viral na celular hospedeira é baixa (Jiang *et al.*, 2006).

A fase de infecção tardia é dividida em dois estágios: tardio e muito tardio, que estendem-se de 6 a 76 horas pós infecção (h.p.i.). No estágio tardio (6 a 12 h.p.i.), foram identificados fatores de expressão tardia e, também, uma sequência motivo TAAG que constitui um elemento primário para atividade promotora tardia e muito tardia (Lu & Miller, 1997). No estágio de infecção muito tardio (18 a 76 h.p.i.), também conhecido como fase de oclusão, proteínas associadas com a oclusão, lise da célula e liberação dos vírus oclusos maduros são expressas (Lu & Miller, 1997). Nesse momento, alguns genes são expressos em altos níveis, como por exemplo, o gene da principal proteína do corpo de oclusão, poliedrina (Jiang *et al.*, 2006).

1.1.9.3-Baculovírus como vetor de expressão

Os baculovírus tem sido usados como vetores de expressão de proteínas heterólogas pela inserção de genes (humanos, outros vertebrados, plantas, bactérias e vírus) no genoma do vírus (Possee, 1997). Os genes heterólogos são inseridos sob o controle de um promotor forte de baculovírus (por exemplo, promotor da poliedrina ou

promotor da proteína P10) no *locus* de um gene não essencial para replicação do vírus. A poliedrina é a principal proteína do corpo de oclusão (também chamado de poliedro nos nucleopoliedrovírus) e é codificada por um gene não-essencial. A inativação desse gene por exclusão ou inserção de uma sequência de DNA produz um vírus que é capaz de se replicar em células de inseto, mas não produz poliedrina, não ocorrendo a formação do poliedro. A expressão do gene da poliedrina conduzida a partir de seu promotor produz, por volta de 70 horas após a infecção, aproximadamente uma quantidade de poliedrina equivalente a 20-50% do total de proteína produzida pela célula infectada (Ribeiro & Crook, 1998).

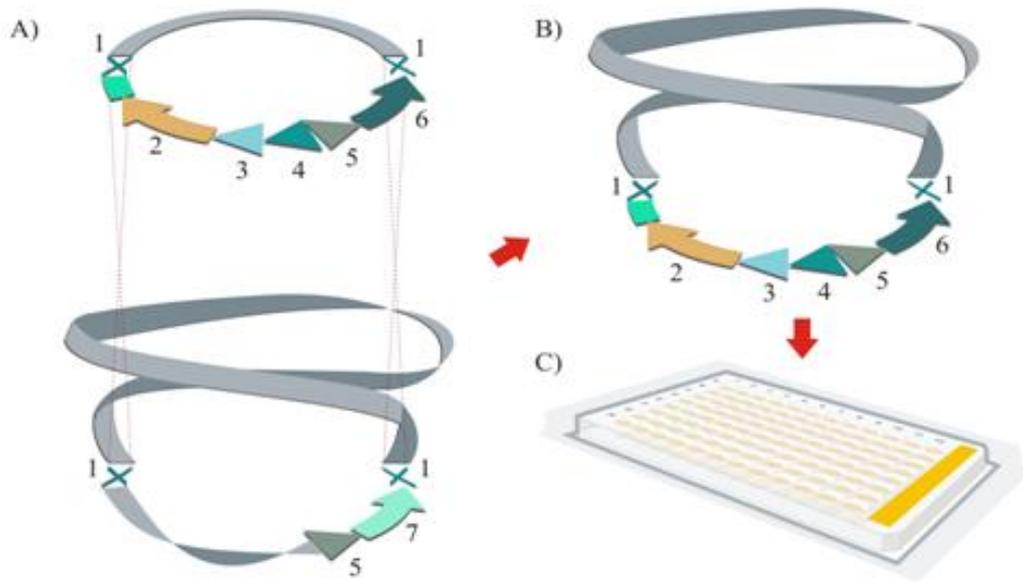
Analogamente, o promotor *p10* dos baculovírus também tem sido utilizado, uma vez que, também permite a produção de altos níveis de expressão e por não constituir o gene que codifica a proteína P10 um elemento essencial para a replicação viral (Vlak *et al.*, 1998; Weyer *et al.*, 1990). Os níveis de expressão dos genes exógenos em células de inseto, usando o sistema de expressão em baculovírus, são variáveis; o intervalo de 1 a 600 mg de proteína/litro de cultura tem sido relatado (Maiorela *et al.*, 1988; Luckow & Summers, 1988).

O sistema de expressão em baculovírus é amplamente utilizado na indústria e em laboratórios de pesquisa. Além dos altos níveis de expressão das proteínas recombinantes, o sistema é também conveniente em função da atividade biológica das proteínas heterólogas expressas ser geralmente eficiente, já que modificações pós-traducionais corretas como, N-glicosilação, O-glicosilação e clivagens proteolíticas podem ser realizadas em células de inseto. Algumas limitações também são atribuídas ao sistema de expressão baseado em baculovírus. Dentre estas, o fato de que células de inseto são incapazes de produzir complexos N-glicosilados com resíduos de galactose, no penúltimo e ácido siálico no último resíduo de sua cadeia, respectivamente.

Alternativamente, as células de inseto produzem, na maioria das vezes, N-glicanos mais simples com resíduos de manose terminais (Harrison & Jarvis, 2006).

A inserção de genes heterólogos em baculovírus pode ser mediada por recombinação homóloga, em célula de inseto, utilizando-se para este fim um vetor de transferência contendo um sítio de clonagem no qual será inserido o gene de interesse sob o comando de um promotor forte em uma fase tardia da infecção. Este cassete é flanqueado por regiões homólogas a seqüências do genoma viral onde ocorrerá a recombinação, após co-transfecção do DNA do vetor de transferência juntamente com o DNA do baculovírus, em célula de inseto (Figura 13). Existem vários sítios no genoma do baculovírus, onde genes heterólogos podem ser inseridos (O'Reilly *et al.*, 1992), dependendo do vetor.

A técnica de transposição é um modelo mais recente. O gene de interesse é inserido em um plasmídeo de transferência que possui regiões flanqueadoras capazes de realizar transposição. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria que contém além do seu genoma, o genoma do baculovírus na forma de um grande plasmídeo (bacmídeo), e outro plasmídeo “*helper*” que codifica uma transposase bacteriana (Luckow *et al.*, 1993). A transposição do gene de interesse é mediada pela transposase, presente na bactéria, para o genoma do baculovírus. Após a transposição, o DNA do bacmídeo é purificado e utilizado na transfecção de células de inseto. Este sistema elimina a fase de seleção e purificação de vírus recombinantes além de obter uma maior quantidade de vírus produzido (Kost *et al.*, 2005) (Figura 14).



- 1 – regiões flanqueadoras homólogas
- 2 – Gene exógeno
- 3 – PXIV (promotor)
- 4 – Psyn (promotor)

- 5 – Ppolh (promotor)
- 6 – Gene repórter
- 7 – *lac Z*

Figura 13. Esquema ilustrativo da construção e isolamento de baculovírus recombinantes pelo método de recombinação homóloga. Este evento ocorre entre as regiões flanqueadoras do cassete de expressão do gene exógeno, no vetor de transferência, e regiões homólogas no genoma do vírus selvagem (A). Dessa forma, o vírus recombinante adquire o cassete contendo o gene de interesse (B). O vírus recombinante é isolado em diluições seriadas em placas de 96 poços (C). Os promotores supracitados são derivados do promotor da poliedrina Ppolh. O vetor de transferência e o baculovírus mostrados acima correspondem ao pSynXIVVI+X3 e ao vSynVI-gal, respectivamente (Wang *et al.*, 1991).

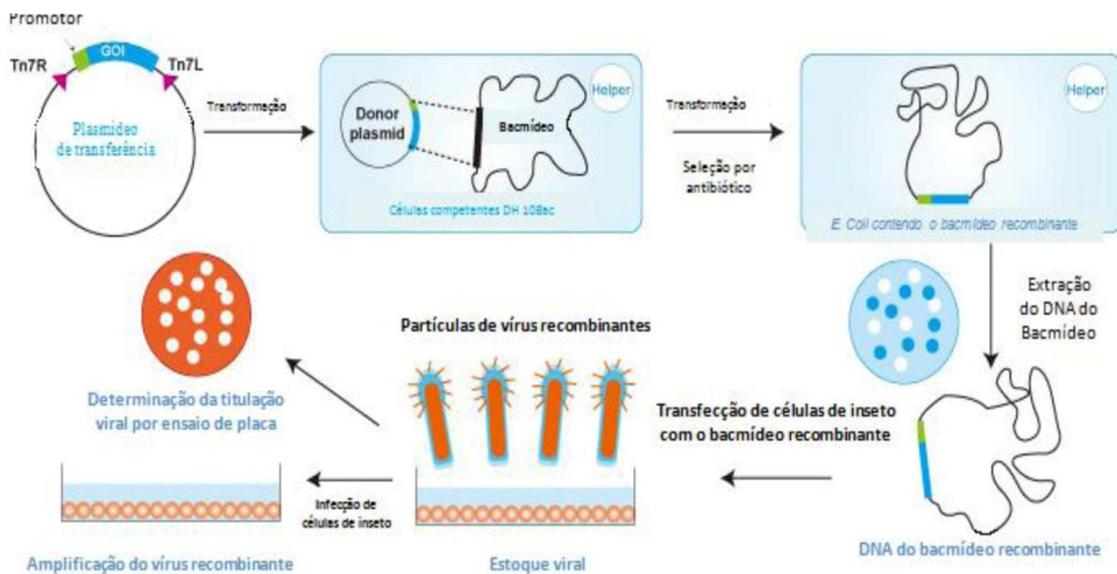


Figura 14. Esquema ilustrativo da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição (adaptado do Kit Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). O vetor de transferência, contendo o gene exógeno de interesse, é transformado em células competentes que abrigam o genoma do baculovírus na forma de bacmídeo. Uma transposase codificada por um plasmídeo “Helper” cataliza a transposição do cassete com o gene heterólogo sob o comando do promotor do gene da poliedrina para o bacmídeo. O gene *lac Z* está inserido no *locus* do gene da poliedrina no genoma do baculovírus e funciona como gene marcador para seleção de clones recombinantes. O DNA bacmídeo recombinante é isolado e utilizado para transfectar culturas de células de inseto para produção de vírus recombinantes.

Estratégias utilizando baculovírus para expressão de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* tem sido adotadas para diferentes finalidades. A inserção de genes *cry* em baculovírus pode aumentar a patogenicidade do vírus para insetos-praga, o que representa uma vantagem no controle de pragas, já que o tempo de morte do inseto-alvo é diminuído com o uso do baculovírus recombinante. A expressão de proteínas Cry e Cyt isoladamente em células de inseto, usando o baculovírus como vetor de expressão, possibilita o estudo dessas proteínas no que diz respeito à sua toxicidade, efeito sinérgico ou antagônico, quando testadas em conjunto, e a interação dessas com seus receptores em larvas suscetíveis (Merryweather *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1992; Ribeiro & Croock, 1998; Aguiar, 2006; Martins, 2005, 2006; Corrêa, 2007; Lima *et al.*, 2008).

2-OBJETIVOS

2.1-Geral

Avaliação da citotoxicidade individual e em conjunto de proteínas heterólogas Cry e Cyt de cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* em células de insetos das ordens Diptera e Lepidoptera, e em células de mamíferos, além de expressar a proteína Cyt2Ba fusionada à proteína de baculovírus, poliedrina, utilizando o sistema de expressão de proteína heteróloga em célula de inseto baseado em baculovírus para avaliar a purificação da proteína fusionada e sua toxicidade.

2.2-Específicos

- Amplificar por reação de polimerase em cadeia (PCR) o gene *cyt2Ba* de estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, clonar no vetor pGem[®]-T Easy e seqüenciar;
- Clonar os genes Cry e Cyt de interesse no vetor de expressão em *B. thuringiensis*;
- Clonar o gene *cyt2Ba* no vetor de transferência pFastPH³ e pFastBac1 para construção de baculovírus recombinantes;
- Analisar a expressão protéica das estirpes de *B. thuringiensis* construídas, bem como de células de inseto infectadas pelos baculovírus construídos, por SDS-PAGE;
- Purificar as proteínas de interesse, Cry e Cyt, por gradiente de sacarose e utilizar cromatografia de afinidade em coluna de níquel para otimizar a purificação de Cyt2Ba;
- Fazer ensaios de atividade com cada proteína purificada, isoladamente, em cultura de células de inseto (Diptera e Lepidoptera) e de mamífero.

- Fazer ensaios de atividade misturando-se as proteínas Cyt2Ba, Cry4Aa e Cry11A, purificadas em cultura de células de inseto e de mamífero.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Vírus e células

Os baculovírus recombinantes, vAcpolhCyt2Ba e vAcCyt2BaHis foram obtidos por transposição em *E. coli* DH10BacTM, segundo instruções do fabricante do kit Bacto-Bac (Invitrogen) e descrito no item 4.3. Os vírus foram propagados em células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4), em cultura (Granados *et al.*, 1994). As células foram mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

Células de *E. coli* DH5- α TM (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho: pGemcyt2BaNcoI, pGemcyt2BaHisBamHI, pGemcry4Aa, pFastPH³cyt2Ba, pFastcyt2BaHisBamHI, pSVP27Acry4Aa, pSVP27Acry11Aa, pSVP27Acry2Ba.

Estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, S-1989 e S-1806, foram obtidas do banco de *Bacillus* ssp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, Brasil) como fontes do genes *cyt2Ba*, *Cry4Aa* e *Cry11A*.

B. thuringiensis acristalífero 4Q7, gentilmente cedido pelo Dr. Colin Berry, Cardiff University-UK, foi utilizado para transformação, por eletroporação, com os vetores de expressão em *Bt* construídos.

Células de Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21AE (Vaughn *et al.*, 1977), *Limantria díspar* IPLB-LD-652Y (McClintock *et al.*, 1986), *Bombix mori* BM-5 (Grace, 1967), foram mantidas a 27 °C em meio TC-100 acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL). Células de *Aedes albopictus* C6/36 (Igarashi, 1978) foram cultivadas a 27 °C em meio Leibowitz L15, contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL).

Células humanas de câncer de mama MCF-7 (Soule *et al.*, 1973), foram cultivadas em meio DMEM (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂.

3.2-Extração do DNA plasmidial das estirpes S-1989 e S-1806 de *B. thuringiensis*

O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Cinco mL de meio LB (NaCl 10 g.L⁻¹, Triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹) foram inoculados com culturas das estirpes S-1989 e S-1806 de *B. thuringiensis* e mantidos sob agitação de 200 rpm a 28 °C por 20 h. As células foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 min e o sedimento foi ressuspensionado em 300 µL da solução TES (Tris-HCL 20 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, sacarose 20%) contendo 4 mg.L⁻¹ de lisozima. Após incubação a 37 °C por 1 h, foram adicionados 200 µL da solução de NaOH 0,2M e SDS 0,1%. A amostra foi homogeneizada gentilmente e mantida à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 200 µL de acetato de potássio 5M, pH 5,5 e a amostra homogeneizada e mantida no gelo por 15 min. Após centrifugação a 10.000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, por 20 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,6 V de isopropanol, sendo a mistura incubada por 1 h a 20 °C. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm em uma microcentrífuga, modelo 5415C, por 20 min, o sedimento lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente até completa evaporação do etanol. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM).

3.3-Amplificação, clonagem e sequenciamento dos genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI*.

Os genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI* obtidos das cepas *B. thuringiensis* S-1806 e S-1989, respectivamente, foram amplificados por reação de PCR utilizando-se 30 ng do DNA plasmidial de cada estirpe individualmente, 1X tampão de reação da enzima, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Phoneutria[®]), 0,4 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4μM de cada oligonucleotídeo (Tabela 3). As etapas de amplificação para os dois genes foram: 94°C/5 min seguido por 30 ciclos de 94°C/1 min, 52°C/1 min, 72°C/1 min e 30 s e uma extensão final a 72°C/7 min. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM-T[®]easy (Promega), de acordo com o protocolo de instruções do fabricante, e os plasmídeos construídos foram transformados em células de *Escherichia coli* DH5-α[®] (Invitrogen). Os DNAs dos plasmídeos recombinantes (pGemcyt2BaNcoI e pGemcyt2BaHisBamHI) foram purificados, utilizando-se o Kit de purificação de DNA Wizard[®]Plus SV Minipreps (Promega) e seqüenciado no seqüenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham Bioscience) na plataforma de seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com oligonucleotídeos universais (SP6 e T7) (Tabela 3) que se anelam nas regiões flangeadoras do sítio de múltipla clonagem do plasmídeo pGEMT[®]-easy. As análises das seqüências dos genes referidos acima foram feitas utilizando-se os programas BLAST e ORF Finder, disponíveis no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabela 3-Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'>3')	Aplicação
<i>cyt2BaNcoI forward</i>	CCATGGCGATGCACCTTAATAA	Amplificação
<i>cyt2BaNcoI reverse</i>	CCATGGATACGATTTTATTGGTA	Amplificação
<i>cyt2BaHisBamHI forward</i>	GGATCCATGCACCTTAATTTGAATAATTTT	Amplificação
<i>cyt2BaHisBamHI reverse</i>	GGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATAC GATTTTATTGGAT	Amplificação
<i>cry4Aa forward</i>	CGGATCCATGAATCCTTATCAAAATAA	Amplificação
<i>cry4Aa reverse</i>	CGGATCCTCACTCACTCGTTCATGAAATT	Amplificação
<i>cry11A forward</i>	CAGGATCCATGAATTATATGGAAGAT	Amplificação
<i>Cry11A reverse</i>	CAGGATCCCTACTTTAGTAACGGATT	Amplificação
polhF	AATGATAACCTCTCGC	Verificação da orientação da clonagem
M13F	GTTTTCCCAGTCACGAC	Confirmação do bacmídeo
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Confirmação do bacmídeo
SP6	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento
T7	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenciamento

3.4-Construção dos vetores de transferência contendo os genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI*

Um µg de cada um dos DNAs dos plasmídeos pGemcyt2BaNcoI e pGemcyt2BaHisBamHI foi digerido com 1U das enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI*, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Os fragmentos obtidos (aproximadamente 800 pares de bases, pb) contendo os genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI* foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% seguindo instruções descritas em Sambrook *et al.* (2001). As bandas correspondentes aos genes *cyt2Ba* foram eluídas do gel usando-se o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (GE Healthcare). O gene *cyt2BaNcoI* foi clonado no vetor de transferência pFastPH³ (Figura 15A, Costa, 2008), previamente digerido com a enzima de restrição *NcoI* (Promega), seguindo-se instruções do fabricante, e desfosforilado por reação com a enzima CIAP “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase” (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. O gene *cyt2BaHisBamHI* foi clonado no vetor de transferência pFastBacTM 1 (Invitrogen) (Figura 15B), previamente digerido com a enzima de restrição *BamHI* (Promega), seguindo-se instruções do fabricante, e desfosforilado por reação com a enzima CIAP (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. As ligações foram utilizadas para transformação bacteriana em células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) pelo método de choque térmico descrito em Sambrook *et al.* (1989). Os clones positivos foram selecionados por resistência em meio com os antibióticos ampicilina (100 μ g/mL) e gentamicina (7 μ g/mL). Análises por PCR, utilizando os oligonucleotídeos *cyt2BaNcoI forward* e *cyt2BaNcoI reverse*, específicos para o gene *cyt2BaNcoI*, e *cyt2BaHisBamHI forward* e *cyt2BaHisBamHI reverse*, específicos para o gene *cyt2BaHisBamHI*, foram realizadas para confirmar a clonagem dos genes nos vetores de transferência. As etapas de amplificação foram idênticas às descritas no item 3.3. A correta orientação do gene *cyt2BaHisBamHI* clonado no vetor de expressão ainda foi confirmada por PCR usando-se os oligonucleotídeos *polhF* e *cyt2BaHisBamHI reverse* e o programa com 94°C/5 min seguido por 30 ciclos de 94°C/1 min, 53°C/1 min, 72°C/1 min e 30 s e uma extensão final a 72°C/7 min.

