

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Toxinas recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis*
expressas em células de inseto são tóxicas para larvas de *Lepidoptera* e
Diptera.

GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA

Brasília, 2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Toxinas recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis*
expressas em células de inseto são tóxicas para larvas de *Lepidoptera* e
Diptera.

GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA

Orientador: Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular da Universidade de
Brasília como requisito parcial necessário à
obtenção do título de Doutor em Biologia
Molecular.

Brasília, 2009

GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA

Toxinas recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis*
expressas em células de inseto são tóxicas para larvas de *Lepidoptera* e
Diptera.

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular da Universidade de
Brasília como requisito parcial necessário à
obtenção do título de Doutor em Biologia
Molecular.

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a. Lídia Mariana Fiúza - Laboratório de Microbiologia –Unisinos

Dr^a. Joseilde Oliveira Siva I Werneck –Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Carlos André Ricart - Laboratório de Química de Proteínas, UnB

Prof^a Dr^a. Ildinete Silva Pereira - Laboratório de Biologia Molecular, UnB

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende (Suplente) - Laboratório de Microscopia
Eletrônica, UnB

Dedico

Aos meus pais, **Gláucio e Graça**, as minhas irmãs, **Gleicy e Gláubia** pelo apoio e incentivo constante para o meu aperfeiçoamento profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz maior, sabedoria, força constante a me impulsionar, ajuda necessária para suportar os obstáculos que surgem durante a caminhada.

A minha família pelo carinho fundamental na minha vida.

Ao meu namorado, Carlos Eduardo pelo apoio, compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. Bergmann por ter confiado e acreditado em mim e principalmente pela sua orientação e oportunas sugestões.

À Dr^a Rose Monnerat, da Embrapa Cenargen, por abrir o seu laboratório para que pudéssemos, junto com a sua equipe, realizar os bioensaios e tantos outros experimentos que fossem necessários.

Ao meu querido amigo-irmão Breno Abreu, sempre presente em minha vida nos momentos bons e também difíceis. Pelo agradável convívio com a sua família. E hoje me sinto feliz porque faço parte dela.

Às minhas queridas amigas Monalisa, Michelle, Graziela e Bruna pelos momentos alegres que passamos juntas e pela amizade sincera.

À minha amiguinha e irmãzinha Anabele que me cativou com o seu jeitinho meigo, amigo e sincero. Amiga de todas as horas, principalmente quando envolve “comidinhas”.

Aos meus amigos, companheiros do Bt/Baculovírus Raimundo Wagner, Érica Martins, Roberto Franco, Vinícius e Ramon pelos momentos agradáveis, pela ajuda sempre necessária que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Aline Welzel, Lorrainy, Maria, Tiago, Tati, Carol, Susane, Bruno, Hugo, Greice, Marcelo, Juliana Nunes, Ana Paula, Nayara, Sandra, Leonora, Cláudia, Shélida, Victor, João, Michelle, Kenia, Daniel, Clara, Fabrício, Paulo, Athos, André, Ju Rocha, Márcio e Virgínia pela convivência e momentos de descontração.

À minha amiga Lílian do Laboratório de Microbiologia, que contagia a todos com a sua alegria. Muito obrigada pela palavra amiga nos momentos que mais precisei.

Ao centro de Zoonoses do Distrito Federal por ceder as larvas de *Aedes aegypti* para realização dos bioensaios.

A CAPES pelo apoio financeiro

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	X
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 CLASSIFICAÇÃO DE BACILLUS THURINGIENSIS.....	4
2.1.1 <i>Diversidade de toxinas produzidas por B. thuringiensis</i>	6
2.1.1.1 α -exotoxina	6
2.1.1.2 β -exotoxina	7
2.1.1.3 Exoenzimas	7
2.1.1.4 Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)	7
2.1.1.5 δ -endotoxina	8
2.1.2 <i>Classificação dos genes que codificam as δ-endotoxinas</i>	9
2.1.3 <i>Estrutura e mecanismo de ação das proteínas Cry de B. thuringiensis</i>	12
2.1.4 <i>Organização dos genes cry</i>	20
2.1.5 <i>Regulação da expressão dos genes cry</i>	21
2.1.5.1 Genes dependentes da esporulação	21
2.1.5.2 Genes não dependentes de esporulação.....	22
2.1.5.3 Estabilidade do mRNA.....	23
2.1.6 <i>Controle biológico utilizando B. thuringiensis</i>	24
2.1.7 <i>Proteínas das classes Cry2A e Cry11A</i>	26
2.2 BACULOVÍRUS	28
2.2.1 <i>Mecanismo de infecção in vivo</i>	30
2.2.3 <i>Baculovírus como vetor de expressão</i>	33
3. OBJETIVOS:	37
3.1 GERAL	37
3.2 ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 CÉLULAS E VÍRUS	38
4.2 EXTRAÇÃO DNÁ PLASMIDIAL	38
4.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DOS GENES CRY2AA E CRY11A	39
4.4 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE TRANSFERÊNCIA	41
4.5 CONSTRUÇÃO E ISOLAMENTO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	41
4.6 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES CRY EXPRESSOS EM CÉLULAS DE INSETO	422
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE S. FRUGIPERDA	43
4.8 ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS CRY2AA E CRY11A COM AS PROTEÍNAS ACESSÓRIAS ORF2 E P20	44
4.9 BIOENSAIO.....	45
4.9 ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DAS POSSÍVEIS PROTEÍNAS CRY2AA	46
4.9.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	46
5 - RESULTADOS.....	48
5.1 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DOS GENES CRY2AA E CRY11A	48
5.2 CONSTRUÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES VACCRY2AA E VACCRY11A	52
5.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES CRY2AA E CRY11A EM CÉLULAS DE INSETO INFECTADAS COM OS VÍRUS RECOMBINANTES	54