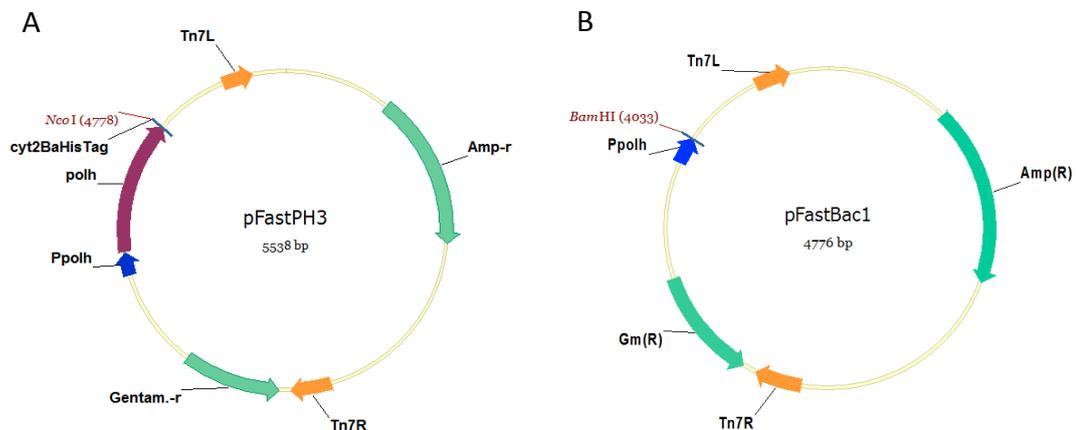


Figura 15. Mapa físico dos vetores de transferência usados para produção de baculovírus recombinantes. A, Mapa do vetor pFastPH3; B, Mapa do vetor pFastBac1 indicando o sítio de restrição *Bam*HI para clonagem do gene *cyt2BaHisBamHI*. Em azul, o promotor Ppolh. Em laranja, as regiões responsáveis pela transposição do cassete para o genoma do baculovírus, mediada por uma transposase. Em verde, os genes de seleção por antibióticos. Em roxo, o gene *polh* contendo um sítio *Nco*I para clonagem de um gene de interesse, implicando em sua fusão, em fase de leitura, ao gene *polh* e à uma cauda de hexa-histidina (A).

3.5-Construção dos vetores de expressão contendo os genes *cyt2BaHisBamHI*, *cry4Aa* e *cry11A* e para transformação de *B. thuringiensis*.

Um μ g de cada um dos DNAs dos plasmídeos pGemcyt2BaHisBamHI, pGemcry4Aa (Corrêa, 2007), pFastcry11A (Lima, 2009), foi digerido com 1U da enzima de restrição *Bam*HI, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Promega) para liberação de fragmentos contendo os genes *cyt2BaHisBamHI*, *cry4Aa*, *cry11A*. Os fragmentos obtidos (aproximadamente 800, 3500 e 1900 pb, respectivamente) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% seguindo instruções descritas em Sambrook & Russel (2001). As bandas correspondentes aos genes citados foram eluídas do gel usando-se o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e clonadas no vetor de expressão em *B. thuringiensis*,

pSVP27A (Figura 16), gentilmente cedido pelo Dr. David Ellar, University of Cambridge, UK (Crickmore & Ellar, 1992; Crickmore, 1990), previamente digerido com a enzima de restrição *Bam*HI (Promega) e desfosforilado por reação com a enzima CIAP (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Os plasmídeos construídos, pSVP27Acry4Aa e pSVP27Acyt2His foram transformados em células competentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) pelo método de choque térmico descrito em Sambrook & Russel (2001). Os clones positivos foram selecionados por resistência em meio com o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL). Os plasmídeos foram isolados por lise alcalina como descrito por Sambrook *et al.*, (1989) e submetidos à ensaios de restrição com a enzima *Hind*III (Promega), conforme instruções do fabricante, para verificação da orientação dos genes clonados. O plasmídeo obtido, pSVP27Acry11A, foi, da mesma forma, transformado em células competentes *E. coli* DH5 α , isolado por lise alcalina e digerido com a enzima de restrição *Eco*RI (Promega), seguindo-se instruções do fabricante, para análise da orientação do gene clonado.

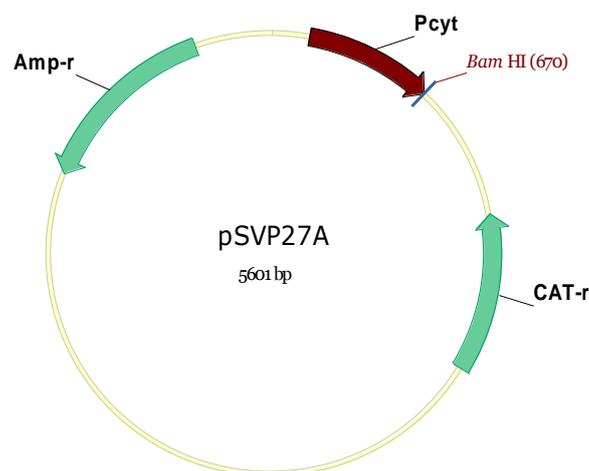


Figura 16. Mapa físico do vetor de expressão, pSVP27A, usado para expressão de proteínas heterólogas em *B. thuringiensis*. Em vermelho vinho, o promotor Pcyt para expressão da proteína exógena na fase de esporulação do crescimento bacteriano. Em verde, os genes de seleção por antibióticos. O sítio de restrição *Bam*H I, localizado após do promotor Pcyt, faz parte de um sítio de multiclonagem para inserção de genes de interesse. CAT-r, refere-se ao gene de resistência a cloranfenicol.

As construções foram transformadas em células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e os clones positivos foram selecionados por resistência em meio com ampicilina (100 μ g/mL).

3.6-Construção, por transposição sítio-específica, de baculovírus recombinantes contendo os genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI*

Células *E. coli* DH10BacTM foram utilizadas para dois eventos de transformação distintos com DNA dos vetores de transferência pFastcyt2BaNcoI e pFastcyt2BaHisBamHI de acordo com as instruções do kit Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System (Invitrogen). As células foram incubadas em placa de Petri com IPTG e X-Gal a 37°C por 48 h e os clones positivos selecionados por apresentarem coloração branca devido à interrupção do gene *lac Z*, nos bacmídeos recombinantes, pelos genes *cyt2BaNcoI* e *cyt2BaHisBamHI*. Análises por PCR foram realizadas usando-se os pares de oligonucleotídeos M13F/M13R, M13F/*cyt2BaNcoI reverse* e *cyt2BaNcoI forward/cyt2BaNcoI reverse* para confirmar a inserção do gene *cyt2BaNcoI* no bacmídeo da colônia selecionada. Do mesmo modo, o bacmídeo contendo o cassete de expressão do gene *cyt2BaHisBamHI* foi analisado por PCR com os pares de oligonucleotídeos *cyt2BaHisBamHI forward/cyt2BaHisBamHI reverse* e *cyt2BaHisBamHI forward/M13R*. Um μ g do DNA de cada bacmídeo recombinante foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-TN5B1-4 (10⁶ células). Os bacmídeos foram diluídos em 250 μ l de meio de cultura TC-100 sem soro em duas placas (TPP) de 35 mm. A mesma diluição foi realizada com 10 μ l de lipofectina (Cellfectin[®], Invitrogen). As diluições foram misturadas e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das placas contendo as células foi, posteriormente, substituído por 500 μ l da mistura de DNA/lipofectina possibilitando a cobertura da

monocamada de células. A placa foi incubada por 3 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado a cada placa 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C por sete dias. Seguindo-se este intervalo de tempo, o sobrenadante das placas foi utilizado para amplificação dos vírus em duas novas placas de 100 mm contendo células BTI-TN5B1-4. Foi realizada visualização das placas por microscopia de luz invertida (Axiovert 100, Zeiss) para observação de efeitos citopáticos como resultado da infecção pelos vírus recombinantes.

3.7-Obtenção de cepas de *B. thuringiensis* contendo os genes *cyt2BaHisBamHI*, *cry4Aa* e *cry11A*.

Um µg dos DNAs de cada um dos plasmídeos pSVP27Acyt2BaHisBamHI, pSVP27Acry4Aa, pSVP27Acry11A, foi transformado na estirpe acristalífera de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7 por eletroporação. O protocolo seguido foi descrito por Peng e colaboradores (2009). As amostras contendo os plasmídeos citados acima foram dessalinizadas como descrito por Schlaak e colaboradores (2005) com modificações. As células de *B. thuringiensis* 4Q7 foram crescidas *overnight* em meio LB a 28°C, 200 rpm. Este cultivo foi diluído em um volume apropriado (1/100) do mesmo meio de cultura para que fosse obtida uma densidade óptica inicial 600nm (OD₆₀₀) de 0,02-0,03, medida no SmartSpecTM Plus (BioRad). Ao atingir a OD₆₀₀ de 0,2, as células foram incubadas por 1 hora com 3% de glicina a partir de uma solução de glicina a 50% (p/v) previamente preparada e esterilizada a 121°C por 15 min. Após o tempo de incubação, as células foram colocadas em gelo por 5 min e, em seguida, coletadas por centrifugação a 5000 x g a 4°C por 5 min. O sedimento foi lavado e centrifugado a 5000 x g a 4°C por 5 min por três vezes com uma solução contendo 272 mM de sacarose, 0,5 mM de MgCl₂, 0,5mM k₂HPO₄ e 0,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2. As

células foram ressuspensas em um pequeno volume da mesma solução de modo a serem concentradas cem vezes. Cem μL de células foram usados para transformação com DNA plasmidial em cuvetas de 2 mm. Os parâmetros de eletroporação foram ajustados no aparelho BTX Electro Cell ManipulatorTM 600, usando-se a seguinte configuração: 15 kV cm^{-1} , 200Ω e $25 \mu\text{F}$. Após a eletroporação, a suspensão celular foi diluída em 1 mL de meio LB e incubada por 2 horas a 28°C , 200 rpm. Após recuperação celular, o plaqueamento foi realizado conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001) em meio LB contendo cloranfenicol na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. As colônias transformadas foram selecionadas por PCR usando-se oligonucleotídeos específicos para os genes *cyt2BaHisBamHI*, *cry11A* e *cry4Aa* (descritos anteriormente na Tabela 3).

3.8-Expressão da proteína Cyt2BaNcoI por baculovírus recombinante.

O vírus recombinante, vAcpolhcyt2BaNcoI foi utilizado, na concentração inicial de 10 pfu/célula (unidade formadora de placa), para infectar 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4 em uma placa de 100 mm de diâmetro (TPP). A placa foi incubada a 27°C e as células foram coletadas a 96 h.p.i. e centrifugadas a $5.000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado três vezes com PBS (136 mM NaCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 2,6 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4). O extrato de células foi ressuspensado em 100 μl de PBS e estocado a -80°C .

3.9- Expressão, purificação e solubilização das proteínas Cry e Cyt de *B. thuringiensis*.

As três proteínas Cry e Cyt foram purificadas de uma estirpe acristalífera de *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7. As células de *Bt* foram transformadas por eletroporação como descrito por Peng e colaboradores (2009), com modificações, com os plasmídeos pSVP27Acyt2BaHis, pSVP27Acry4Aa, pSVP27Acry11A. Os parâmetros de eletroporação foram ajustados no aparelho BTX Electro Cell Manipulator™ 600, usando-se a seguinte configuração: 15 kV cm⁻¹, 200 Ω e 25 µF. Após eletroporação, a suspensão celular foi diluída em 1 mL de meio LB e incubada por 2 h a 28 °C, 200 rpm. Após recuperação celular por centrifugação, o plaqueamento foi realizado conforme descrito por Sambrook & Russel (2001) em meio LB contendo cloranfenicol na concentração de 10 µg mL⁻¹. Os clones transformados positivos foram crescidos em meio NYSM (Yousten, 1984) seletivo com 10 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol a 30 °C por 72 h. Após este período, as proteínas de interesse foram purificadas em gradiente de sacarose descontínuo de acordo com protocolo descrito em trabalhos anteriores (Thomas & Ellar, 1983), com modificações. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min e o sobrenadante referente a cada cultivo das estirpes transformadas foi eliminado. Os sedimentos foram ressuspensos e lavados em 30 mL de uma solução contendo 0,3M de NaCl, 0,01M de EDTA pH 8,0 e submetidos à centrifugação a 12.000 x g por 10 min. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo o sobrenadante descartado e os sedimentos ressuspensos em 30 mL de PMSF a 1,0 mM ao final da terceira centrifugação. As amostras foram novamente lavadas três vezes com o mesmo volume de PMSF a 1,0 mM por centrifugação a 12.000 x g por 10 min. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão TTN (20mM de Tris-HCl, 0,1% de Triton x-100, 300mM de NaCl pH 7,2). As amostras foram submetidas a centrifugação a 25.000 x g por 1 h em gradiente de sacarose contendo soluções a 84%,

79%, 72%, 67% e 54%. As bandas formadas no gradiente, correspondentes às proteínas Cry11A, Cry4A e Cyt2BaHis foram coletadas e adicionadas a 30 mL de solução de Triton x-100 a 0,1%. Uma nova centrifugação a 25.000 x g por 45 min foi realizada e os sedimentos ressuspensos em PMSF a 1,0 mM. Os cristais das proteínas Cyt2BaHis e Cry11A foram solubilizados com 0,1M de Na₂CO₃ pH 10,5 a 37 °C/2 h. Os cristais contendo a proteína Cry4Aa foram solubilizados com a mesma solução acrescida de 0,2% de β-mercapto-etanol. As porções insolúveis foram retiradas por centrifugação. Todas as amostras foram neutralizadas com 0,1M de Tris-HCl pH 7.5 (Bravo *et al.*, 2001). A proteína Cyt2Ba fusionada à cauda 6xHis foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna contendo agarose Ni-NTA (The QIA expressionistTM), seguindo-se instruções do fabricante, para remoção de contaminantes. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, conforme Laemmli (1970) usando o aparato Mini-Protean II de acordo com protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad).

3.10-Imunodeteção das proteínas Cyt2BaNcoI e Cyt2BaHisBamHI.

Foram utilizados 30 µl das amostras de extrato de células de inseto infectadas com o vírus recombinante vAcpolhcyt2BaNcoI e da purificação da proteína Cyt2BaHisBamHI em gradiente de sacarose para análise em dois géis (para cada amostra) SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970) usando o aparato Mini-Protean II de acordo com protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40% Metanol, 10% ácido acético e Azul de Commassie 0,1%, por 4 h e descorado em solução descorante de 40% metanol, 10% ácido acético por 2 h. O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose

(GE Healthcare), para imuno-deteção (“Western-Blot), de acordo com Harlow & Lane (1988). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, usando-se o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot[®] SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com protocolo do fabricante e com tampão de transferência (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,2). A membrana foi bloqueada com 3% de BSA em PBS 1X por 16 h. Em seguida, foram feitas três lavagens da membrana com 0,05% de TWEEN 20 em PBS 1X. Para deteção da proteína Cyt2BaNcoI, foi usado o anticorpo primário monoclonal anti-His (C-term) (Invitrogen) seguindo-se instruções do fabricante. Após incubação por 1 h, a membrana foi lavada três vezes com 0,05% de TWEEN 20 em PBS 1X. Foi adicionado o anticorpo secundário “anti-mouse” conjugado à fosfatase alcalina (Invitrogen) seguindo-se instruções do fabricante. Após incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada por três vezes com 0,05% de TWEEN 20 em PBS 1X. A reação de marcação foi produzida usando-se o Kit NBT/BCIP (Invitrogen) seguindo-se instruções do fabricante.

3.11-Ativação das protoxinas

As amostras foram quantificadas por fluoroespectrofotometria usando se o aparato NanoDrop 3300 e o kit Quant-It[™] Assay (Invitrogen). As protoxinas Cry purificadas foram ativadas usando-se dois procedimentos distintos. No primeiro, as protoxinas solubilizadas foram incubadas com tripsina bovina pancreática (Sigma) na proporção de 10:1 por 2 h a 37 °C. No segundo, extrato contendo proteases de 10 intestinos médios retirados de larvas de *Spodoptera frugiperda* de quarto instar foram obtidas (Silva-Werneck & Ellar, 2008) e quantificadas pelo mesmo método descrito anteriormente. As protoxinas Cry4Aa e Cry11A foram incubadas com o suco gástrico

na proporção de 10:1 por 2 h a 37 °C. As amostras derivadas dos dois métodos de ativação foram dializadas contra água destilada usando-se discos de membrana de 0,025µm Millipore™ e analisadas em SDS-PAGE a 12%. Cyt2BaHis purificada foi também ativada com tripsina e dialisada nas mesmas condições descritas para as proteínas Cry. Análise por “*westernblot*” foi procedida usando-se anticorpo anti-his (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante.

3.12-Ensaio de citotoxicidade

As linhagens celulares de inseto (IPLB-SF-21AE, IPLB-LD-652Y, BM-5 e C6/36) e células humanas (MCF-7), crescidas em frascos TPP de 25 cm², foram ressuspensas e utilizadas para preparação de placas de 96 poços. As células MCF-7 foram previamente lavadas com 1 mL de PBS para remoção do meio de cultura e uma solução de 0,05% de tripsina/EDTA foi adicionada. A cultura de células foi incubada em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 min. Após este período, foi adicionado meio DMEM e as células desaderidas foram centrifugadas a 1000 x g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio DMEM. As placas de 96 poços foram preparadas de modo que cada poço contivesse 10⁴ células em 200 µL de meio de cultura para formação de monocamadas confluentes. As toxinas ativadas, Cyt2Ba, Cry4Aa e Cry11A foram adicionadas aos poços de cada placa das culturas celulares em concentrações pré-definidas. A toxina Cyt2Ba foi testada em duas concentrações (5 ou 20 µg/mL) isoladamente ou em combinações com as outras toxinas. As toxinas Cry4Aa e Cry11A foram testadas sempre na concentração de 20 µg/mL, individualmente ou também combinadas entre si ou com Cyt2Ba. Todas as toxinas também foram incubadas, nas concentrações mencionadas, com os diferentes meios de

cultura na ausência de células. Tripsina e suco gástrico foram incubados individualmente com células C6/36. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A incubação das três toxinas e das proteases com as células e meios de cultura foi feita por 30 min. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e incubado por 10 min com o CellTiter-Glo® Reagent do kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) para quantificação de ATP liberado no meio de cultura. As medições baseadas em luminescência foram feitas usando-se o luminômetro Turner TD20/20, com os seguintes parâmetros de medição: *delay time* – 5 s, *integration time* – 20 s, *sensitivity* 50%.