5.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM EXTRATO DE LAGARTAS	56
5.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS CRY.....	577
5.6 ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS CRY2Aa e CRY11A COM AS PROTEÍNAS ACESSÓRIAS ORF2 E P20	58
5.7 BIOENSAIO.....	58
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES.....	66
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	678

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Microscopia de contraste de fase (A) e microscopia eletrônica (B) de B. thuringiensis mostrando: (c) cristais, (e) esporos.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2 – Posição dos blocos conservados entre as proteínas Cry. Os retângulos em preto, cinza claro e branco indicam, respectivamente, alto, moderado ou baixo grau de homologia entre os blocos</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3 – Representação da estrutura tridimensional da toxina Cry.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4 – Esquema representativo do modo de ação das proteínas Cry de B. thuringiensis</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5 – Estrutura do corpo de oclusão de baculovírus.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 6 – Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção in vivo de um lepidóptero infectado com baculovírus..</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7 – Representação esquemática da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição in vivo (Adaptação do Kit Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 8 – Mapa dos plasmídeos (A) pGemcry2Aa e (B) pGemcry11A.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de fragmentos de DNA contendo os genes cry2Aa (A) e cry11A (B).....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10. Seqüência de nucleotídeos do gene cry2Aa (1.902 pKb) e de amino ácidos da proteína Cry2Aa (633 aa) de B. thuringiensis subsp. kurstaki S447.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 11 Seqüência de nucleotídeos do gene cry11A (1.941 pKb) e de amino ácidos da proteína Cry11A.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 12 – Esquema dos plasmídeos (A) pFastcry2Aa e (B) pFastcry11A.</i>	<i>533</i>
<i>Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 0,8% de fragmentos de DNA contendo os genes cry2Aa (A) e cry11A (B) no vetor pFastbac1®.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 14 Confirmação da clonagem dos genes cry2Aa e cry11A na orientação correta no vetor de transferência pFastbac1®.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 15 Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação por RT-PCR dos genes cry. (A) RT-PCR do gene cry2Aa.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 16 Análise da expressão das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A em insetos infectados com os vírus vAcCry2Aa e vAcCry11A.....</i>	<i>56</i>

Figura 17 Análise estrutural e ultraestrutural dos cristais purificados de larvas de S. frugiperda infectadas com o vírus recombinante vAcCry2Aa57

Figura 18 Análise da expressão das proteínas Cry2Aa e Cry11A e sua interação com as proteínas acessórias ORF2 e P20, respectivamente, em gel SDS-PAGE (12%)58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classe das proteínas Cry e Cyt de B. thuringiensis com os respectivos subgrupos

(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html) (atualizado em 09/03/2008) ___11

Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho _____40

Tabela 3 - Atividade inseticida das proteínas heterólogas Cry2Aa contra larvas de segundo instar de A.

gemmatalis. _____59

Tabela 4 - Atividade inseticida das proteínas heterólogas Cry11A contra larvas de segundo instar de A.

aegypti _____59

ABREVIACES E SMBOLOS

Amp ⁺	resistente à ampicilina
BSA	albumina srica bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
BtI e BtII	promotores de <i>B. thuringiensis</i>
cDNA	DNA complementar
CL ₅₀	Concentrao letal para 50% da populao
EDTA	cido etilediaminotetractico
dH ₂ O	gua destilada
dNTP	Desoxinucleotdeos
g	grama
x g	velocidade de sedimentao em unidade gravitacional
h	hora
h.p.i.	horas ps-infeco
HCl	cido clordrico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosdeo
kb	quilobase = 1000 pares de bases
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio
L	litro
μl	microlitro

M	molar: mol/L
mg	miligrama
µg	micrograma = 10^{-6} grama
mL	mililitro
mM	milimolar
NaOH	hidróxido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio
ng	nanogram = 10^{-9} grama
pb	pares de base
PCR	reação de polimerase em cadeia
pH	potencial de hidrogênio
PMSF	fenilmetanosulfonilfluoreto (inibidor de proteases)
Psyn	promotor sintético derivado do promotor do gene da poliedrina
PXIV	promotor derivado do promotor do gene da poliedrina
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	transcriptase reversa-Reação de PCR
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tn7L e Tn7R	elementos de transposição sítio-específica

Tris	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
U	unidade enzimática
ufp	unidade formadora de placa
vSynVI-gal	vírus com gene β -galactosidase no locus do gene da poliedrina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
°C	grau Celsius

Resumo

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica, que se caracteriza pela presença de inclusões cristalinas denominadas de δ -endotoxinas ou proteínas Cry. Essas proteínas podem ser altamente tóxicas para insetos suscetíveis, não apresentando atividade para outros organismos. Alguns sistemas de expressão vêm sendo utilizados para expressar proteínas Cry com a finalidade de aumentar a sua toxicidade para diversas ordens de insetos. Os baculovírus são vírus de insetos que têm sido muito utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos em células de insetos, devido principalmente à presença de promotores fortes que permitem altos níveis da proteína heteróloga na fase tardia da infecção. Neste trabalho, foram clonados genes *cry* (*cry2Aa* e *cry11A*) isolados das estirpes de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447 e subsp. *israelensis* S1806, respectivamente, no genoma do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), por transposição sítio-específica, gerando os vírus vAcCry2Aa e vAcCry11A. A avaliação da expressão bem como a presença do transcrito foi realizada por RT-PCR. As proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, revelando a presença de bandas de aproximadamente 65 kDa e 70 kDa, respectivamente. A toxicidade das proteínas heterólogas foi testada para larvas de inseto das ordens *Lepidoptera* e *Diptera*. A proteína heteróloga Cry2Aa apresentou uma CL_{50} 1,036 $\mu\text{g/mL}$ para larvas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis*, enquanto Cry11A mostrou ser bastante tóxica para larvas de segundo instar de *Aedes aegypti* com CL_{50} de 53,3 ng/mL. A presença de cristais derivados da proteínas heteróloga Cry2Aa só foi evidenciada nos extratos de lagartas infectadas com os vírus recombinantes. A análise ultraestrutural da proteína heteróloga Cry2Aa purificada a partir dos extratos das larvas de terceiro instar

infectadas com o vírus recombinante vAcCry2Aa mostrou a presença de grandes cristais na forma cubóide Neste trabalho foi possível avaliar que o baculovírus é um bom vetor de expressão de proteínas Cry.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram positive, entomopathogenic bacteria that produces crystalline inclusions called δ -endotoxins or Cry proteins. These proteins are highly toxic to susceptible insects, not showing activity against others organisms. Some expression systems have been used to express crystal proteins with the aim to increase their toxicity for several insect orders. Baculoviruses are insect viruses that have been widely used as expression vectors of heterologous proteins in insect cells, mainly due to the presence of strong promoters that allow high levels of expression of the heterologous protein during the late phase of virus infection. In this work, *cry* genes (*cry2Aa* and *cry11A*) from *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* S447 and subsp. *israelensis* S1806, respectively, were introduced into the genome of the baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), by site-specific transposition, generating the recombinant viruses vAcCry2Aa and vAcCry11A. Transcription of the heterologous genes were confirmed using mRNA from recombinant viruses infected-insect cells (72 h p.i) by RT-PCR. The heterologous Total extracts from *Spodoptera frugiperda* infected with the recombinant viruses (vAcCry2Aa and vAcCry11A) were analyzed by SDS-PAGE, which detected the presence of polypeptides around 65 kDa and 70 kDa, respectively. Bioassays, using the heterologous proteins showed that Cry2Aa had toxicity to second instar *Anticarsia gemmatalis* larvae with a LC₅₀ of 1.03 μ g/mL and that Cry11A had toxicity to second instar *Aedes aegypti* larvae (Cry11A) with a LC₅₀ of 53.3 ng/mL. Cuboid-shaped protein crystals (Cry2Aa) were observed only in vAcCry2Aa *S. frugiperda* infected-extracts by light and scanning electron microscopy. This work confirms the utility of the baculovirus expression system for the efficient expression of Cry proteins.

1. Introdução

A busca por alternativas para tentar diminuir o uso de inseticidas químicos tem sido realizada em todo mundo com a finalidade de reduzir os impactos causados ao meio ambiente por esses agentes que, além de poluir, causam desequilíbrio ecológico e promovem o surgimento de insetos resistentes (Estruch *et al.* 1997).

Devido a essas restrições, o interesse por agentes biológicos para controle de insetos-praga e vetores de doenças tem aumentado. Dentre os bioinseticidas mais utilizados, *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria Gram-positiva, destaca-se como um agente favorável e seguro para o controle biológico de insetos por ser altamente específico e não apresentar atividade tóxica para mamíferos (Pang *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998).

Essa bactéria é responsável por mais de 90% dos biopesticidas disponíveis em todo o mundo (Polanczyk & Alves, 2003). Estima-se que sejam aplicados, por ano, por volta de 13.000 toneladas de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Hansen & Salamitou, 2000).

A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* é devido à presença de inclusões cristalinas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry, que são produzidas na fase de estacionária e acumuladas no compartimento da célula mãe durante a esporulação, correspondendo a 25% do peso seco da célula (Agaisse & Lereclus, 1995). Estas inclusões cristalinas podem conter uma ou mais proteínas Cry, que, por sua vez, apresentam um amplo espectro de ação, com atividade para diversas ordens de insetos (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*), nematóides, ácaros e protozoários (Schnepf *et al.*, 1998).

As proteínas Cry contidas no cristal, quando ingeridas pelo inseto suscetível, são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas ativas que se ligarão a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico levando à morte do inseto (Bravo *et al.*, 2007, de Maagd *et al.*, 2001, Schnepf *et al.*, 1998).

As delta-endotoxinas foram classificadas em vários grupos de proteínas Cry. Essa classificação é baseada na identidade dos aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998) e até o momento já foram seqüenciados mais de 400 genes *cry* e as proteínas agrupadas em 55 grupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

A descoberta de novos genes *cry* com amplo espectro de ação é de extrema importância para o desenvolvimento de novos bioinseticidas contra diferentes insetos-praga, reduzindo a probabilidade dos mesmos desenvolverem resistência (Betz *et al.*, 2000; Bobrowski *et al.*, 2001).