4-RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1-Clonagem do gene *cyt2BaNcoI* da estirpe S-1806 de *B. thuringiensis*

O gene *cyt2BaNcoI* foi amplificado a partir da cepa 1806 de *Bt*, pertencente ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos (*cyt2BaNcoI forward* e *cyt2BaNcoI reverse*), contendo em suas extremidades 5', sítios para enzima de restrição *NcoI*, além de uma alteração no códon de terminação para fusão posterior, em fase de leitura, com a sequência codante de uma cauda de hexa-histidina no plasmídeo pFastPH³, gentilmente cedido por Márcio Hedil de Oliveira Costa (Costa, 2008). O fragmento de cerca de 800 pb, obtido por PCR, e correspondente ao gene *cyt2BaNcoI* foi clonado no pGem® T-Easy (Promega), resultando no plasmídeo pGemcyt2BaNcoI (Figura 17A). A confirmação dessa clonagem se deu por PCR utilizando os mesmos primers *forward* e *reverse* descritos (Figura 17B). O plasmídeo pGemcyt2BaNcoI foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* para liberação do fragmento contendo o gene *cyt2BaNcoI* (Figura 17C).

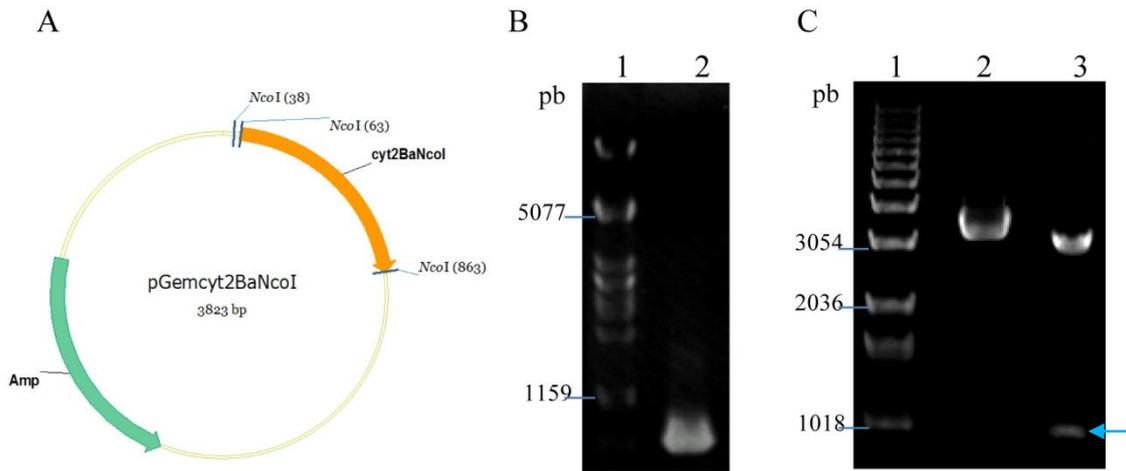


Figura 17. Clonagem do gene *cyt2BaNco I* no vetor de clonagem pGem® T-Easy. A, Mapa físico do plasmídeo pGem*cyt2BaNcoI*. B, gel de agarose a 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt2Ba* por PCR. 1, marcador Lambda/*PstI* (Promega); 2, fragmento obtido por PCR de aproximadamente 800 pb referente ao gene *cyt2BaNcoI*. C, gel de agarose a 0,8% mostrando digestão do vetor de clonagem pGem*cyt2BaNcoI*. 1, marcador 1kb DNA Ladder (Invitrogen); 2, plasmídeo pGem*cyt2NcoI* intacto; 3, digestão do plasmídeo pGem*cyt2BaNcoI* com a enzima de restrição *NcoI*, liberando um fragmento de 800pb referente ao gene *cyt2BaNcoI* (seta azul).

A análise do seqüenciamento com os oligonucleotídeos SP6 e T7 revelou uma ORF de 797 pb correspondente a 263 aminoácidos. A análise por BLAST do seqüenciamento obtido mostrou que o gene é idêntico ao *cyt2Ba* descrito por Guerchicoff e colaboradores (1997), depositado no Genbank acesso nº U52043, exceto pela alteração proposital no códon de terminação (Figura 18).

```

1 ccatggcgatgcaccttaataatttgaataattttaataatttagaaaacaatggtgaatatcactgt
  M H L N N L N N F N N L E N N G E Y H C
69 tcaggacctattattaaaaaacggttaggcatattgcattaacagttccatccagtgatataact
  S G P I I K K P F R H I A L T V P S S D I T
135 aattttaatgaaatTTTTTatgtagagccacaatacattgctcaagcaattcgTTTaaacaataca
  N F N E I F Y V E P Q Y I A Q A I R L T N T
201 tttcaaggagctatagatccacttaccttaaatttcaattttgaaaaagctttacaaattgcaaat
  F Q G A I D P L T L N F N F E K A L Q I A N
267 ggtcttcctaatgcaggagttacaggaactattaatcaaagtgaattcatcaacaattgaagtt
  G L P N A G V T G T I N Q S V I H Q T I E V
333 tcagttatgattagtcaaattaaagaaattattagaagtgtgctagggctcgTTatcaatagtgtc
  S V M I S Q I K E I I R S V L G L V I N S A
399 aatttttggAACagcgtagTatctgctattacaatacatttacaattttagaacctcaagtagat
  N F W N S V V S A I T N T F T N L E P Q V D
465 gaaaattggattgtttggcgtaatttatcagctactcaacaagttatTTTTataaaatTTTatTT
  E N W I V W R N L S A T Q T S Y F Y K I L F
531 tctattcaaaatgaagatacaggtagatttatggcaatattgcctatagcatttgaattactgtg
  S I Q N E D T G R F M A I L P I A F E I T V
597 gatgttcaaaaacaacaattattattcattacaataaaagatagTgcacgatatgaagttaaaatg
  D V Q K Q Q L L F I T I K D S A R Y E V K M
663 aaagctcttactgtagttcaagctttagattccttataatgcaccattatagatgtatTTaatgTt
  K A L T V V Q A L D S Y N A P I I D V F N V
729 cgtaactatagcttacatcgTccaaatcataatattccttcaaaatctgaatgttaatccaataaaa
  R N Y S L H R P N H N I L Q N L N V N P I K
795 tcgtatggTacc
  S *

```

Figura 18. Análise da seqüência do gene *cyt2BaNcoI*. As seqüências utilizadas para a confecção dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento (Tabela 3) estão em destaque. Em azul, é mostrado o oligo *Cyt2BaNcoI forward*. Em vermelho, é mostrada a seqüência usada como molde para o oligo *Cyt2BaNcoI reverse*. Em rosa, aparecem as seqüências correspondentes ao sítio de restrição da enzima *NcoI*. A seqüência de aminoácidos é mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. A metionina de início está destacada em azul claro e a alteração de um nucleotídeo do códon de terminação em verde.

4.2-Clonagem do gene *cyt2BaHisBamHI* da estirpe S-1989 de *B. thuringiensis*.

O gene *cyt2BaHisBamHI* foi obtido a partir da cepa 1989 de *Bt*, pertencente ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O gene foi amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos (*cyt2BaHisBamHI forward* e *cyt2BaHisBamHI reverse*) que contem sítios para a enzima de restrição *BamHI*, além de uma alteração no códon de terminação para adição de uma cauda de

hexa-histidina na extremidade 3' do gene. O gene *cyt2BaHisBamHI* foi clonado no pGem® T-Easy (Promega), resultando na construção do plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI (Figura 19). A confirmação dessa clonagem se deu por PCR utilizando os primers *forward* e *reverse* do gene *cyt2BaHisBamHI* (Figura 19A). O plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI foi digerido com a Enzima de restrição *BamHI* para liberação do fragmento contendo o gene *cyt2BaHisBamHI* permitindo sua clonagem posterior no vetor de expressão em *B. thuringiensis*, pSVP27A (Crickmore & Ellar, 1992) e no vetor de transferência pFastBac™ 1 para transposição sítio-específica em células DH10Bac™ (Figura 19B). A análise do seqüenciamento com os oligonucleotídeos SP6 e T7 revelou uma ORF de 813 pb correspondente a 270 aminoácidos. A análise por BLAST do seqüenciamento obtido mostrou que o gene é idêntico ao *cyt2Ba* descrito por Guerchicoff e colaboradores (1997), depositado no Genbank acesso nº U52043, exceto pela alteração proposital no códon de terminação e pela adição da cauda de hexa-histidina (Figura 20).

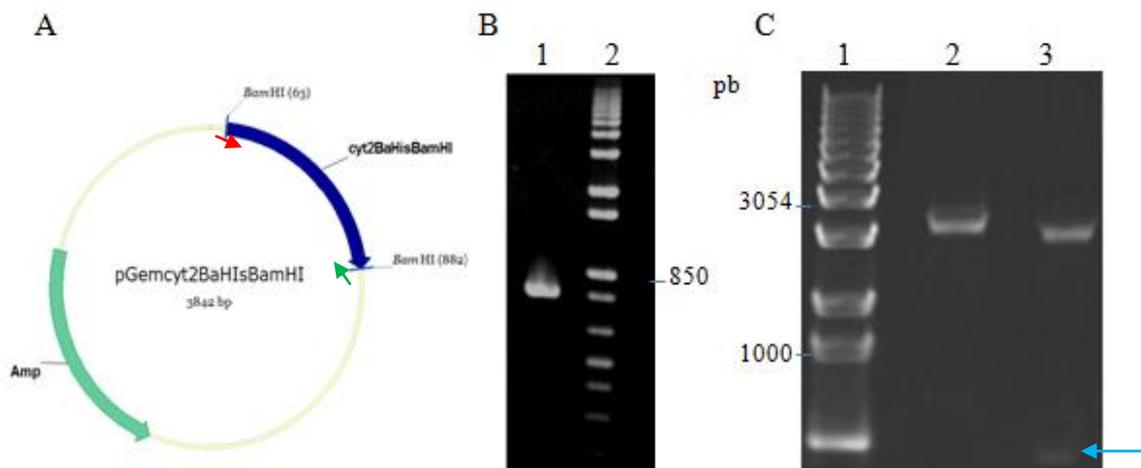


Figura 19. Clonagem do gene *cyt2BaHisBamHI* no vetor de clonagem pGem® T-Easy. A, Mapa físico do plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI. As setas vermelha e verde indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para PCR. B, gel de agarose a 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt2BaHisBamHI* por PCR. 1, fragmento obtido por PCR de aproximadamente 850 pb referente ao gene *cyt2BaHisBamHI*; 2, marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). C, gel de agarose a 0,8% mostrando digestão do vetor de clonagem pGemcyt2BaHisBamHI. 1, marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2, plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI intacto; 3,

digestão do plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI com a enzima de restrição *Bam*HI, para liberação do gene *cyt2BaHisBamHI*, indicado pela seta azul.

```

1 ggatccatgcaccttaataatttgaataattttaataatttagaaaacaatggatgaatatcactgt
  M H L N N L N N F N N L E N N G E Y H C
67 tcaggacctattattaaaaaacgtttaggcatattgcattaacagttccatccagtgatataact
  S G P I I K K P F R H I A L T V P S S D I T
133 aattttaatgaaattttttatgtagagccacaatacattgctcaagcaattcgtttaacaaatata
  N F N E I F Y V E P Q Y I A Q A I R L T N T
199 tttcaaggagctatagatccacttaccttaaatttcaattttgaaaagctttacaaattgcaaat
  F Q G A I D P L T L N F N F E K A L Q I A N
265 ggtcttcctaataatgcaggagttacaggaactattaatcaaagtgttaattcatcaacaattgaagtt
  G L P N A G V T G T I N Q S V I H Q T I E V
331 tcagttatgattagtcaaattaaagaaattattagaagtgtgctagggctcgttatcaatagtgct
  S V M I S Q I K E I I R S V L G L V I N S A
397 aatttttggaacagcgtagtatctgctattacaaatacatttacaattttagaacctcaagtagat
  N F W N S V V S A I T N T F T N L E P Q V D
463 gaaaattggattgtttggcgttaatttatcgctactcaacaagttatttttataaaattttttt
  E N W I V W R N L S A T Q T S Y F Y K I L F
529 tctattcaaaatgaagatacaggtagattttatggcaatattgcctatagcatttgaaattactgtg
  S I Q N E D T G R F M A I L P I A F E I T V
595 gatgttcaaaaaacaacaattattattcattacaataaaagatagtgacgatatgaagttaaaatg
  D V Q K Q Q L L F I T I K D S A R Y E V K M
661 aaagctcttactgtagttcaagcttttagattccttataatgcacccattatagatgtatthaatggt
  K A L T V V Q A L D S Y N A P I I D V F N V
727 cgtaactatagcttacatcgccaatcataatattcttcaaaatctgaatgtaatccaataaaa
  R N Y S L H R P N H N I L Q N L N V N P I K
793 tcgatatcaccaccaccaccaccactaaggatcc
  S Y H H H H H H H *

```

Figura 30. Análise da seqüência do gene *cry2BaHisBamHI*. As seqüências utilizadas para a confecção dos oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento (Tabela 3) estão em destaque. Em azul, é mostrado o oligo Cyt2BaHisBamHI *forward*. Em vermelho, é mostrada a seqüência usada como molde para o oligo (“reverse”) Cyt2BaHisBamHI *reverse*. Em rosa, aparecem as seqüências correspondentes ao sítio de restrição da enzima *Bam*HI adicionadas a cada oligo. Em laranja, os códons relativos à cauda de hexa-histidina. A seqüência de aminoácidos é mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. A metionina de início está destacada em azul claro e a alteração do códon de terminação em verde para fusão à cauda de hexa-histidina.

4.3-Construção dos vetores de transferência e dos baculovírus recombinantes

Após digestão dos plasmídeos pGemcyt2BaNcoI e pGemcyt2BaHisBamHI para liberação dos genes clonados, os mesmos foram, respectivamente, subclonados nos

vetores de transferência pFastPH³, previamente digerido e linearizado com *Nco*I, e pFastBacTM 1 (Invitrogen), previamente digerido e linearizado com *Bam*HI.

A ligação do gene *cyt2BaNcoI* no vetor pFastPH³, que contém sítios para fusão ao gene *polh* e cauda de hexa-histidina deu origem a um novo plasmídeo, pFastPH³*cyt2BaNcoI*His (Figura 21A). Este novo plasmídeo foi utilizado para transformação em células DH5- α TM. Após purificação do DNA plasmidial das células transformadas, uma reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse (*cyt2BaNcoI forward* e *cyt2BaNcoI reverse*) foi realizada, resultando em um produto de PCR de 797 pb (Figura 21B).

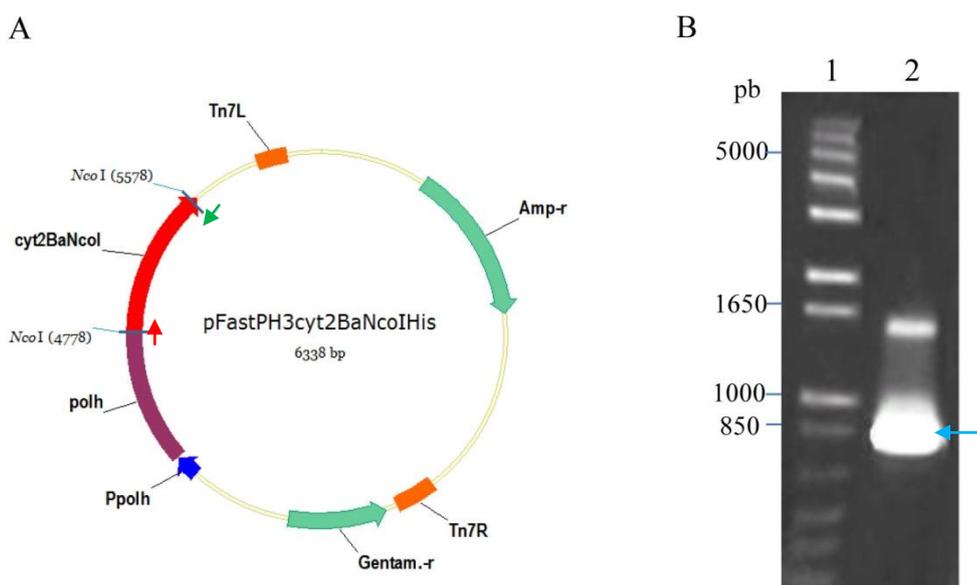


Figura 21. Construção do vetor de transferência pFastPH3cyt2BaNcoIHis e confirmação da clonagem. A, Mapa físico do plasmídeo pFastPH3cyt2BaNcoIHis. Em vermelho, o gene *cyt2BaNcoI* fusionado à porção C-terminal do gene da poliedrina em roxo. Em azul, o promotor *Ppolh*. Em laranja, as regiões responsáveis pela transposição do cassete para o genoma do baculovírus, mediada por uma transposase. Em verde, os genes de seleção por antibióticos. As setas vermelha e verde indicam a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para PCR. B, gel de agarose a 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt2BaNcoI* por PCR. 1, marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2, fragmento obtido por PCR de aproximadamente 800 pb referente ao gene *cyt2BaNcoI*. (seta azul).

A ligação do gene *cyt2BaHisBamHI* no vetor pFastBacTM 1 (Invitrogen), deu origem ao plasmídeo pFastcyt2BaHisBamHI (Figura 22A). Este foi transformado em células DH5- α TM. Após purificação do DNA plasmidial das células transformadas, reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt2BaHisBamHI* (*cyt2BaHisBamHI forward* e *cyt2BaHisBamHI reverse*) para verificar a presença e, com os oligonucleotídeos *polhF* e *cyt2BaHisBamHI reverse* para confirmar a orientação do gene de interesse foram realizadas, resultando em um produto de PCR de 813 pb e outro de 858 pb, respectivamente (Figura 22B).