Os baculovírus são vírus de insetos que têm sido muito utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos em células de insetos, devido principalmente à presença de promotores fortes que permitem altos níveis da proteína heteróloga na fase tardia da infecção. Outra vantagem é que não apresentam atividade para vertebrados, a manipulação é simples e segura, podendo ser aplicada na produção de proteínas de interesse biotecnológico (Szewczyk *et al.*, 2006; Moscardi, 1999). Vários grupos têm inserido no genoma do baculovírus genes *cry* na forma intacta, truncada ou fusionada à poliedrina (principal proteína produzida pelo baculovírus) com a finalidade de aumentar a velocidade de ação bem como a patogenicidade viral para larvas de insetos (Martens *et al.*, 1990; Merryweather *et al.*, 1990; Pang *et al.* 1992; Ribeiro & Crook, 1993; Chang *et al.*, 2003, Aguiar *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2008).

O trabalho realizado nesta tese faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília em parceria com o laboratório da Coleção de Bacilos Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com a finalidade de expressar proteínas Cry recombinantes de *B. thuringiensis* em células de insetos, usando o baculovírus como vetor de expressão, além de analisar a toxicidade das proteínas heterólogas para diferentes insetos suscetíveis (Ribeiro & Crook, 1993; 1998; Martins, 2005; Aguiar, 2007; Corrêa, 2007).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Classificação de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, ubíqua, aeróbia, pertencente à família *Bacillaceae*, que se movimenta com auxílio de flagelos peritríquios. Apresenta-se na forma de bastões isolados, aos pares ou em cadeias com tamanhos que variam de 0,5 a 2,5 µm de largura e 1,2 a 10 µm de comprimento (Miralles & Pérez, 2004) (Figura 1A).

Quando a bactéria encontra-se em condições nutricionais desfavoráveis, a divisão celular é interrompida e inicia-se a esporulação. Durante a fase de esporulação, ocorre a produção de inclusões cristalinas denominadas δ-endotoxinas ou proteínas Cry (do inglês – "crystal"), que se acumulam no compartimento da célula-mãe correspondendo a cerca de 20% a 30% do peso seco da célula esporulada (Figura 1B). O cristal é liberado juntamente com o esporo durante a lise celular (Lereclus *et al.*, 1989; Arantes *et al.*, 2002). A atividade entomopatogênica desta bactéria está relacionada à produção desse cristal, composto por um agregado de proteínas codificadas por genes *cry*, que apresenta atividade tóxica para diversas ordens de insetos e outros invertebrados (Höfte & Whiteley, 1989; Glare & O'Callaghan, 2000).

B. thuringiensis foi isolado pela primeira vez em 1901 por Ishiwata como sendo a bactéria responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombix mori*, causando a doença conhecida como "sotto-disease". Porém, a primeira nomenclatura só foi sugerida em 1908 por Iwabuchi que denominou a bactéria como sendo *B. sotto* Ishiwata.

Posteriormente, essa bactéria foi descrita por Berliner em 1911 e classificada como *B. thuringiensis* (em homenagem a Thuringia, cidade Alemã), após ser isolada de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* (*Lepidoptera*:Pyrilidae) (Whiteley & Schnepf, 1986; Glare & O'Callaghan, 2000).

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 de *B. cereus* que compreende as espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihstephanensis*. As quatro primeiras espécies desse grupo apresentam as mesmas características fenotípicas e bioquímicas. A sorotipagem das células vegetativas e/ou esporos assim como os perfis de carboidratos e ácidos graxos, hibridização do DNA cromossômico, comparação de seqüências 16S, 23S rRNA ou região intergênica 16S - 23S rRNA não permitem observar diferenças entre as espécies, mostrando que essas espécies são, na verdade, somente uma. A única característica que permite diferenciar as espécies é a produção de um corpo cristalino refringente (proteína Cry) visível por microscopia de contraste de fase ou microscopia óptica comum. Essa classificação tem sido motivo de discussão entre taxonomistas e bacteriologistas, pois mesmo utilizando ferramentas moleculares, é muito difícil separar essas espécies (Ohba & Aizawa, 1986; Priest *et al.*, 1988; Rasko *et al.*, 2005).

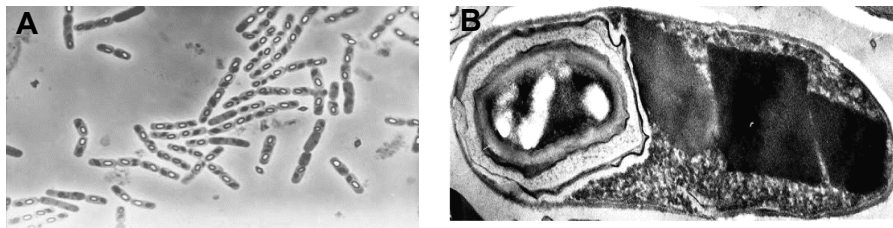


Figura 1 – Microscopia de contraste de fase (A) e microscopia eletrônica (B) de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais, (e) esporos (adaptados de http://www.futura-sciences.com/uploads/tx_oxcsfutura/comprendre/d/images/604/pintureau_03.jpg, www.ufrgs.br/laprotox/digestion-eng.htm, respectivamente).

2.1.1 Diversidade de toxinas produzidas por *B. thuringiensis*

B. thuringiensis produz, além das proteínas Cry, várias toxinas com atividade inseticida dentre elas a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas, VIPs (do inglês – "vegetative insecticidal proteins") que podem atuar aumentando a toxicidade das δ -endotoxinas. Além das toxinas, os esporos também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica desempenhada junto com as proteínas Cry.

2.1.1.1 α -exotoxina

É uma enzima com atividade citolítica que age sobre os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. É termolábil, solúvel em água, sendo altamente tóxica para alguns insetos, seja por administração oral ou intra-hemocélica, e também para ratos, causando degeneração e lise das células. Essa toxina também é conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase (Krieg, 1971; Faust & Bulla Jr., 1982; Hansen & Salameitou, 2000).

2.1.1.2 β -exotoxina

Esta toxina, também chamada de Thuringiensina, é produzida durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. É termolábil, com baixa massa molecular. Existem dois tipos de β -exotoxinas: A toxina tipo I que é um análogo de ATP, composto por adenina, ribose, glicose e ácido fosfolárico (Farkas *et al.*, 1969). Sua atividade tóxica está relacionada com a inibição da RNA polimerase através da competição com ATP, apresentando um amplo espectro de toxicidade para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, provocando efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamitou, 2000); A toxina do tipo II é um análogo de UTP e é mais tóxica que a do tipo I, principalmente para insetos da ordem *Coleoptera* (Levinson *et al.*, 1990). Devido a sua alta toxicidade frente a mamíferos, um dos critérios indispensáveis em alguns países para a produção comercial é a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* que não produzam essa toxina (McClintock *et al.*, 1995).

2.1.1.3 Exoenzimas

B. thuringiensis produz um grande número de exoenzimas que desempenham um papel importante na patogenicidade a insetos. Dentre as exoenzimas estão as quitinases e as proteases. Essas exoenzimas são liberadas pela bactéria e vão provocar ruptura da membrana peritrófica favorecendo o acesso das δ -endotoxinas ao epitélio intestinal (Reddy *et al.*, 1998; Sampson & Gooday, 1998).

2.1.1.4 Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)

Um grupo de proteínas denominadas VIP é produzido por algumas estirpes de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento e de esporulação (Estruch *et al.*,

1996). Essas proteínas são secretadas e não formam inclusões cristalinas, por esse motivo e também por não apresentarem homologia de seqüência ou de estrutura, as VIPs foram excluídas da nomenclatura das proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998). O modo de ação dessas proteínas ainda não foi totalmente elucidado, sabe-se que a VIP3A une-se às células epiteliais do intestino médio do inseto provocando posteriormente, a lise celular. As manifestações tóxicas são semelhantes às que ocorrem com as proteínas Cry (Yu *et al.*, 1997). As proteínas VIPs apresentam uma massa molecular variando de 88 a 100 kDa e apresentam atividade contra insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua* e *Helicoverpa zea* (Yu *et al.*, 1997).

2.1.1.5 δ -endotoxina

B. thuringiensis produz durante os estágios III e IV da fase de esporulação corpos de inclusões protéicos que contém as δ -endotoxinas. Essas delta-endotoxinas vão sendo acumuladas no compartimento da célula-mãe. No final da esporulação, o cristal é liberado juntamente com o esporo (Schnepf *et al.*, 1998). Existem dois tipos de δ -endotoxinas: as proteínas Cry e as proteínas Cyt. O espectro de ação das δ -endotoxinas é normalmente restrito a uma determinada ordem de insetos, *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera* ou nematóides e ácaros (Schnepf *et al.*, 1998). Essa bactéria pode produzir uma ou mais proteínas Cry com massa molecular variando de 40 a 140 kDa (Serafini *et al.*, 2002). No caso de *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* HD1, estão presentes em um mesmo cristal três proteínas do tipo Cry1 de 130 kDa (Lereclus *et al.*, 1989). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo apresentar-se nas formas bipiramidal, cubóide, ovóide, rombóide, esférico ou até mesmo sem uma forma definida (Habib &

Andrade, 1998; Polanczyk & Alves, 2003). Bernhard *et al.*(1997) analisaram aproximadamente 2.800 estirpes de *B. thuringiensis* em diferentes regiões geográficas e verificaram que 45,9% das delta-endotoxinas eram do tipo bipiramidal, 19,1% puntiformes irregulares, 16,4% rombóides, 14,2% esféricas e 4,4% cubóides.

As proteínas Cyt não apresentam homologia com as proteínas Cry, possuem atividade citolítica, apresentando afinidade para ácidos graxos insaturados na porção lipídica da membrana celular (Thomas & Ellar, 1983). As proteínas Cyt são constituídas pelos grupos Cyt1 e Cyt2, onde a classe Cyt1 apresenta três tipos: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba (Ward *et al.*, 1988; Thiery *et al.*, 1997), enquanto a classe Cyt2 possui cinco integrantes: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. Apresentam massa molecular de 27 - 30 kDa (Koni & Ellar, 1993; Cheong & Gill, 1997; Crickmore *et al.*,1998) e todas são tóxicas para insetos da ordem *Diptera*. Além disso, a proteína Cyt2Ca apresenta também atividade contra insetos da ordem *Coleoptera* (Crickmore *et al.*,1998).