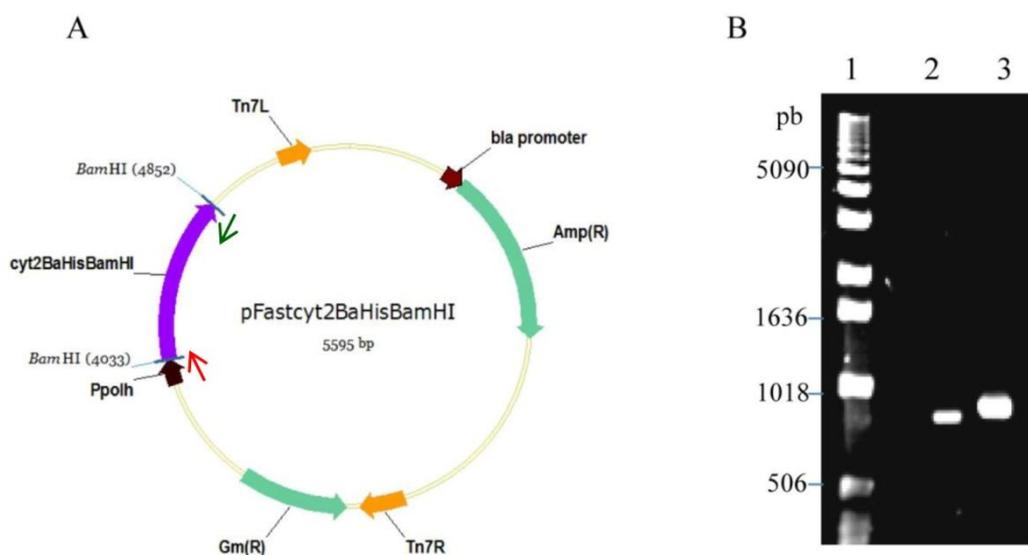


Figura 22. Clonagem do gene *cyt2BaHisBamHI* no vetor de transferência para o genoma de baculovírus. A, Mapa físico do plasmídeo pFastcyt2BaHisBamHI. Em roxo, o gene *cyt2BaHisBamHI*. Em marrom o promotor Ppolh. Em laranja, as regiões responsáveis pela transposição do cassete para o genoma do baculovírus, mediada por uma transposase. Em verde, os genes de resistência a antibióticos. B, gel de agarose a 0,8% mostrando em 1, Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). 2, PCR a partir do DNA plasmídial usando oligonucleotídeos específicos para o gene inserido; 3, PCR a partir do DNA plasmídial usando o oligonucleotídeo *polhF* (seta vermelha) e *pCyt2BaHisBamHIR* (seta verde) para confirmar a orientação do gene no vetor.

Os vetores de transferência construídos, pFastPH³cyt2BaNcoIHis e pFastcyt2BaHisBamHI, foram utilizados para construção de baculovírus recombinantes por transposição sítio-específica. As amostras de DNA dos plasmídeos construídos foram transformados em células competentes de *E. coli* DH10BacTM (Invitrogen) contendo o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um plasmídeo (bacmídeo). O DNA das colônias transformantes foi purificado e submetido à análise por PCR para confirmação da inserção de cada cassete, individualmente, no bacmídeo (Figura 23A, B e C). Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para cada gene *cyt2Ba* (ver Materiais e Métodos), além da combinação de oligonucleotídeos (M13F e M13R) que anelam em regiões presentes em cada lado do sítio mini-*att*Tn7 do bacmídeo recombinante. Dessa forma, a amplificação com os oligos M13F e M13R da sequência transposta para o bacmídeo deve apresentar 2300 pb além do tamanho do gene inserido. Alternativamente, a recombinação pode ser confirmada usando-se um dos oligos M13 juntamente com um oligo específico do gene exógeno.

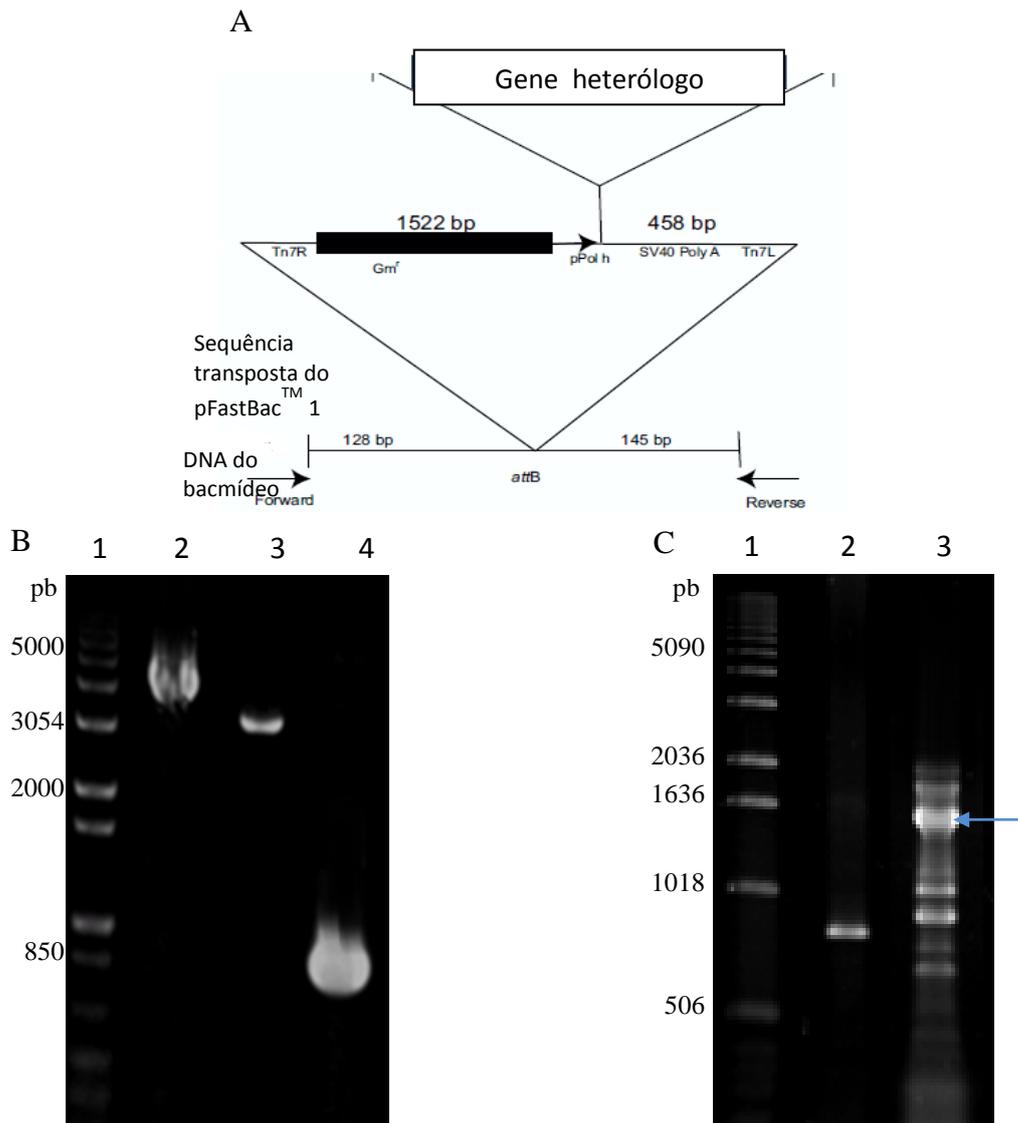


Figura 23. Confirmação das construções dos baculovírus recombinantes. A, esquema mostrando a posição dos genes clonados no lócus do gene da poliedrina no bacmídeo recombinante; B, gel de agarose a 0,8% mostrando a confirmação da transposição do cassete contendo o gene *cyt2BaHisNcoI* por PCR do bacmídeo recombinante originado em células DH10Bac. 1, Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2, resultado da PCR a partir de DNA isolado de células DH10Bac transformadas com o vetor pFastPH³cyt2BaNcoIHis utilizando oligonucleotídeos M13F e M13R, resultando em um fragmento de cerca de 3800 pb; 3, M13F e cyt2BaNcoIR, produzindo em fragmento de cerca de 3200 pb; 4, cyt2BaNcoIF e cyt2BaNcoIR, resultando em um fragmento de aproximadamente 800 pb. C, Gel de agarose a 0,8% para confirmação da transposição do cassete contendo o gene *cyt2BaHisBamHI* no bacmídeo de células DH10Bac. 1, Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). 2, resultado da PCR a partir do DNA do bacmídeo usando oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt2BaHisBamHI*, dando origem a um fragmento de cerca de 800 pb; 3, resultado da PCR a partir do DNA do bacmídeo recombinante usando o oligonucleotídeo *cyt2BaHisBamHI forward* e o oligo M13R que anela em uma região interna do bacmídeo, produzindo um fragmento de aproximadamente 1400 pb. A seta azul corresponde à banda esperada para a amplificação com os oligos mencionados.

4.4-Clonagem dos genes *cyt2BaHisBamHI*, *cry4Aa* e *cry11A* no vetor de expressão pSVP27A e obtenção de cepas de *B. thuringiensis* recombinantes.

O gene *cyt2BaHisBamHI* foi obtido por digestão com *BamHI* do plasmídeo pGemcyt2BaHisBamHI. Da mesma forma foram obtidos os genes *cry4Aa* e *cry11Aa* a partir dos plasmídeos, pGemcry4Aa e pFastcry11A, previamente construídos por Corrêa (2007) e Lima (2009), respectivamente. Os três genes foram então subclonados no plasmídeo pSVP27A (Figura 24 A, B e C) e as construções transformadas em células de *E. coli* DH5 α . Ensaio de restrição foram realizados para confirmar a orientação dos genes clonados. O plasmídeo pSVP27Acyt2BaHisBamHI foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* gerando fragmentos de 5815, 435 e 175 pb. O plasmídeo pSVP27Acry4Aa também foi digerido com a enzima *HindIII* produzindo fragmentos de 6860 e 2290 pb. O plasmídeo pSVP27Acry11A foi digerido com *EcoRI* resultando em fragmentos de 5170 e 2370 pb (Figura 25). Após verificação da orientação de cada gene clonado, os vetores foram isolados de células de *E. coli* e transformados em células de *Bt* acristalífero 4Q7 para expressão dos genes de interesse. O DNA plasmidial de cada transformante foi isolado e submetido a PCR para verificar a presença do plasmídeo nas células transformadas. Os produtos de PCR amplificados com pares de oligonucleotídeos específicos (*cyt2Ba forward* e *cyt2Ba reverse*; *cry11A forward* e *cry11A reverse*; *CRY4Aa forward* e *cry4Aa reverse*) para os genes inseridos nos vetores de expressão, resultaram em fragmentos de 813 pb (*cyt2BaHisBamHI*), 1943 pb (*cry11A*) e 3554 pb (*cry4Aa*) (Figura 26).

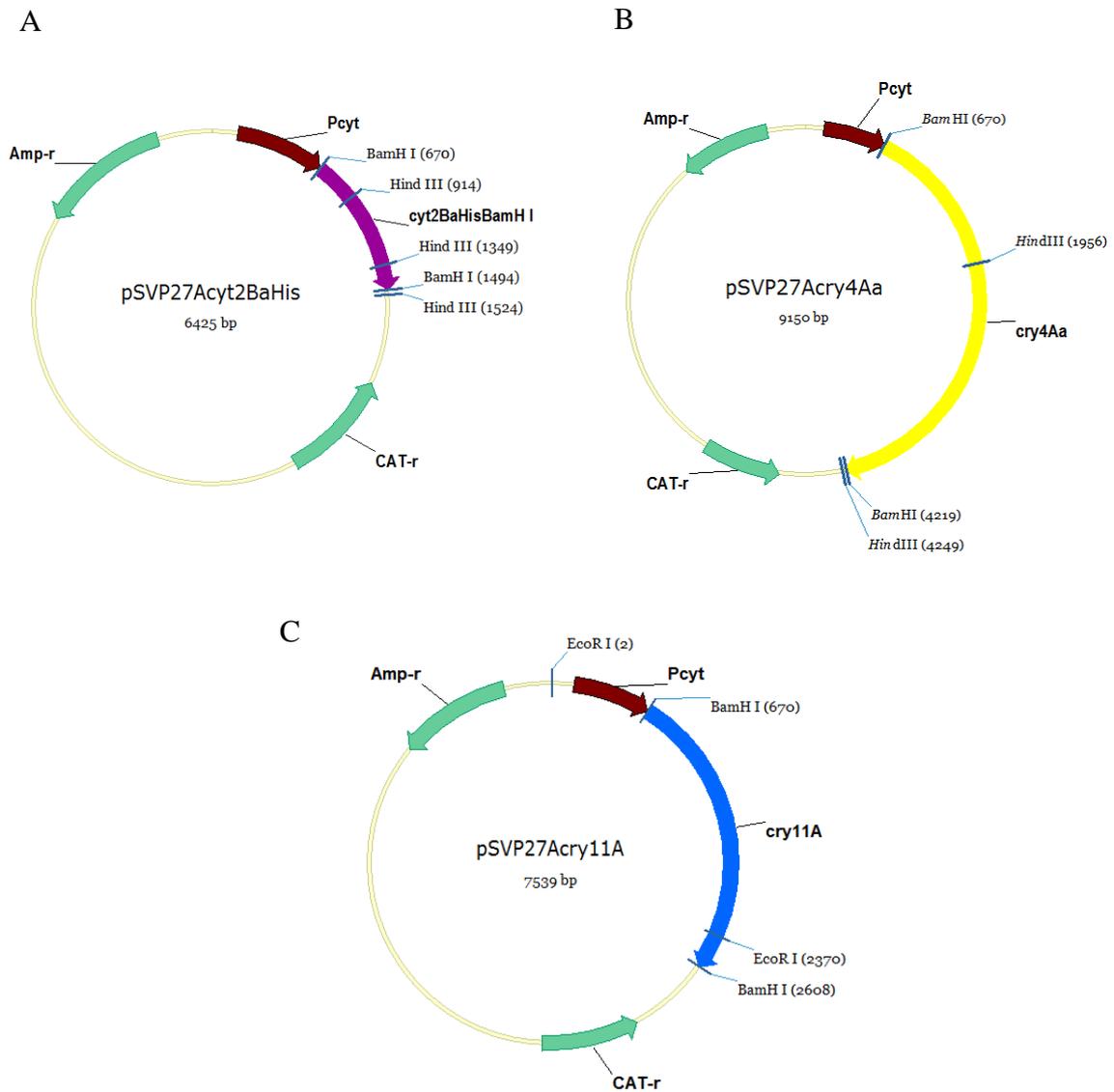


Figura 24. Construção dos vetores de expressão em células de *B. thuringiensis*. A, B e C, mapas físicos dos plasmídeos derivados do pSVP27A com as inserções dos genes *cyt2BaHisBamH I* (roxo), *cry4Aa* (amarelo) e *cry11A* (azul). Em verde, os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol. Em marrom, o promotor para expressão dos genes de interesse. Os sítios de restrição usados para clonagem e para verificação da orientação dos genes de interesse estão mostrados em cada plasmídeo

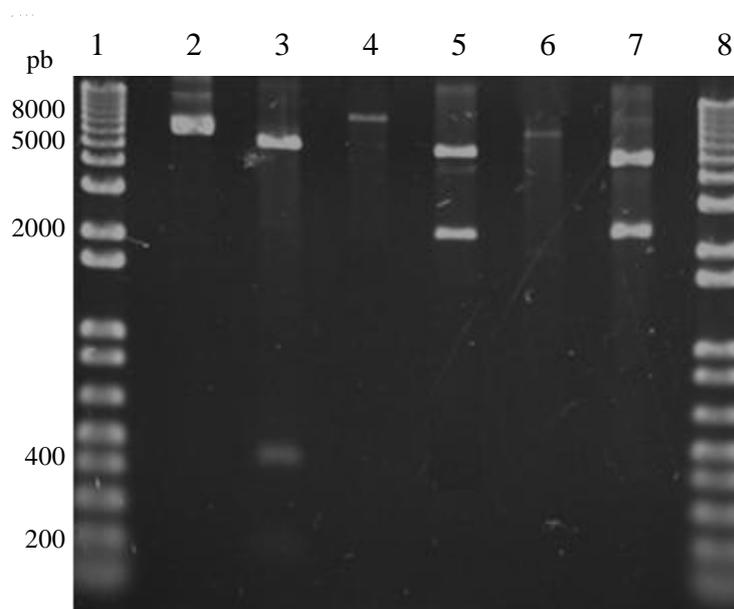


Figura 25. Confirmação da construção dos vetores de expressão em células de *B. thuringiensis*. A, gel de agarose a 0,8% mostrando DNA dos plasmídeos construídos descritos na figura 24 intactos e digeridos com enzimas de restrição para confirmação da orientação correta dos genes. 1, Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2, pSVP27Acyt2BaHisBamHI; 3, pSVP27Acyt2BaHisBamHI digerido com *HindIII*, resultando em fragmentos de 5815, 435 e 175 pb; 4, pSVP27Acry4Aa; 5, pSVP27Acry4Aa digerido com *HindIII*, resultando em fragmentos de 6860 e 2290 pb; 6, pSVP27Acry11A; 7, pSVP27Acry11A digerido com *EcoRI*, resultando em fragmentos de 5170 e 2370 pb; 8, Marcador 1kb Ladder (Invitrogen).

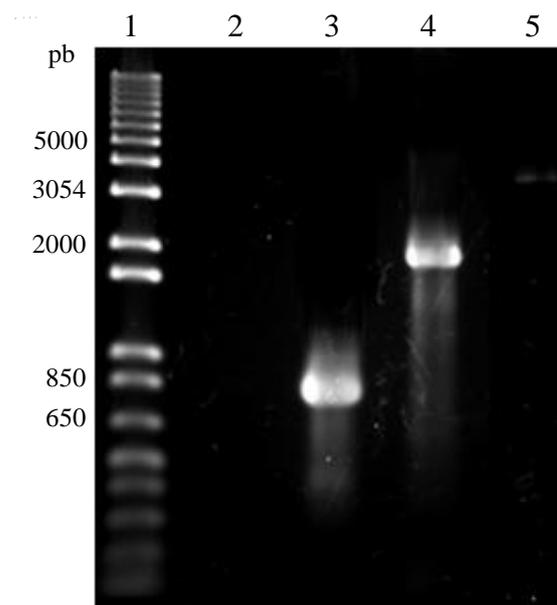


Figura 26. Confirmação da transformação de *B. thuringiensis* com os vetores contruidos. Gel de agarose a 0,8% para confirmação por PCR da transformação dos vetores pSVP27Acry2BaHisBamHI, pSVP27Acry11A, pSVP27Apolh e pSVP27Acry4Aa em células de *Bt* 4Q7. 1, Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (invitrogen); 2, resultado da PCR usando oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt2BaHisBamHI* como controle negativo sem DNA, 3, resultado da PCR a partir do DNA plasmidial pSVP27Acry2BaHisBamHI com oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt2BaHisBamHI*, 4, resultado da PCR a partir do DNA plasmidial pSVP27Acry11A com oligonucleotídeos específicos para o gene *cry11A*; 5, resultado da PCR a partir do DNA plasmidial pSVP27Acry4Aa com oligonucleotídeos específicos para o gene *cry4Aa*

4.5-Análise da expressão da proteína PolhCyt2BaHis utilizando-se o sistema de expressão em baculovírus em células de inseto.