2.1.2 Classificação dos genes que codificam as δ -endotoxinas

O primeiro gene *cry* de *B. thuringiensis* foi clonado e seqüenciado em 1981 por Schnepf & Whiteley e desde então, o número de seqüências tem aumentado consideravelmente. Inicialmente, a caracterização desses novos genes não tinha uma nomenclatura adequada e os mesmos eram classificados de maneira arbitrária (Crickmore *et al.*, 1998), demonstrando a necessidade de uma padronização. Foi então que no final da década de 80, percebendo a necessidade de organizar melhor a nomenclatura desses genes, Höfte & Whiteley (1989) propuseram uma nomenclatura para os genes *cry*, onde a classificação dos genes era baseada na combinação de seqüências de aminoácidos e no espectro de atividade da proteína cristal. Os autores

agruparam 14 tipos de genes diferentes, os quais foram distribuídos em quatro classes que apresentavam atividade contra *Lepidoptera* (*cryI*), *Lepidoptera* e *Diptera* (*cryII*), *Coleoptera* (*cryIII*) e *Diptera* (*cryIV*) e uma quinta classe, *cytA*, que foi agrupada separadamente por não apresentar homologia de seqüência ou atividade tóxica com as outras classes (Tailor *et al.*, 1992; Crickmore *et al.*, 1998). À medida que novos genes foram isolados e caracterizados, começaram a observar que o sistema de classificação de Höfte & Whiteley não era muito eficiente, uma vez que não era possível acomodar nessas diferentes classes os genes que apresentavam seqüências de aminoácidos similares, porém, não mostravam toxicidade com o mesmo espectro de ação. Foi então que em 1998, Crickmore *et al.* apresentaram uma nova classificação baseando-se apenas nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Nessa nova proposta, a classificação é feita pelo nome da toxina (Cry ou Cyt) seguido de número (números romanos foram trocados por arábicos para comportar melhor o grande número de novas proteínas), letra maiúscula, letra minúscula e número (ex: Cry2Aa4) dependendo da sua localização na árvore filogenética (de Maagd *et al.*, 2001). Alguns genes tiveram seus números alterados, como ocorreu com *cryIH*, *cryIIIC* e *cryIVD*, que foram classificados como *cry9Ca*, *cry7Aa* e *cry11Aa*, respectivamente (ver site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html, atualizado em 14 de novembro de 2008). Até o momento, já foram descritos mais de 400 genes *cry* e agrupados em 55 grupos de proteínas Cry (Cry1 a Cry55). Essa primeira categoria (ex: Cry1, Cry2 etc) apresenta uma identidade de até 45%, a segunda e terceira categoria (Cry2Aa) 78% e 95% de identidade, respectivamente, e a quarta categoria (Cry2Aa2) indicada por um número tem identidade acima de 95% (de Maagd *et al.*, 2001). Com relação aos genes *cyt* já foram depositadas no banco 26 seqüências que estão organizadas em nove holotipos (Tabela 1).

Tabela 1 – Classe das proteínas Cry e Cyt de *B. thuringiensis* com os respectivos subgrupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html) (atualizado em 01/03/2009)

Proteínas	Subgrupos	Atividade	Proteínas	Subgrupos	Atividade
Cry1	42	Lepidoptera	Cry25	1	Diptera
		Lepidoptera/Diptera	Cry26	1	Sem atividade conhecida
		Lepidoptera/Coleóptera	Cry27	1	Diptera
Cry2	6	Lepidoptera/Diptera	Cry28	1	Sem atividade conhecida
		Lepidoptera	Cry29	1	Diptera
Cry3	4	Coleóptera	Cry30	4	Diptera
Cry4	2	Diptera	Cry31	3	Sem atividade conhecida
Cry5	5	Nematoda/Acari	Cry32	4	Diptera
		Himenoptera	Cry33	1	Sem atividade conhecida
		Coleóptera	Cry34	4	Coleóptera
Cry6	2	Nematoda/Acari	Cry35	4	Coleóptera
Cry7	4	Coleóptera	Cry36	1	Coleóptera
Cry8	13	Coleóptera/Hemiptera	Cry37	1	Sem atividade conhecida
Cry9	10	Lepidoptera	Cry38	1	Coleóptera
		Lepidoptera/Coleóptera	Cry39	1	Diptera
Cry10	1	Diptera	Cry40	3	Diptera
Cry11	3	Diptera	Cry41	2	Citotoxicidade (células cancerosas)
Cry12	1	Nematoda/Acari	Cry42	1	Citotoxicidade (células cancerosas)
Cry13	1	Nematoda	Cry43	2	Coleóptera
Cry14	1	Diptera/Coleóptera	Cry44	1	Diptera
Cry15	1	Lepidoptera	Cry45	1	Citotoxicidade (células cancerosas)
Cry16	1	Diptera	Cry46	2	Citotoxicidade (células cancerosas)
Cry17	1	Diptera	Cry47	1	Diptera
Cry18	3	Coleóptera	Cry48	2	na ^a
Cry19	2	Diptera	Cry49	2	na ^a
Cry20	1	Diptera	Cry50	1	Diptera
Cry21	2	Nematoda	Cry51	1	na ^a
Cry22	3	Himenoptera	Cry52	1	na ^a
		Coleóptera	Cry53	1	na ^a
Cry23	1	Sem atividade conhecida	Cry54	1	na ^a
			Cry55	1	Coleóptera
Cry24	3	Diptera	Cyt1	4	Diptera
			Cyt2	5	Diptera/Coleóptera

^a Não acessível

2.1.3 Estrutura e mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis*

A maior parte das δ -endotoxinas apresentam-se como uma pró-toxina com massa molecular variando de 130-140 kDa, que para serem ativadas devem ser processadas por proteases do intestino médio dos insetos, liberando um fragmento entre 55-65 kDa (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989). A pró-toxina possui duas regiões distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e que está associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal, mais conservada entre as proteínas, relacionada geralmente à formação do cristal (Chestukhina *et al.*, 1982).

Experimentos realizados com genes truncados na região 5' ou 3' revelaram que a região do DNA necessária para a síntese da proteína tóxica é a partir do códon 29 ao 607 ou 615. Além disso, a proteína truncada mantém a especificidade tóxica da δ -endotoxina nativa. O papel do domínio carboxi-terminal dessas proteínas está relacionado com a estrutura, formação e solubilização do cristal. Essa hipótese é mantida pela presença de resíduos de cisteína localizados na porção C-terminal, responsáveis pelas pontes dissulfeto que mantêm as proteínas juntas e estáveis na inclusão cristalina (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

Höfte & Whiteley (1989), analisaram algumas regiões que são altamente conservadas entre as proteínas Cry e, após o alinhamento de seqüências de aminoácidos, revelaram a presença de cinco blocos conservados na região que codifica a toxina. Schnepf *et al.* (1998) descreveram outros três blocos localizados na região da pró-toxina. Esses resultados são importantes para comprovar a função biológica dessas proteínas e também sugerem que as proteínas Cry formam famílias com blocos similares e mecanismos de ação semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000).

Na figura 2, é possível distinguir os três grupos de proteínas Cry. O primeiro é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 e Cry20 que apresenta os cinco blocos conservados na porção tóxica. O segundo contém Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21 que se caracteriza por ter regiões homólogas aos blocos 1, 2, 4 e 5, apresentando uma variante do bloco 2 e ausência do bloco 3. O terceiro grupo é composto pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18 que possui o bloco 1 conservado e apresenta uma variante truncada do bloco 2 e não apresenta os blocos 3, 4 e 5 (Lereclus *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

A partir da estrutura tridimensional da proteína Cry3A, foi determinada a presença de três domínios (Li *et al.*, 1991). O domínio I N-terminal é composto por 7 α -hélices onde uma hélice central ($\alpha 5$ - hidrofóbica) está rodeada por outras 6 α -hélices anfipáticas. Estudos realizados com a toxina Cry3Bb, tóxica para insetos da ordem *Coleoptera*, mostraram que o domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro (Prieto-Samsónov *et al.*, 1997). Os domínios II e III são formados principalmente por folhas β . O domínio II contém três folhas β antiparalelas dispostas ao redor de um núcleo hidrofóbico (Aronson & Shai, 2001). O domínio III C-terminal, também chamado de β - prisma consiste de duas folhas β antiparalelas. Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Além disso, o domínio III pode estar relacionado com a estabilidade estrutural da toxina e na formação do poro (de Maagd *et al.*, 2001) (Figura 3A).

Em 2001, Guitierrez *et al.* publicaram o primeiro modelo teórico da estrutura tridimensional da proteínas Cry11. A estrutura da toxina Cry11Bb foi obtida através do grau de homologia da seqüência de aminoácidos baseado nas estruturas das proteínas Cry1A e Cry3A. Os autores observaram que as três toxinas compartilham estrutura tridimensional comum apesar de apresentar um baixo grau de homologia na seqüência

de aminoácidos. Uma diferença estrutural significativa foi observada nas alças do domínio II. Uma vez que este domínio está relacionado com o reconhecimento e ligação a receptores celulares, essa diferença indica que este domínio está relacionado com a especificidade da toxina (Figura 3B)

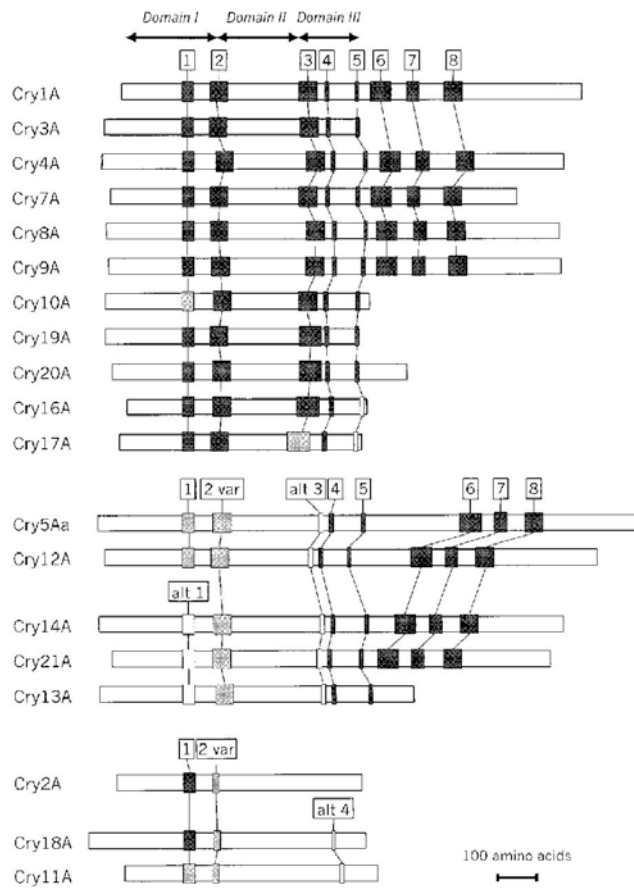


Figura 2 – Posição dos blocos conservados entre as proteínas Cry. Os retângulos em preto, cinza claro e branco indicam, respectivamente, alto, moderado ou baixo grau de homologia entre os blocos (Schnepf et al., 1998).