Placas de 100 mm de diâmetro (TPP) contendo 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4 foram infectadas individualmente com o vírus recombinante vApolhcyt2BaHis. Com 96 h.p.i., as células foram coletadas e o extrato aplicado em SDS-PAGE a 12% para análise da expressão das proteínas heterólogas. O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e esta submetida à marcação com anticorpo

anti-His (C-term). O resultado da marcação mostrou uma banda de 58kDa referente à fusão da proteína Cyt2Ba à proteína poliedrina somente na amostra solubilizada de extrato de células (Figura 27). Uma purificação total, ou ao menos parcial da proteína de fusão, ainda necessita ser realizada. Embora a solubilização do extrato celular tenha facilitado a visualização de uma banda referente ao tamanho esperado para a proteína PolhCyt2BaHis, não foi possível a visualização de poliedros nas células infectadas com o vírus recombinante em microscopia de luz. A fusão de Cyt2BaHis à porção C-terminal da Poliedrina pode ter comprometido a formação de poliedros, já que Jil e colaboradores (2010) demonstraram que a região carboxi-terminal da Poliedrina está diretamente envolvida montagem correta dos poliedros. Sendo assim, a purificação da proteína de fusão, PolhCyt2Ba, por gradiente de sacarose não foi realizada com êxito.

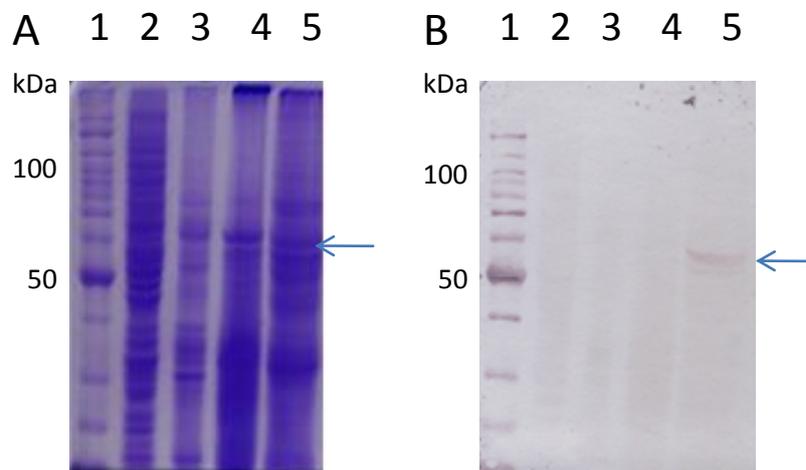


Figura 27. Análise da expressão da proteína PolhCyt2Ba em células de inseto. A, SDS-PAGE a 12%. 1, Marcador Bench Mark His-Tagged (Invitrogen); 2, controle negativo de extrato de células BTI-Tn5B1-4; 3, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com AcMNPV; 4, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vAcpolhcyt2Ba; 5, extrato solubilizado de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vAcpolhcyt2Ba. B, western blot do SDS-PAGE usando anticorpo anti-His. As setas indicam as bandas referentes à proteína PolhCyt2Ba.

4.6-Análise da expressão das proteínas Cry4Aa, Cry11Aa, Cyt2BaHis expressas em *B. thuringiensis* recombinantes.

Proteínas com massas moleculares de 66 kDa, e cerca de 130 kDa referentes às protoxinas Cry11A e Cry4Aa foram observadas em SDS-PAGE após purificação por gradiente de sacarose descontínuo e solubilização com Na₂CO₃, no caso dos cristais formados por Cry11A e, Na₂CO₃ suplementado com um agente redutor (0,2% de β-mercapto-etanol) para solubilização dos cristais da proteína Cry4Aa (Figura 28 A). Apesar da ausência das proteínas acessórias do operon *cry11A*, P20 e P19, a proteína Cry11A foi expressa com a massa molecular esperada. Foi demonstrado anteriormente que a proteína Cry11A foi devidamente expressa em *E. coli* recombinante, na presença ou ausência de P20. Entretanto, em outra bactéria Gram-negativa recombinante, *Pseudomonas putida*, a proteína Cry11A foi produzida apenas quando P20 foi expressa conjuntamente (Xu *et al.*, 2001). Beltrão & Silva-Filha (2007) expressaram previamente com sucesso a proteína Cry11Aa com atividade tóxica para larvas de *A. aegypti*, usando a linhagem de *B. thuringiensis* acristalífera 4Q2-81.

Cohen e colaboradores (2008) e Nisnevich e colaboradores (2006) já expressaram a proteína Cyt2Ba em trabalhos anteriores, usando-se *Bacillus thuringiensis* acristalíferos como hospedeiros para o gene *cyt2Ba* heterólogo. Nesses trabalhos, foram utilizados, respectivamente, gradiente descontínuo de sacarose e separação bifásica com dicloroetano para purificação de cristais contendo a proteína Cyt2Ba. Yu e colaboradores (2002) também expressaram, em *E. coli*, uma proteína Cyt2Ba recombinante, contendo uma cauda de hexa-histidina. Após indução da expressão da proteína heteróloga Cyt2Ba por IPTG, os corpos de inclusão foram sedimentados por centrifugação e, a proteína Cyt2Ba foi purificada por cromatografia de afinidade.

Devido à alta quantidade de contaminantes em nossa amostra contendo Cyt2BaHis, também obtida em gradiente de sacarose, uma segunda purificação foi realizada solubilizando-se a protoxina Cyt2BaHis com NaCO_3 e usando-se cromatografia de afinidade. Após esta etapa adicional de purificação, análise em SDS-PAGE foi conduzida, indicando uma única banda de 27 kDa como esperado (Figura 28 B).

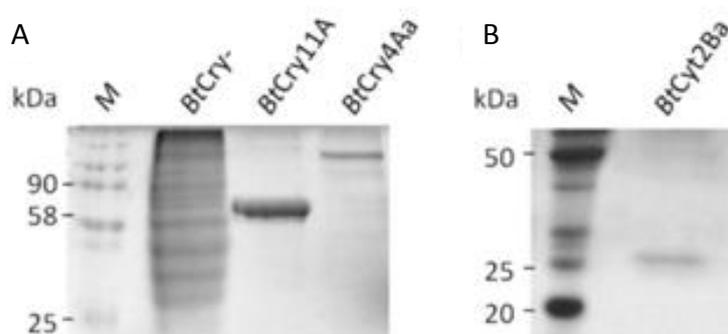


Figura 28. Análise em SDS-PAGE da expressão de Cry11A, Cry4Aa e Cyt2BaHis em cepas de *B. thuringiensis* recombinantes. A, SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação, em gradiente de sacarose, das protoxinas Cry11A e Cry4Aa de cepas transformadas de *B. thuringiensis*. Como controle, o extrato da linhagem acristalífera e esporulada de *B. thuringiensis*, 4Q7, foi usado. Massas moleculares selecionadas do marcador, ColorPlus™ Prestained Marker-NEB Pre, são mostradas à esquerda; B, SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação de Cyt2BaHis, em coluna de afinidade Ni-NTA, após gradiente de sacarose. Como controle, o extrato da linhagem acristalífera e esporulada de *B. thuringiensis*, 4Q7, foi usado em A (BtCry-). O marcador, BenchMark™ Protein Ladder-Invitrogen, está mostrado à esquerda.

4.7-Deteção da expressão da proteína Cyt2BaHis expressa em *B. thuringiensis* por Westernblot.

A amostra contendo a proteína Cyt2BaHis proveniente da purificação em gradiente de sacarose, como citado no item 4.6, foi novamente utilizada para aplicação em SDS-PAGE para que fosse então, feita uma análise por imunomarcação. O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e esta submetida à marcação com anticorpo anti-His (C-term). O resultado da marcação revelou uma banda na membrana de 27 kDa

para a amostra da purificação da proteína Cyt2BaHis (Figura 29). Como controle negativo, foi utilizada a amostra da estirpe de *Bt* acristalífero 4Q7 submetida previamente ao mesmo procedimento em gradiente de sacarose. A banda de 27 kDa marcada na membrana possui o tamanho esperado da proteína Cyt2Ba contendo a cauda de hexa-Histidina.

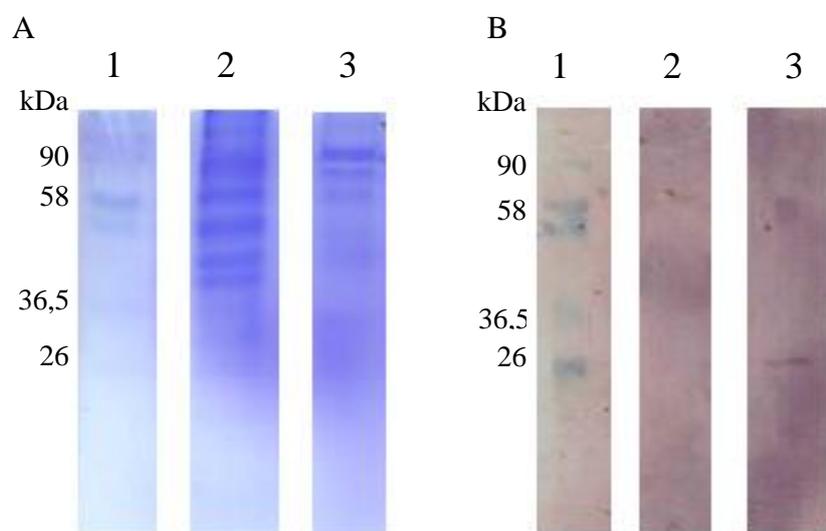


Figura 29. Imunomarcção da proteína Cyt2BaHis expressa em *B. thuringiensis*. A, SDS-PAGE a 12% mostrando o resultado do gradiente de sacarose das amostras de *Bt* 4Q7 e *Bt*cyt2BaHis. 1, marcador Pre-stained Molecular Weight Marker™ (Sigma); 2, purificação em gradiente de sacarose de proteínas da estirpe 4Q7; 3, purificação em gradiente de sacarose da proteína exógena Cyt2BaHis expressa pela cepa *Bt*cyt2BaHis. B, western blot do SDS-PAGE (A) usando anticorpo anti-His mostrando como resultado da imunomarcção uma banda de 27 kDa.

4.8-Toxicidade das proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry11A para culturas de células de Diptera e Lepidoptera

Como demonstrado anteriormente, toxinas Cry4Aa e Cry11A são específicas para mosquito *in vivo* (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Angsuthanasombat *et al.*, 2004; Yamagiwa *et al.*, 2004). Neste trabalho, as duas δ -endotoxinas foram usadas em ensaios de citotoxicidade em células de duas ordens

diferentes de inseto. As protoxinas purificadas Cry4Aa e Cry11A foram ativadas com tripsina na proporção de 10:1 (proteína/enzima) e dialisadas. As toxinas foram então incubadas, isoladamente ou em conjunto, com linhagens celulares de Diptera e Lepidoptera. Na concentração de 20µg/mL, as toxinas Cry4Aa e Cry11A apresentaram efeitos similares e, apenas pequenas diferenças quando testadas em células de Ld e Sf21. Contudo, a mistura das duas toxinas mostrou maior atividade para todas as linhagens celulares (Figura 30 A). Experimentos futuros deverão ser conduzidos para estabelecer relações sinérgicas ou aditivas entre as toxinas. Previamente, cristais purificados de Bti selvagem, contendo todas as δ -endotoxinas expressas pela bactéria, foram solubilizados e ativados da mesma forma que as proteínas isoladas. As toxinas do cristal de Bti foram adicionadas às culturas celulares na concentração de 5 µg/mL, em todos os ensaios de citotoxicidade. O valor de morte celular obtido em um luminômetro, baseado na atividade de luciferase, após incubação do sobrenadante das culturas testadas com um reagente específico foi usado como parâmetro referente a 100% de morte celular, já que em microscopia ótica, foi constatado neste trabalho, que as células de insetos, C6/36, LD-652Y, BM-5 e SF-21, foram destruídas em sua totalidade (dados não mostrados). O Bti foi escolhido como controle, neste caso, porque as toxinas utilizadas neste trabalho fazem parte do pool de toxinas produzidas por esta bactéria e, como já demonstrado anteriormente (Thomas & Ellar, 1983), cristais de Bti podem ser tóxicos para diferentes culturas de células de inseto.

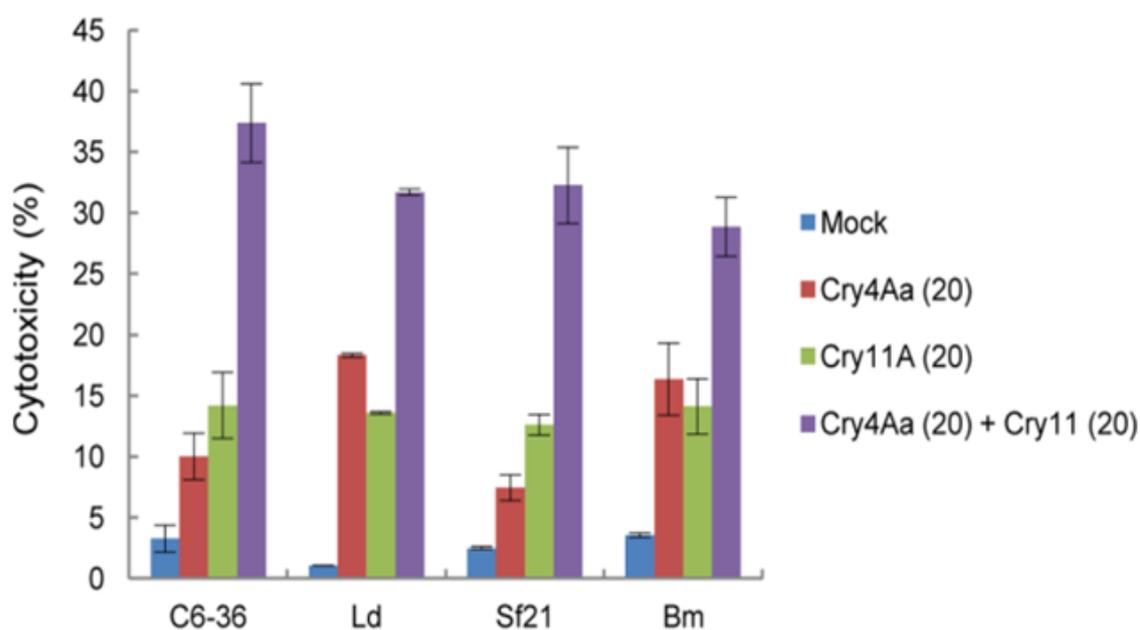


Figura 30. Análise dos ensaios de citotoxicidade de Cry4Aa e Cry11A em células de inseto. Foram utilizados 20 µg/mL de cada toxina ativada, Cry4Aa e Cry11A para incubação com diferentes linhagens de células de inseto por 30 min. A porcentagem de citotoxicidade (mortalidade celular) foi determinada por leitura luminométrica baseada na atividade de luciferase. Células não tratadas com as toxinas (Mock) foram usadas como controle negativo.

4.9-Análise da citotoxicidade de Cyt2Ba para células de inseto

Embora as toxinas Cyt sejam produzidas por algumas linhagens de *B. thuringiensis* específicas para dípteros (Promdonkoy *et al.*, 2003, Cheong & Gill, 1997), estas são também citolíticas para diferentes tipos de células (Thomas & Ellar, 1983). A toxina Cyt purificada foi ativada resultando na perda de sua cauda de hexa-histidina (figura 30 B) e em seguida dialisada como procedido para as toxinas Cry. Para incubação com células de inseto, foram testadas individualmente duas concentrações diferentes da toxina Cyt2Ba (5 ou 20 µg/mL) para se determinar qualquer possível relação entre dose e toxicidade para as culturas de células, já que a toxina pode possivelmente ligar-se de forma inespecífica à membranas celulares (Li *et al.*, 1996).

Como demonstrado nos ensaios, Cyt2Ba apresentou toxicidade para todas as células de inseto (Figura 30C). Além disso, houve aumento significativo da atividade tóxica quando Cyt2Ba foi usado na concentração de 20 µg/mL.

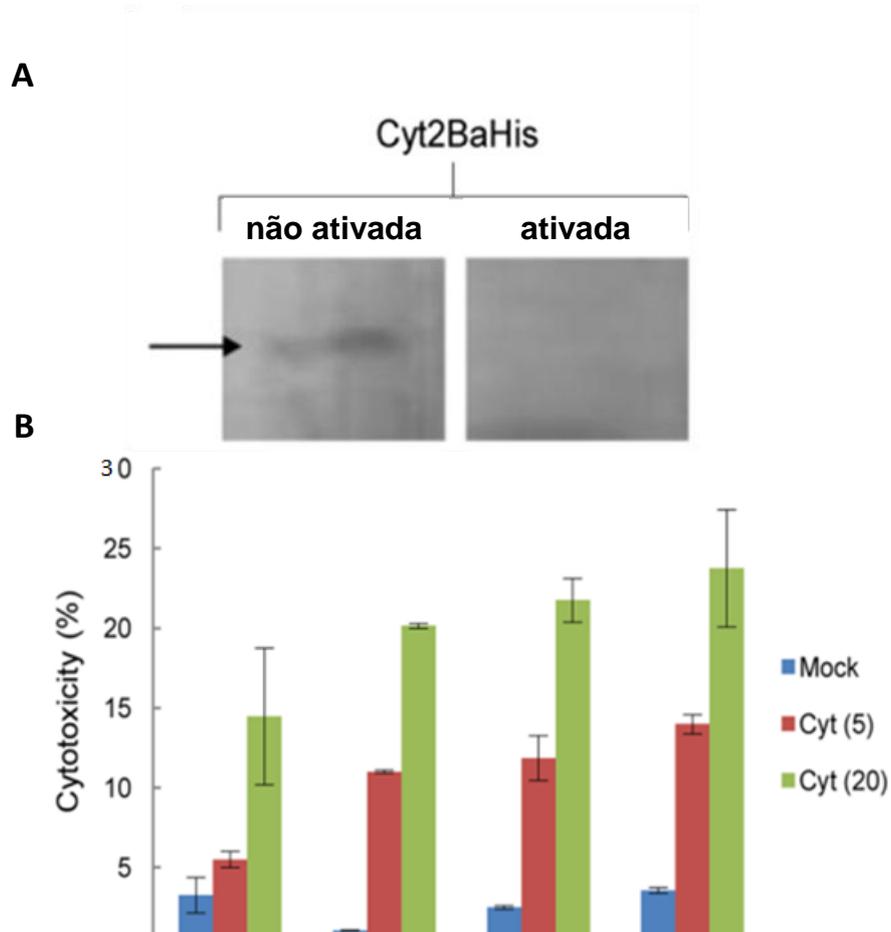


Figura 31. Ativação de Cyt2BaHis e análise dos ensaios de citotoxicidade de Cyt2Ba em células de inseto. A, ativação por tripsina de Cyt2BaHis foi realizada e, ambas as amostras de protoxina e toxina ativada foram analisadas por western blot com um anticorpo anti-His. A seta mostra uma banda de 27 kDa esperada para a proteína não ativada. A clivagem proteolítica de Cyt2BaHis resultou na perda da cauda 6xHis fusionada à porção C-terminal da proteína, tronando a toxina ativada indetectável em análise de western blot usando-se anticorpo anti-His. B, a toxina Cyt2Ba ativada foi incubada em duas concentrações diferentes (5 e 20 µg/mL) com células de inseto. A citotoxicidade foi determinada como em A.

4.10-A análise da incubação de Cry e Cyt juntas pode sugerir interação entre estas toxinas em ensaios de citotoxicidade

Para verificar a existência de uma possível habilidade de interação entre Cyt2Ba e as toxinas Cry4Aa e Cry11A, foram realizados ensaios de citotoxicidade incubando-se ao mesmo tempo as duas classes de toxinas, Cyt e Cry. As toxinas Cry foram incubadas em uma concentração de 20 µg/mL, enquanto que 5 µg/mL foram usados para toxina Cyt2Ba, já que qualquer aumento na citotoxicidade obtida poderia ser confundida com a atividade apresentada apenas por Cyt2Ba em sua maior concentração (Figura 30C). Os dados verificados neste experimento sugerem que existe um nível maior de atividade tóxica quando Cry11A e Cyt2Ba foram incubadas conjuntamente. Para todas as células testadas, a toxicidade apresentada por esta combinação foi maior quando comparada à combinação de Cry4Aa e Cyt2Ba. A combinação das três toxinas, exceto para as células C6/36, levou a um decréscimo da atividade em relação à mistura de Cry11A e Cyt2Ba (Figura 30D). Esta observação poderia ser levar à idéia de que, se Cyt2Ba estiver atuando como receptor para ambas as toxinas Cry, Cry4Aa pode estar competindo com Cry11A pela ligação à Cyt2Ba, produzindo uma interação mais fraca em comparação com a interação Cry11A/Cyt2Ba. Existem também evidências sugerindo que toxinas Cry podem interagir formando hetero-oligômeros *in vivo* (Carmona *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, este tipo de interação entre toxinas Cry poderia ser mais ou menos eficiente, dependendo da linhagem celular testada, após a possível ligação das toxinas Cry à Cyt2Ba. Isto pode ser uma possível explicação para o fato de que a citotoxicidade das três toxinas incubadas em conjunto não diminuiu em C6/36, em contraste com as outras linhagens celulares.

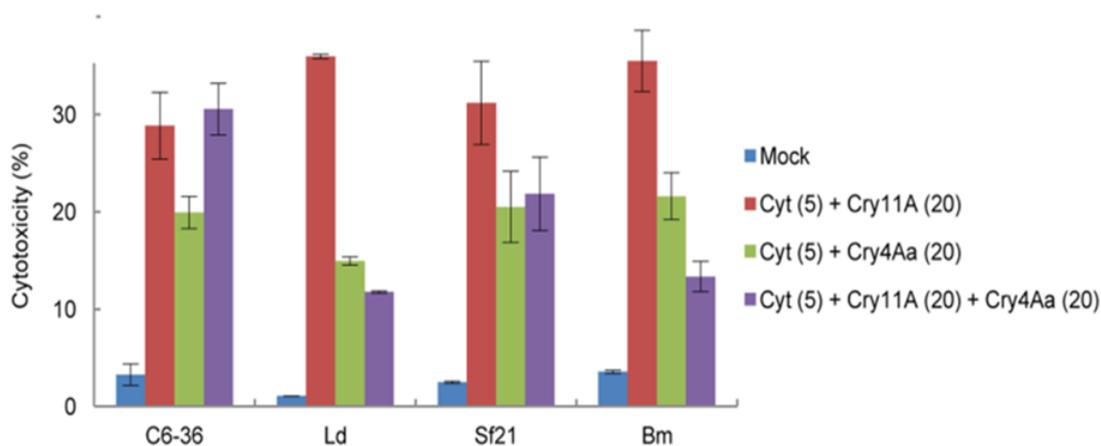


Figura 32. Análise dos ensaios de citotoxicidade das combinações de Cyt2Ba com as toxinas Cry4Aa e Cry11A em células de inseto. Combinações de Cyt2Ba (5 µg/mL) com as duas toxinas Cry (20 µg/mL para cada toxina) foram incubadas com linhagens celulares de inseto. As porcentagens de citotoxicidade foram medidas de acordo com o mesmo método usado em A e C. As concentrações das toxinas são mostradas em parênteses. Uma linhagem de células de Diptera (C6/36) e três linhagens de células de Lepidoptera (Ld, Sf21 e Bm) são mostradas nos gráficos de ensaios de citotoxicidade.

4.11-Proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry11A perdem atividade quando processadas com suco gástrico de Lepidoptera

As protoxinas Cry4Aa e Cry11A também foram processadas com proteases contidas no suco gástrico extraído de larvas de *S. frugiperda*. Como descrito anteriormente, além da estrutura baseada em três domínios e a sequência intrínseca de aminoácidos (Uawithya *et al.*, 1998; Gerber & Shai, 2000), a ativação proteolítica é um fator relevante para a toxicidade das toxinas Cry. A mesma proporção de proteína foi usada para ativação com tripsina, bem como as mesmas condições de incubação foram mantidas para o processamento com suco gástrico. O padrão de clivagem de Cry4Aa e Cry11A obtido após incubação com as proteases resultou em um perfil de bandas distinto em SDS-PAGE daquele obtido por ativação com tripsina (Figura 31). De

acordo com Christeller *et al.* (1990), os sucos gástricos de diferentes larvas de Lepidoptera contem predominantemente proteases alcalinas com diferentes padrões de atividade do tipo tripsina ou quimotripsina. Embora esses dois tipos de proteases sejam membros do grupo das serino-proteases, proteínas Cry podem sofrer diferentes processamentos proteolíticos sob tratamento com tripsina ou quimotripsina, como no caso em que a toxina Cry3Aa produziu diferentes polipeptídeos após tratamento com ambas as proteases. Entretanto, os diferentes padrões de clivagens ainda mantiveram a capacidade da proteína de ligar-se às BBMV's de *Leptinotarsa decemlineata*. Em contraste, a toxina Cry3Ba mostrou-se incapaz de ligar-se às BBMV's de *L. decemlineata* após os mesmos tratamentos proteolíticos (Raussell *et al.*, 2004). Em nosso trabalho, as toxinas processadas foram dialisadas e incubadas com culturas de células de inseto na concentração de 20 µg/mL. Para se ter certeza de que nem a tripsina, nem o suco gástrico usados eram responsáveis por qualquer atividade tóxica para as células, a atividade de luciferase baseada na quantidade de ATP liberado para o meio de cultura foi medida para ambos os tipos de proteases incubados com as culturas celulares. Nenhuma citotoxicidade foi detectada para as toxinas Cry processadas, nem tampouco para as amostras contendo apenas as proteases (Tabela 3). É possível que o novo padrão de clivagem produzido por suco gástrico de Lepidoptera não permita uma reassociação dos fragmentos das toxinas para a montagem correta de toxinas ativas (Ymagiwa *et al.*, 2004).

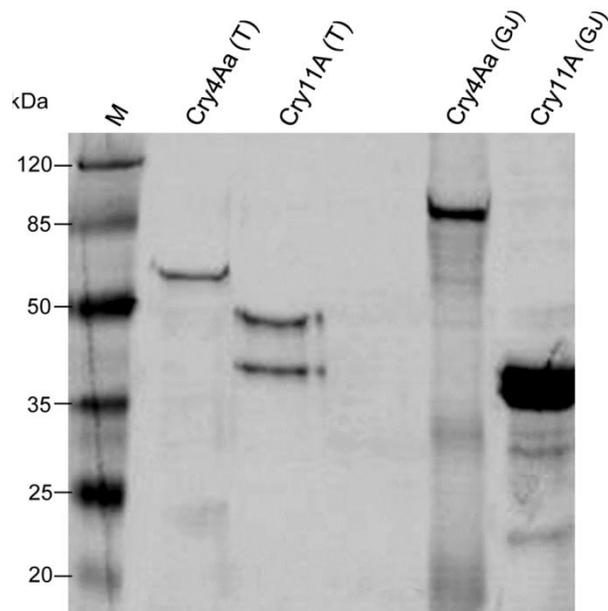


Figura 33. Análise por SDS-PAGE da ativação proteolítica de Cry4Aa e Cry11A. As protoxinas solubilizadas Cry4Aa e Cry11A foram ativadas tanto por incubação pelo método padrão usando-se tripsina (T), como por incubação com suco gástrico de *S. frugiperda* (GJ). As proteínas processadas foram coradas com coomassie blue. Massas moleculares em kDa são mostradas à esquerda (Prestained Protein Molecular Weight Marker-Fermentas).

4.12-A atividade citotóxica de Cry4Aa e Cry11A em uma linhagem celular de mamífero é dependente da presença de Cyt2Ba

A especificidade de proteínas Cry deve-se também ao fato de que, quando ingeridas por larvas suscetíveis, cada toxina liga-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das membranas das células epiteliais do intestino médio (Pootanakit *et al.*, 2003). Thomas & Ellar (1983), mostraram detecção de atividade tóxica quando o conjunto de proteínas de cristal purificadas e solubilizadas, encontradas em corpos de inclusão de Bti, foi testado em ensaios de atividade tóxica para linhagens celulares de fibroblastos de camundongo, linfócitos primários de porco e carcinoma

epitelial de camundongo (Thomas & Ellar, 1983). Para investigar se as toxinas com atividade específica para dípteros, Cry4Aa e Cry11A, poderiam apresentar-se tóxicas para células de mamíferos via ativação por tripsina e posterior ligação a receptores na superfície celular, ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se células de câncer de mama humano, MCF-7 (Figura 32A). Como as δ -endotoxinas do Bti selvagem utilizadas como referência não produziram 100% de mortalidade celular quando observado em microscopia de luz, um tampão de lise foi adicionado à cultura de células de modo que todas as células fossem destruídas e um valor de referência confiável fosse obtido por leitura luminométrica. Nenhuma atividade foi detectada quando as toxinas Cry4Aa (20 μ g/mL) e Cry11A (20 μ g/mL) foram incubadas individualmente ou em combinação com as células humanas. Células de mamíferos podem não apresentar receptores, em suas superfícies, capazes de ligarem-se à toxinas Cry, o que poderia ser umas das causas para a inexistência de toxicidade de *B. thuringiensis* para mamíferos. Além disso, a toxina Cyt2Ba também foi incubada com células MCF-7 em duas concentrações. Foi demonstrado neste experimento que Cyt2Ba mostrou-se citotóxica apenas quando incubada na concentração mais alta usada nos ensaios (20 μ g/mL). Em concordância com os ensaios anteriores, usando-se células de inseto, a toxicidade de Cyt2Ba mostrou-se ter tendência a um aumento de atividade, quando a dosagem da toxina foi maior no ensaio de citotoxicidade (Figura 32B). Esta toxicidade deve-se, provavelmente, à habilidade de Cyt2Ba de ligar-se a membranas celulares sem a necessidade de receptores específicos. O valor de atividade, em torno de 65%, apresentado para as toxinas expressas por Bti selvagem (5 μ g/mL) (Figura 32C),

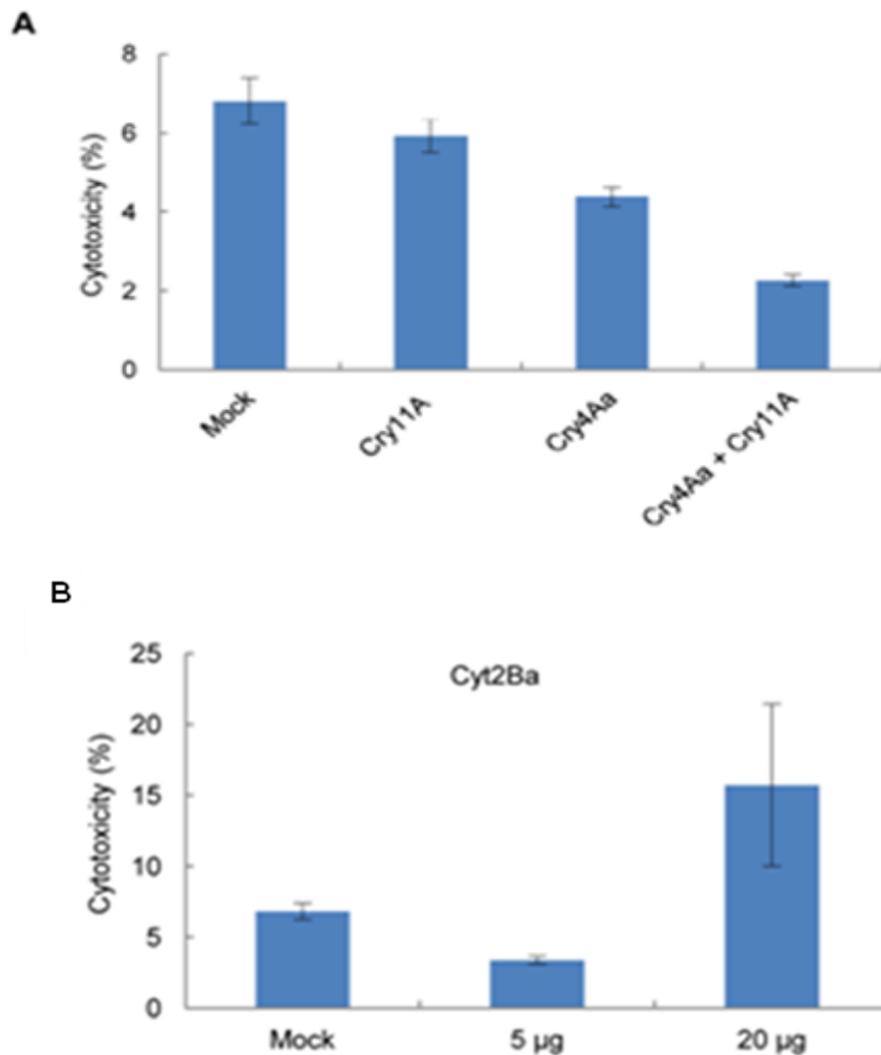
Tabela 4. Porcentagem de células mortas de mamífero e inseto em ensaios de citotoxicidade para células não tratadas/tratadas, ou células incubadas com tripsina ou suco gastric (GJ) obtido de extrato de intestino de Lepidoptera, ou com cada uma das protoxinas ativadas com GJ.

	C6/36*				IPLB-LD-652Y*				IPLB-SF-21AE*				BM-5*			
	% ^a	SD ^b	χ^2 ^c	FL ^d	% ^a	SD ^b	χ^2 ^c	FL ^d	% ^a	SD ^b	χ^2 ^c	FL ^d	% ^a	SD ^b	χ^2 ^c	FL ^d
Mock	21,13	±6,54	4,02	4,85 - 37,35	1,14	±0,44	0,34	0,01 - 2,19	1,41	±0,24	0,08	0,81 - 2,01	1,73	±0,34	0,14	0,88 - 2,57
Trypsin	10,52	±1,68	0,54	6,33 - 14,67	1,05	±0,31	0,18	0,33 - 1,87	0,99	±0,40	0,33	0,00 - 1,98	1,91	±0,29	0,09	1,19 - 2,63
GJ	16,53	±8,28	8,28	0,00 - 37,07	1,25	±0,06	0,01	1,15 - 1,45	1,23	±0,29	0,14	0,51 - 1,95	1,86	±0,40	0,26	0,87 - 2,85
Cry4Aa + GJ	18,89	±8,52	7,71	0,00 - 40,06	1,64	±0,30	0,11	0,86 - 2,34	1,90	±0,22	0,05	1,35 - 2,44	2,33	±0,12	0,01	0,00 - 6,80
Cry11A + GJ	14,71	±4,27	2,51	4,09 - 25,31	1,52	±0,14	0,02	1,15 - 1,85	1,31	±0,12	0,02	1,01 - 1,61	1,80	±0,24	0,06	1,20 - 2,40
Cyt2Ba + GJ	22,65	±2,81	0,71	15,71 - 29,68	1,65	±0,12	0,02	1,40 - 2,00	1,61	±0,19	0,04	1,14 - 2,08	2,03	±0,54	0,29	0,69 - 3,37

* –linhagens celulares de diferentes ordens/species de insetos;

^a – porcentagem de células mortas; ^b – desvio padrão; ^c – chi-quadrado; ^d – 95% limites fiduciais.

poderia ser explicado pelo efeito sinérgico presente na amostra entre as toxinas Cry e Cyt (Chang *et al.*, 1993). Para confirmar esta hipótese, outro ensaio de citotoxicidade foi realizado, usando-se as três toxinas conjuntamente em concentrações de 20 µg/mL para cada toxina. Em comparação ao ensaio com apenas Cyt2Ba, a mistura das toxinas Cry e Cyt mostrou toxicidade mais alta para células MCF-7. Além disso, um nível mais alto de mortalidade celular foi alcançado após um período mais longo de incubação. Estes dados sugerem que Cyt2Ba pode estar funcionando como receptor para Cry4Aa e Cry11A, o que poderia resultar em formação de poros nas membranas de células humanas. Esta possível interação é também dependente de tempo, já que uma tendência para um aumento de citotoxicidade foi observada para o período de incubação de 60 min.



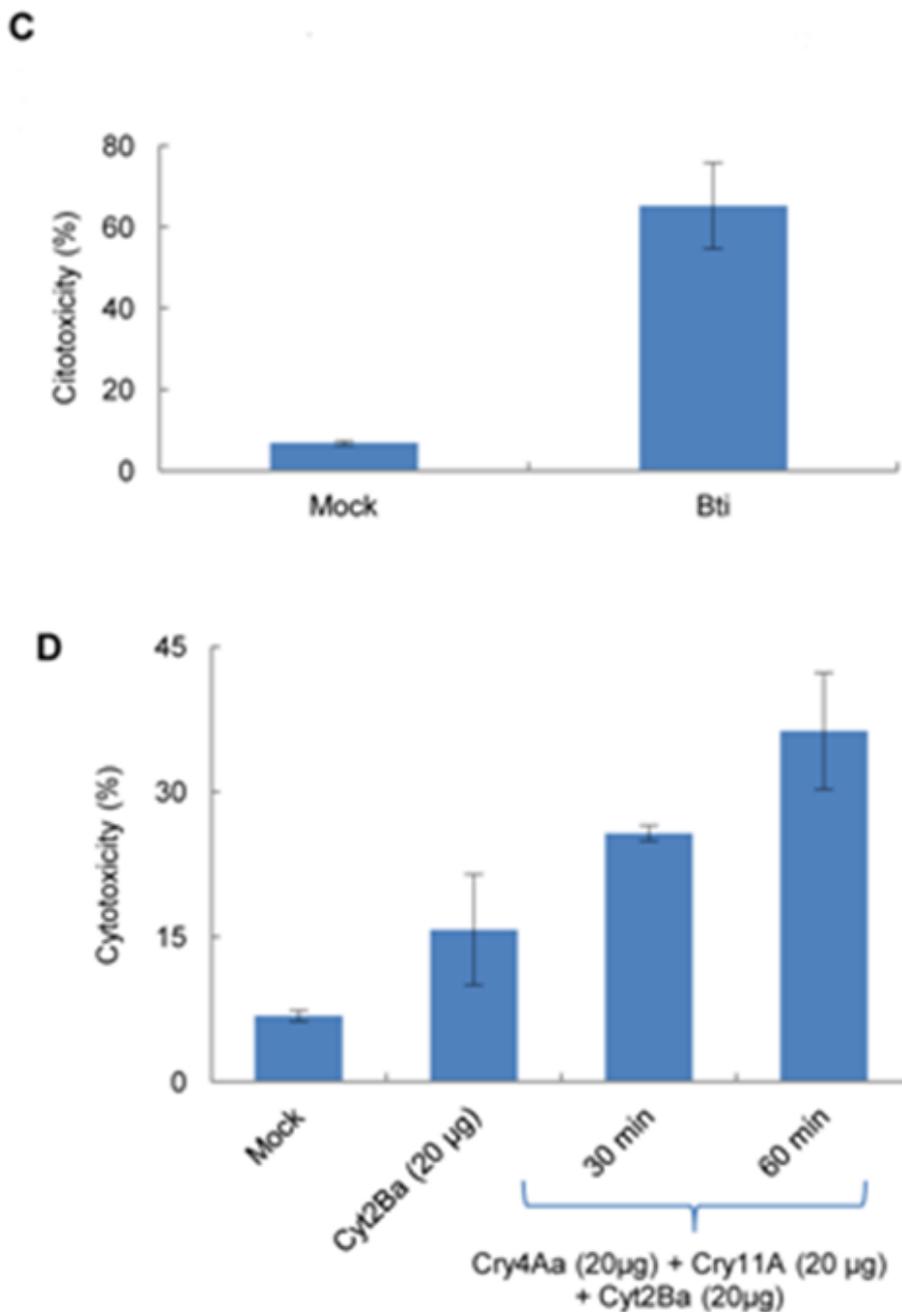


Figura 34. Análise *in vitro* da atividade tóxica de Cry e Cyt para células humanas MCF-7. A, a porcentagem de citotoxicidade (mortalidade celular) foi obtida por luminometria após 30 min de incubação, com culturas de células MCF-7, de 20 µg/mL de cada toxina ativada por tripsina, Cry4Aa e Cry11A, separadamente ou em conjunto. B, Cyt2Ba ativada por tripsina foi testada, em duas concentrações (5 and 20 µg/mL), contra culturas de células MCF-7 e, a porcentagem de citotoxicidade foi determinada como em A. C, 5µg/mL de cristais de Bti solubilizados e ativados por tripsina incubados com células MCF-7. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pelo mesmo método de A. D, Misturas de 20 µg/mL de cada uma das três toxinas, Cyt2Ba, Cry4Aa e Cry11A foram incubadas com células MCF-7 por dois períodos de tempo distintos (30 and 60 min) para medições de citotoxicidade e determinação de tempo-dependência da incubação. Células não tratadas (mock), isto é, sem incubação com qualquer uma das toxinas, são mostradas em cada gráfico.

5-CONCLUSÕES

Insetos pertencetes a diferentes ordens e espécies desenvolveram, durante a evolução, variações na composição enzimática de seus sucos gástricos para adaptarem-se à ampla variedade de dietas. Microorganismos com habilidades entomopatogênicas, como o *B. thuringiensis*, podem ter se co-desenvolvido, de tal maneira que puderam tirar vantagem das enzimas digestivas encontradas no intestino médio dos insetos. A principal atividade tóxica de *B. thuringiensis* para insetos é baseada nas δ -endotoxinas, as quais necessitam ser corretamente processadas no lúmen intestinal de insetos suscetíveis. A especificidade de toxinas Cry deve-se, em parte, ao tipo de clivagem proteolítica ao qual as toxinas são submetidas no intestino médio dos insetos, bem como à presença de receptores específicos nas membranas das células epiteliais. Neste trabalho, as toxinas específicas para dípteros, Cry4Aa e Cry11A, mostraram, como esperado, não serem tóxicas para células de Lepidoptera quando ativadas com suco gástrico de *S. frugiperda*. Entretanto, estas toxinas adquiriram toxicidade para células de Lepidoptera após ativação por tripsina. Os tipos celulares testados podem, dessa forma, expressar receptores capazes de ligarem-se às proteínas Cry ativadas por tripsina, usadas neste trabalho. Seria possível especular que, ao menos parte da atividade tóxica específica para insetos da ordem Diptera, é consequência do tipo de processamento que as toxinas podem ter sofrido no intestino do inseto. Para confirmar esta hipótese, ensaios de ligação devem ser realizados em nossos trabalhos futuros. Interessantemente, a citotoxicidade de Cry4Aa e Cry11A mostrou-se ser dependente da presença de Cyt2Ba para células de mamíferos, o que auxiliaria na explicação para a toxicidade observada do Bti selvagem nos ensaios com estas células. Contudo, não se espera que as toxinas de Bti sejam nocivas a humanos, mesmo se ingeridas, pois as toxinas formadoras de cristal necessitam de um pH em torno de 10, enquanto o estômago

humano possui pH 1-3. Além do mais, não é plausível que o padrão proteolítico possa ativar proteínas de Bti e, caso isto aconteça, as proteínas ainda precisariam adquirir uma estrutura funcional em tal solução com tão baixo pH.

6-PERSPECTIVAS

- Purificar a proteína PolhCyt2Ba a partir de culturas de células de inseto, ou de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o baculovírus recombinante construído com o gene *polhcyt2BaHisNcoI*;
- Avaliar a atividade da proteína PolhCyt2Ba em cultura de células de inseto;
- Construir estirpe de *B. thuringiensis* para expressar individualmente a proteína Cry4Ba;
- Determinar as CL₅₀ das proteínas Cyt2BaHis, Cry4Aa e Cry11A isoladamente, ou em combinações em ensaios de citotoxicidade em culturas de células de inseto e de mamífero;
- Avaliar matematicamente, a partir das CL₅₀ a serem obtidas, possíveis atividades sinérgicas, entre as proteínas Cyt2BaHis, Cry4Aa e Cry11A, expressas pelas estirpes de *B. thuringiensis* construídas, em cultura de células de inseto e de mamífero;
- Identificar possíveis receptores para as toxinas Cry4Aa, Cry11A e Cry4Ba em larvas de dípteros e lepidópteros.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.A.; ALZATE, O.; MOHAMMAD, M.; McNALL, R.J.; ADANG, M.J., DEAN, D.H. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.5343-5353, 2003.

AGAISSE, H., LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on sporulation specific sigma factor and is increased in a *spoOA* mutant. **J. Bacteriol.**, v.176, p.4734-4741, 1994.

AGUIAR, R.W.S., MARTINS, E.S., VALICENTE, F.H., CARNEIRO, F.P., BATISTA, A.C., MELATTI, V.M., MONNERAT, R.G., RIBEIRO, B.M.A recombinant truncated CryIAc is toxic to lepidopteran and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Curr. Microbiol.**, v.53, p.287-293, 2006

ANDRADE, C.F.S. 2008. Controle biológico de borrachudos – dosagens de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Artigos Técnicos - Unicamp, Instituto de Biologia, Dep. de Zoologia**, Campinas, 2008.

ANGSUTHANASOMBAT, C., CRICKMORE, N., ELLAR, D.J. Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB delta-endotoxin. **FEMS Microbiol. Lett.** v.111, p.255–261, 1993.

ANGSUTHANASOMBAT, C., UAWITHYA, P., LEETACHEWA, S., PORNWIROON, W., OUNJAI, P., KERDCHAROEN, G., PANYIM, S. *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba mosquito-larvicidal proteins: Homology-based 3D model and implications for toxin activity. **J. Biochem. Mol. Biol.** v.37, p.304-313, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação dos agrotóxicos: 10 anos de proteção a população**. Brasília, DF. Publicado em: 2 de abril 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias>

ARANTES, O.M.N.; VILAS-BOAS, L.A.; VILAS-BOAS, G.T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. SERAFINI, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. (eds) Caxias do Sul: EDUCS, p. 269-294, 2002.

ARIF, B.M. The structure of the viral genomic. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.131, p. 21-29, 1986.

ARMSTRONG, J.L.; ROHRMANN, G.F.; BEAUDREAU, G.S. Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Bacteriol.** v.161, p.39–46, 1985.

ARONSON, A.I. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. **Mol. Microbiol.** v.7, p.489–496, 1993.

- ARONSON, A.I; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol. Lett.** v.195, p.1–8, 2001.
- AYRES, M.D.; HOWARD, S.C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M; POSSEE, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virol.** v.202, p.586–605, 1994.
- BAUM, J.A.; MALVAR, T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.**, v.18, p.1-12, 1995.
- BARRETT, A.D.T; HIGGS, S. Yellow Fever: a disease that has yet to be conquered. **Ann. Rev. of Entomol.** v.52, p.209-229, 2007.
- BELTRÃO H.B.M. SILVA-FILHA, M.H.N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. israelensis Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiol. Lett.** v.266, p.163-169, 2007.
- BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEM-DOV, E.; JONES, A.F.; MURPHY, L.; QUAIL, M.A.; HOLDEN, M.T.G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. and Environ. Microbiol.** v.68, p.5082-5095, 2002.
- BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regul., Toxicol. and Pharmacol.** v.32, p.156-173, 2000.
- BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: Kurstak E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p.1-72, 1991.
- BLISSARD, G.W; ROHRMANN, G.F. Localization, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Virol.** v.170, p.537-555, 1989.
- BOMMIREDDY, P.L.; LEONARD, B.R.; EMFINGER, K. Arthropod Management and Applied Ecology. **J. of Cotton Sci.** v.11, p.199-207, 2007.
- BONNING, B.C.; HAMMOCK, B.D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. **Annu. Rev. Entomol.** v.41, p191–210, 1996.
- BOOSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D.J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **J. Mol. Biol.**, v.348, p.363-382, 2005.
- BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.H.; LESCAR, J.; Structural of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8 Å resolution. **J. Bacteriol.**, v.188, p. 3391-3401, 2006.
- BRAVO, A., ARRIETA, G., BENINTENDE, G., REAL, M.D, ESPINOZA, A.M, MONNERAT, R, ORDUZ, S, SOBERÓN, M. Metodologías utilizadas en investigación sobre bacterias entomopatógenas, Unam, México, 2001.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon Rev.** v.49(4), p.423-35, 2007.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnol.** v.26, p.573-579, 2008.

BRODERINCK, N.A., RAFFA, K.F., HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.103, p.15196–15199, 2006.

BROWN, K.L., WHITELEY, H.R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.85, p.4166-4170, 1988.

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

BURGES, H.D., AIZAWAI, A., DULMAGE, H.T., de BARJAC, H. Numbering of the H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invert. Pathol.,** v.40, p.419, 1982.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, p.2415-2422, 2003.

CANTÓN, P.E.; REYES, E.Z.; ESCUDERO, I.R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1A has an important role in synergism. **Peptides.** v.32, p.595-600, 2010.

CARMONA, D., RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C., MUÑOZ-GARAY, C., PORTUGAL, L., PÉREZ C., de MAAGD, R.A., BAKKER, P., SOBERÓN, M., BRAVO, A. Dominant Negative Phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba Mutants Suggest Hetero-Oligomer Formation among Different Cry Toxins. **PLoS ONE** v.6(5): e19952, 2011.

CASTRO, M.E.B., SOUZA, M.L., SIHLER, W., RODRIGUES, J.C.M., RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.** v.34, p.1733-1761, 1999.

CASTRO, M.E.B., SOUZA, M.L. Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C & MONNERAT, R. G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** v.1, p.175-194, 2006.

CHANG, C., YU, Y.M., DAI, S.M., LAW, S.K., GILL, S.S. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.815–821, 1993.

CHANG, J.H., CHOI, J.Y., JIN, B.R., ROH, J.Y., OLSZEWSKI, A., SEO, S.J., O'REILLY, D.R., JE, Y.H. An improved baculovirus insecticidal producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **J. Invert. Pathol.**, v.84, p.30-37, 2003.

CHEONG, H, GILL, S.S. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquitocidal δ -endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.3254-3260, 1997.

CHUNGIATUPORNCHAI, W., HOFTE, H., SEURINK, J., ANGSUTHANASOMBAT, C., VAECK, M. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for diptera and lepidoptera. **Eur. J. Biochem.** v.173, p.9-16, 1988.

COHEN, S., DYM, O., ALBECK, S., BEN-DOV, E., CAHAN, R., FIRER, M. ZARITSKY, A. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Mol. Biol.** v.380, p.820-827, 2008.

COOK, R.J., Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Ann. Ver. Phytopathol.** v.31, p.53-80, 1993.

CORRÊA, R.F.T. **Estudo da atividade tóxica para *aedes aegypti* das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em baculovírus recombinantes.** UnB, Brasília, 2007. 95p. Dissertação Mestrado.

COSTA, M.H.O. **Construção do vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusoras á células de inseto.** UnB, Brasília, 2008. 148p. Dissertação de Mestrado.

CRICKMORE, N., ELLAR, D.J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. **FEMS Microbiol. Lett.** v.94, p.63-68, 1992.

CRICKMORE, N., BONE, E.J., WILLIAMS, J.A. ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** v.131, p.249-254, 1995.

CRICKMORE, N. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **J. Appl. Microbiol.**, v.101, p.616-619, 2005.

CHRISTELLER, J.T., LAING, W.A., SHAW, B.P., BURGUESS, E.P.J. Characterization and partial purification of the digestive protease of the black field cricket *Teleogryflus commodus* (Walker): elastase is a major component. **Insect Biochem.** v.20, p.157-164, 1990.

CROOK, N.E. Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Vir. of invert.** New York: Marcel Dekker. p.73-110, 1991.

DAI, S.M., GILL, S.S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp, *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v.23, p.273–283, 1993.

De BARJAC, H, BONNEFOI, A. Mise au point sur sa classification dès *Bacillus thuringiensis*. **Entomophage**, v.18, p.5-17, 1973.

de BARJAC, H. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype H14. C.R. **Seances Acad. Sci.** v.286, p.797-800, 1978

de BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**. v.35(2), p.233-240, 1990.

de MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet.**, v.17, p.193-199, 2001.

de MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N., SCHNEPF, H.E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Ann. Rev. Genet.** v.37, 409-433, 2003.

de SOUZA, M.T., LECADET, M.M., LERECLUS, D. Full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **J. Bacteriol.**, v.175, p.2952-2960, 1993.

DONOVAN, W.P., RUPAR, M.J.C., SLANEY, A.C., CAWRON-BURKE, M.C., JOHNSON, T.B. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to coleopteran species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.3921-3927, 1992.

DRIKS, A. Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.59, p.389-391, 2002.

ENGLEHARD, E.K., KAM-MORGAN, L.N., WASHBURN, J.O., VOLKMAN, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.91, p.3224-3227, 1994.

EDWARDS, D.L., PAYNE, J., SOARES, G.G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **Eur. Pat. Appl.** EP O 303 426 A2, 1998.

ESTRUCH, J.J., WARREN, G.W., MULLINS, M.A., NYE, G.J., GRAIG, J.A., KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.5389-5394, 1996.

ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N.B., DESAI, N, DUCK, N.B., WARREN, G.W., KOZIEL, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nat. Biotechnol.** v.15, p.137-141, 1997.

FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J., SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. Gelechiaie. **Collec. Czechoslovak Chem. Communic.**, v.34, p.1118-1120, 1969.

FAULKNER, P., KUZIO, J., WILLIAMS, G.V., WILSON, J.A. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. **J. Gen. Virol.** v.78, p. 3091-3100, 1997.

FAUST, R.M., BULLA, A.L.JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: KURSTAKI, E., ed. **Microb. and vir. pestic.** New york: Marcel Dekker. p.75-206, 1982.

FEITELSON, J.S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: **Proc. of XXVII Ann. Meeting of the Soc. for Invert. Pathol.**, France, Montpellier, p.184, 1994.

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

FRIESEN, P.D. Regulation of baculovirus early gene expression. In L. K. Miller (ed.), **The baculoviruses**. Plenum, New York, N.Y. p.141–166, 1997.

GALITSKY, N., CODY, V., WOJTEZAK, A., GHOSH, D., LUFT, J.R., PANGBORN, W., ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v.57, p.1101-1109, 2001.

GEORGHIOU, G.P., WIRTH, M.C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p.1095-1101, 1997.

GERBER, D., SHAY, Y. Insertion and organization within membranes of the delta-endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. **J. Biol. Chem.** v.275, p.23602-23607, 2000.

GILL, S.S., SINGH, G.J.P., HORNUNG, J.M. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. **Infect. Immun.** v.55, p.1300–1308, 1987.

GILL, S.S., COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins, **Ann. Rev. Entomol.** v.37, p.615–636, 1992.

GILL, S.S., COWLES, E.A., FRANCIS, V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **J. Biol. Chem.** v.270, p.27277-27282, 1995.

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

GLATRON, M.F., RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. **C.R. Acad. Sc. Paris**, v.269, p.1338-1341, 1972.

GÓMEZ, I., PARDO-LOPEZ, L., MUNOZ-GARAY, C., FERNANDEZ, L.E., PEREZ, C., SANCHES, J., SOBERÓN, M., BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**. v.28, p.169-173, 2007.

GRACE, T.D. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. **Nature** London, v.216, p.613, 1967.

GRANADOS, R.R., GUOXUN, L., DERKSEN, C.G., MICKENNA, K.A.A. An insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **J. Invert. Pathol.**, v.64, p.260-266, 1994.

GRIFFITS, J.S., HASLAM, S. M., YANG, T., GARCZYNSKI, S.F., MULLOY, B., MORRIS, H. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Sci**. v.307, p.922–925, 2005.

GROCHULSKI, P., MASSON, L., BOTISOVA, S., PUSTAI-CAREY, M., SCHWARTZ, J. L., BROUSSEAU, R., CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa1 insecticidal toxin crystal structure and channel formation. **J. Mol. Biol.**, v.254, p.447-464, 1995.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R., FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. v.1, p.177-202, 1986.

GUERCHICOFF, A., DELECLUSE, A., RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, 1090–1096, 2001

GUO, H., CHOUDHURY, Y., YANG, J., CHEN, C., TAY, F.C. LIM, T.M. WANG, S. Antiglioma effects of combined use of a baculoviral vector expressing wild-type p53 and sodium butyrate. **J. Gene Med.** v.13, p.26-36, 2011.

GUTIERREZ, P., ALZATE, O., ORDUZ, S. A theoretical model of the tridimensional structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* Cry11Ba toxin deduced by homology modeling. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96, p.357-364, 2001.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle Microbiano de Insetos**. Editado por S.B. Alves. 2. Ed. FEALQ, Piracicaba, PP. 383-446, 1998.

HAN, S., CRAIG, J.A., PUTNAM, C.D., CAROZZI, N.B., TAINER J.A. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. **Nat. Struct. Biol.**, v.6, p.932–936, 1999.

HANSEN, B.M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: **Entomopath. Bact.: from laboratory to field application** (Charles, J. *et al.*, eds), Kluwer Academic Publishers, p.41-44, 2000.

HARRISON, L.R., JARVIS, D.L. Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins. **Adv. Virus. Res.** v.68, p.159-191, 2006.

HELD, G.A., KAWANISHI, C.Y., HUANG, Y.S. haracterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. **J. Bacteriol.** v.172, p.481-483, 1990.

HERNÁNDEZ-SOTO, A., DEL RINCÓN-CASTRO, M.C., ESPINOZE, A.M., IBARRA, J.E. Parasporal body formation via overexpression of the Cry1Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. **Appl. Env. Microbiol.** v.75, p.4661-4667, 2009.

HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. **Proc. of the National Acad. of Sci. of the USA.** v.96, p.5978-5981, 1999.

HELD, G.A., KAWANISHI, C.Y., HUANG, Y.S. Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. **J. Bacteriol.** v.172, p.481–483, 2000.

HÖFTE, H., WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v.53, n.2, p.242-255, 1989.

HOWLADER, M.T.H., KAGAWA, Y., SAKAI, H., HAYAKAWA, T. Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa. **J. Biosci. and Bioeng.** v.3, p.179-183, 2009.

HUH, N. E., WEAVER, R.F. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Gen. Virol.** v.71, p.95–201, 1990.

IGARASHI, A. Isolation of singhs *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chinkugunya viruses. **J. Gen. Vir.** v.40, p.531-544, 1978.

JEHLE, J.A., BLISSARD, G.W., BONNING, B.C., CORY, J.S., HERNIOU, E.A., ROHRMANN, G.F., THEILMANN, D.A., THIEM, S.M., VLAK, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Arch. Virol.** v.151, p.1257–1266, 2006.

JENKINS, J.L., LEE, M.K., SANGADALA, S., ADANG, M.J., DEAN, D.H. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. **FEBS Lett.** v.462, p.373–376, 1999.

JIL, X., SUTTON, G., EVANS, G., AXFORD, D., OWEN, R., STUART, D. How baculovirus polyhedral fit square pegs into round holes to robustly package viruses. **The EMBO J.** v.29, p.505-514, 2010.

JIANG, S.S., CHANG, I.S., HUANG, L.W., CHEN, P.C., WEN, C.C., LIU, S.C. CHIEN, L.C., LIN, C.Y., HSIUNG, C.A., JUANG, J.L. Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus. **J. Virol.** p.8989-8999, 2006.

JIMÉNEZ-JUAREZ, N., MUÑOZ-GARAY, C., GÓMEZ, I., GILL, S.S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. **Peptides.** v.29, p.318-323, 2008.

JOHNSON, D.E., McGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.**, v.33, p.54-59, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v.227, p.680-685, 1974.

LAMBERT, B., HOFTE, H., ANNYS, K., JANSSENS, S., SOETAERT, P., PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.2536-2542, 1992.

LEVINSON, B.L., KASYAN, K.J., CHIU, S.S., CURRIER, S., GONZALEZ JR., J.M. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **J. Bacteriol.**, v.172; p.3172-3179, 1990.

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

KATAYAMA, H., YOKOTA, H., AKAO, T., NAKAMURA, O., OHBA, M., MEKADA, E., MIZUKI, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biochem.** v.137, p.17-25, 2005.

KNIGHT, P., CRICKMORE, N., ELLAR, D.J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase. **N. Mol Microbiol.** v.11, p.429-36, 1994.

KNOWLES, B.H., ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. **Biochim. Biophys.** v.924, p.509-518, 1987.

KNOWLES, B.H., FARNDALE, R.W. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. **J. Biochem.** v.253, p 235-241, 1988.

- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. in insect Physiol.**, v.24, p.275-308, 1994.
- KOST, T.A., CONDREAY, J.P., JARVIS, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat.Biotechnol.** v.23(5), p.567-75, 2005.
- KRYWUNCZYK, J., FAST P.G. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **J. Invert. Pathol.**, v.36, p.139-140. 1980.
- LECADET, M.M., FRANCHON, E., COSMAO, D.V., RIPOUTEAU, H., HAMON, S., LAURENT, P., THIÉRY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 660-672, 1999.
- LEE, M.K., WALTERS, F.S., HART, H., PALEKAR, N., CHEN J.S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab -endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.4648–4657, 2003
- LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADET. M.M., KLIER, A., RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: **Regul. prokaryotic develop.**, eds. Issar Smith, R., Slepecky, A., Setlow, P., Washington: American Society for Microbiology, p.71-88, 1989.
- LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A., LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ***Bacillus thuringiensis*, An Environmental biopesticide: Theory and practice.** Enwistle P. F., Cory J. S., Bailey M. J. and Higgs S. Eds., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, p.37-69, 1993.
- LI, J., KONI, P.A., ELLAR, D.J. Structure of the mosquitocidal d-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J. Mol. Biol.** v.257, p.129–152, 1996.
- LIMA, G.M.S. **Toxinas recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis* expressas em células de inseto são tóxicas para larvas de Lepidoptera e Diptera.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, 2009.
- LIMA, G.M.S., AGUIAR, R.W.S., CORRÊA, R.F.T., MARTINS, E.S., GOMES, A.C. M., NAGATA, T., DE-SOUZA, M.T., MONNERAT, R.G., RIBEIRO, B.M. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **W. J. of Microbiol. and Biotechnol.** v.24, p.2941-2948, 2008.
- LU, A., MILLER, L.K. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In L. K. Miller (ed.), **The baculoviruses.** Plenum, New York, N.Y. p. 193–211, 1997.
- LUCKOW V.L., SUMMERS, M.D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Bio/Technol.**, v.6, p.47-55, 1988.

LUCKOW V.L., LEE, S.C., BARRY, G.F., OLINS, P.O. Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of for foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. virol.**, v.67, p.4566-4579, 1993.

LUTHY P., WOLFERSBERGER, M.G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application** (Charles, J. *et alli*, eds), Kluwer Academic publishers, 167-180, 2000.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolutions of taxonomic conception. **J. invert. pathol.**, v.41, p.295-298, 1983.

MAIORELA, B., INLOW, D., SHAUGER, A., HARANO, D. Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. **Bio/Technol.**, v.6, p.1406-1410, 1988.

MALVAR, T., GAWRON-BURKE, C., BAUM, J.A. Overexpression of *Bacillus thuringiensis* HknA, a histidine protein kinase homolog, bypasses early Spo- that result in CryIIIa overproduction. **J. Bacteriol.**, v.176, p.4742-4749, 1994.

MANCEVA, S.D., PUSZTAI-CAREY, M., RUSSO, P.S., BUTKO, P.A. detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Biochem.**, v.44, p.589-597, 2005.

MARGARET, C.W., HYUN-WOO, P., WILLIAM, E.W., BRIAN A.F. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* Delays Evolution of Resistance to Cry11A in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Appl. and Environ. Microbiol.** p.185-189, 2005.

MARTIGNONI, M.E. Baculovirus: an attractive biological alternative. In: GARNER, W. Y., HARVEY JUNIOR, J. (Eds.). Chemical and biological controls in forestry. Washington, D.C.: **American Chem. Soci.**, p.55-67, 1984.

MARTINS, E.S. **Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga.** Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2005.

MARTINS, E.S., AGUIAR, R.W. DE S., MARTINS, N.F., MELATTI, V.M. FALCÃO, R., GOMES, A.C.M., RIBEIRO, B.M., MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **J. Appl. Microbiol.** v.104, p.1363-1371, 2008.

McCLINTOCK, T, DOUGHERTY, E.E, WEINER, R.M. Semipermissive replication of a polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. **J. Virol.** v.57, p.197-204, 1986.

MERRYWEATHER, A. T.; WEWER, U.; HARRIS, M. P. G.; WIRST, M.; BOOTH, T.; POSSEE, D. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.1535-1544, 1990.

MIRALLES M. P.; PERES V. J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. (Eds). ***Bacillus thuringiensis en el control biológico***. Bogotá, Colombia, p.207-232, 2004.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico**: v.3, p.163-2000.

MONNERAT, R.G., SILVA S.F., SILVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p. 2001.

MORAN, C.P. RNA polymerase and transcription factors. In: Sonenstein, A.L., Hoch, J.A.; Losick, R. (Eds). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. **Amer. Soc. Microbiol.**, p.653-667, 1993.

MORSE, R.J., YAMAMOTO, T., STROUD, R.M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, v.9, p.409-417, 2001.

MOSCARDI, F., SOSA-GÓMEZ, D.R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1., Ames, Iowa, 1992. International crop science I. Madison: **Crop Sci. Society of America**, p.115-119, 1993.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Ann. Rev. Entomol.**, v.44, p.257-298, 1999.

MURPHY, F.A. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. **Arch. Virol.**, v.140, p.391-392, 1995.

OHBA, M., MIZUKI, E., UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticanc. Res.** v.29, p.427-434, 2009.

O'REILLY D.R. Recombinant Gene Expression Protocols. **Meth. Mol. Biol.**, v.62, p.235-246, March 1997.

OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors**. UNDP: World Bank: Who. Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3. 41p., 1987.

PANG, Y., FRUTOS, R., FEDERICI, B.A. Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal protein expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector. **J. Gen. Virol.**, v.73, p.89-101, 1992.

PARK H.W., BIDESHI D.K., FEDERICI B.A. Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, p.4449-4455, 2000.

- PARKER, M.W., FEIL, S.C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progr. Biophys. Mol. Biol.** v.88, p.91-142, 2005
- PEARSON, M.N., GROTEN, C., ROHRMANN, G.F. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for phylogenetic division of the *Baculoviridae*. **J. Virol.** v.74, p.6126-6131, 2000.
- PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnol.**, v.15, p.173-177, 1997.
- PENG, D., LUO, Y., GUO, S., ZENG, H., JU, S., YU, Z., SUN, M. Elaboration of a electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.** v.106, p.1849-1858, 2009.
- PÉREZ, C., FERNANDEZ, L.E., SUN, J., FOLCH, J.L., GILL, S.S., SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.102, p.18303–18308, 2005.
- PÉREZ, C., MUÑOZ-GARAY, C., PORTUGAL, L.C., SÁNCHEZ, J., GILL, S.S., SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cell Microbiol.** v.380, p.2931–2937, 2007.
- PIGOTT, C.R., ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.71, p.255–281, 2007.
- PINTO, L.M.N., BERLITZ, D.L., FORTES, R.C., FIUZA, L.M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnol. Ciênc. & Desenvol.** n.38, p.24-31, 2009.
- POLANCZYK, R., ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, v.7, n.2, p.1-10, 2003.
- PONCET, S., DELECLUSE, A., KLIER, A., RAPOPORT, G. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* crystals. **J. Invertebr. Pathol.** v.66, p.131–135, 1995.
- POOTANAKIT, K., ANGSUTHANASOMBAT, C., PANYIM, S. Identification of two isoforms of aminopeptidase N in *Aedes aegypti* larval midgut. **J. Biochem. Mol. Biol.** v.36, p.508-513, 2003.
- POSSEE, R.D. Baculovirus as expression vectors. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.8, p.569-572.
- PROMDONKOY, B., CHEWAWIWAT, N., TANAPONGPIPAT, S., LUXANANIL, P., PANYIM, S. Cloning and characterization of a cytotoxic and mosquitocidal δ -endotoxin from *B. thuringiensis* subsp. *darmistadiensis*. **Curr. Microbiol.** v.46, p.94-98, 2003

PULLEN, S.S., FRIESEN, P.D. Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. **J. Virol.**, v.69, p.156–165, 1995.

RABINOVITCH, L., BRAZÃO-E-SILVA, C.M, ALVES, R.S.A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna-SP: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 17-90, 2000.

RAUSELL, C., GARCIA-ROBLES, I., SANCHEZ, J., MUÑOZ-GARAY, C., MARTINEZ-RAMIREZ, A.C., REAL, M.D., BRAVO, A. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *B. thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Biochim. Biophys. Acta** v.166, p.99-105, 2004.

RAJAMOHAN, F., ALZATE O., COTRILL J.A., CURTISS A., DEAN D.H. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.14338–14343, 1996.

RIBEIRO, B.M., CROOK, N.E. Expressio of full-length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a baculovirus and pathogenicity of the recombinante viruses. **J. Invert. Pathol.**, v.62, p.121-130, 1993.

RIBEIRO, B.M., CROOK, N.E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cryIAb* and *cryIAc* genes from *Bacillus thuringiensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.763-769, 1998.

RUKMINI, V., REDDY, C.Y., VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, v.82, p.109-116, 2000.

SALAMITOU, S., AGAISSE, H., BRAVO, A., LERECLUS, D. Genetic analysis of *cryIIIA* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol.**, v.142, p.2049-2055, 1996.

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

SAMIR N., ELENA M.U., MIEKE W.H., STEFAN D., IVAN M., de MAAGD R.A. Carboxy-terminal effects on crystal formation and insecticidal properties of colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. **Mol. Biotechnol.** v.32, p.185–196, 2006.

SERAFINI, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 433p., 2002.

SCHLAAK, C., HOFFMANN, P., MAY, K., WEIMANN, A. Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods. **Biotechnol. Lett.** v.27, p.1003-1005, 2005.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, p.775-806, 1998.

SILVA-WERNECK, J.O. ELLAR, D.J. Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **J. Inverteb. Pathol.** v.98, p.320-328, 2008.

SMITH, G.E., VLAK, J.M., SUMMERS, M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedron and 10.000 molecular weight protein. **J. Virol.** v.45, p.215-225, 1983.

SOBERÓN, M., BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Disponible em: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>

SOULE, H.D., VAZQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S., BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Nat. Can. Ins.** v.51, p.1409-1416, 1973.

SCHULER, T.H. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnol.** v.16, p.168-174.1998.

TAILOR, R., TIPPET, J., GIBB, G., PELLIS, S., PIKE, D., JORDAN, L., ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.1211-1217, 1992.

THOMAS, W.E., ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystalendotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **J. Cell Sci.** v.60, p.181-197, 1983.

THORNE, L., GARDUNO, F., THOMPSON, T., DECKER, D., ZOUNES, M., WILD, M., WALFIELD, A.M., POLLOCK, T.J. Structural similarity between the lepidopteran and dipteran specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *israelensis*. **J. Bacteriol.** v.166(3), p.801-811, 1986.

UAWITHYA, P., TUNTITPPAWAN, T., KATZENMEIER, G., PANYIM, S., ANGSUTHANASOMBAT, C. Effects on lircicidal activity of single proline substitutions in alpha 3 or alpha 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin. **Biochem. Mol. Int.** v.44, p.825-832, 1998.

VAUGHN, J.L., GOOWIN, R.H., TOMPKINS, G.J., MCCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro** v.13, p.213-217, 1977.

- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSIK, JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucl. Ac. Res.** v.19, p.6823-6831, 1991.
- VLAK, J.M., KLINKENBERG, F.A., ZAAL, K.J.M., USMANY, M., KLINGERODE, E.C., GEERVLIT, J.B.F., ROOSIEN, J., VAN LENT, J.W.M. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene. **J. Gen. Virol.**, v.69, p.725-776, 1998.
- VOLKMAN, L.E., KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Semin. Virol.**, v.1, p.249-256, 1990.
- VOLKMAN, L.E., HOM, G. *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. **Virol.**, v. 277, p.178-183, 2000.
- WANG, X., OOI, B.G., MILLER, L.K. Baculovirus vectors multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, v.100, p.131-137, 1991.
- WARD, E.S., ELLAR, D.J. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 kDa delta-endotoxin. **Nucleic Acids Res.** v.15, p. 7195, 1987.
- WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. **J. Bacteriol.**, v.170, p.727-735, 1988.
- WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: N. Carozzi and M. Koziel (ed.), **Advan. insect cont.:** the role of transgenic plants. p. 109-121, 1997.
- WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg, A., Huger, A.M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlen Heft**, Berlin, Paul Parey, p.37-50, 1986.
- WEYER, U., KNIGHT, S., POSSEE, R.D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.1525-1534, 1990.
- WHITEHOUSE, M.E., WILSON, L.J., CONSTABLE, G.A. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic. **Australian J. Agricult. Res.** v.58, p.273-285, 2007.
- WHITELEY, H.R., SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.40, p.549-576, 1986.

WHO (1996) Chapter 1: **The state of world health. Insect-borne diseases.** In The world health report 1996-Fighting Disease, Fostering Development. Geneva Switzerland: WHO 46-56.

WIRTH, C.M., FEDERICI, B.A., WALTON, W.E. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Appl. and Environ. Microbio.** v.66, p.1093-1097, 2000.

WIRTH, M. C., JIANNINO, J.A., FEDERICI, B.A., WALTON, W.E. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invert. Pathol.**, v. 88, p. 154-162, 2005.

WONG, H.C., SCHNEPF, H.E., WHITELEY, H.R. Transcriptional and translational start sites of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **J. Biol. Chem.**, v.258 p.1960-1967, 1983.

WONG, H. C.; CHANG, S. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V.83, p.3233-3237, 1986.

WU, D., FEDERICI, B.A. Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using *cryIA(c)* promoters to express the gene for an associated 20 kDa protein. **Appl. Microbiol, Biotechnol.** v.42, p.697-702, 1995.

XU, Y., NAGAI, M., BAGDASARIAN, M., SMITH, T.W, WALKER, E.D. Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito larvicidal activity in recombinant gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.3010-3015, 2001.

YAMAGIWA, M., OGAWA, R., YASUDA, K., NATSUYAMA, H., SEN, K., SAKAI, H. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Biosci Biotechnol Biochem.** v.66, p516–522, 2002.

YAMAGIWA, M., SAKAGAWA, K., SAKAI, H. Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.68, p.523–528, 2004.

YOUSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquitocidal larvicide. **Adv. In Biotechnol. Proc.** v.3, p.315-343, 1984.

YU, C.G., MULLINS, M. A., WARREN, G.W., KOZIEL, M.G., ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.532-536, 1997.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N.B., TAUSSIG, R., BULLA, L.A.JR. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.103, p.9897–9902, 2006.

ZHUANG, M., OLTEAN, D.I., GOMEZ, I., PULLIKUTH, A.,K., SOBERON, M., BRAVO, A. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. **J. Biol. Chem.** v.277, p.13863–13872, 2002.