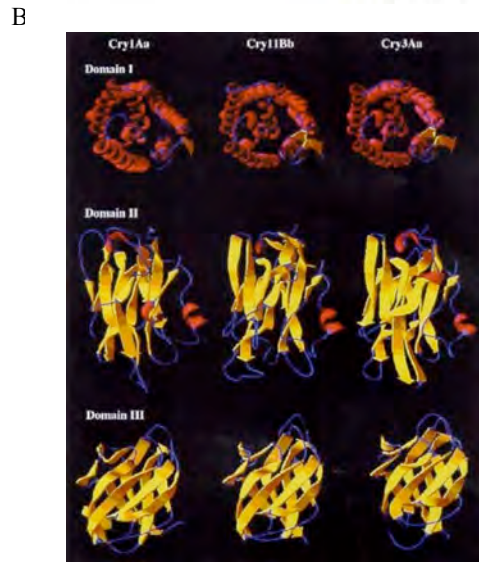
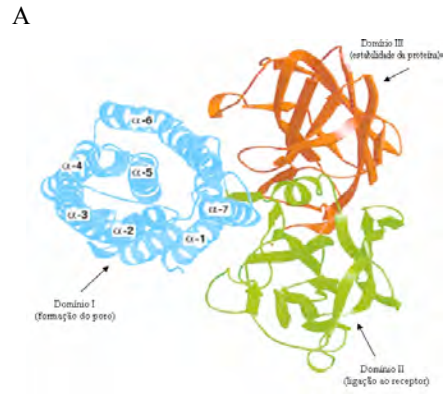


Figura 3 –Representação da estrutura tridimensional da toxina Cry. (A) Toxina Cry3A. A toxina apresenta três domínios. O domínio I (azul) está envolvido na inserção na membrana e formação de poro, os domínios II (verde) e III (laranja) estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. O domínio III é também responsável pela estabilidade da proteína (Adaptado de Aronson &Shai, 2001). O domínio I N-terminal é composto por 7 α -hélices onde uma hélice central ($\alpha 5$ - hidrofóbica) está rodeada por outras 6 α -hélices anfipáticas.(B) Comparação entre os **domínios estruturais** das proteínas Cry1A, Cry11Bb e Cry3A, respectivamente (Gutierrez *et al.*, 2001). É possível observar que as três proteínas apresentam os domínios I e III praticamente idênticos e diferenças nas alças internas do domínio II podem ser observadas na figura.

Como as proteínas Cry apresentam-se como pró-toxinas que necessitam ser ativadas por proteases para desencadear seus efeitos tóxicos, o modo de ação envolve uma série de etapas (solubilização e processamento da toxina, ligação ao receptor, inserção na membrana e citólise) que se inicia a partir do momento que o cristal e o esporo são ingeridos pela larva suscetível (Schnepf *et al.*, 1998) (Figura 4).

A solubilização da pró-toxina ocorre em pH alcalino no intestino médio da maioria das larvas de insetos suscetíveis (*Lepidoptera*, *Diptera* e alguns insetos *Coleoptera*) (Knowles *et al.*, 1994). Diferenças na solubilização podem contribuir para determinar as alterações no grau de toxicidade entre as proteínas Cry (Aronson *et al.*, 1991).

Após a solubilização, muitas pró-toxinas são processadas por proteases que estão presentes no intestino médio do inseto, liberando o fragmento tóxico (Tojo & Aizawa, 1983). A proteína Cry1A (130 – 140 kDa), após a digestão, é clivada nos primeiros 28 resíduos da extremidade N-terminal e nos últimos 500 resíduos da extremidade C-terminal liberando um fragmento de 55 – 65 kDa. A clivagem proteolítica é um fator importante que pode contribuir para determinar a especificidade; a principal protease digestiva de *Lepidoptera* e *Diptera* é serino-protease, enquanto que para *Coleoptera* são principalmente cisteíno e aspártico-proteases (de Maagd *et al.*, 2001).

Alguns autores sugerem que o mecanismo de resistência desenvolvido no inseto está relacionado com a redução de solubilidade e proteases envolvidas (McGaugley & Whalon, 1992; Aronson *et al.* 1991). Esse fato deve-se a diferenças presentes no intestino dos insetos. Haider & Ellar (1989), mostraram que dependendo da enzima proteolítica presente, uma pró-toxina pode ser clivada em uma toxina ativa para lepidópteros ou dípteros. Os autores chegaram a esta conclusão após tratamento de uma

proteína de 130 kDa tóxica para dípteros e lepidópteros de *B. thuringiensis* sorovar *aizawai* com extrato de intestino médio do lepidóptero *Pieris brassicae*. A toxina, após o tratamento, mostrou-se tóxica para ambas as larvas de *P. brassicae* e *Aedes aegypti*. Porém, quando ativada por proteases do intestino de larvas de *A. aegypti*, a toxina ativa apresentava toxicidade apenas para larvas de dípteros.

Após serem ativadas, as proteínas Cry ligam-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das células colunares do intestino médio das larvas de insetos suscetíveis, sendo um fator importante para a toxicidade e especificidade das δ -endotoxinas (de Maagd *et al.*, 2001). Até o momento foram descritos quatro receptores que estão situados na superfície das células intestinais de larvas da ordem *Lepidoptera*. Uma aminopeptidase N (APN), que está ancorada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina, uma proteína glicocjugada de 270 kDa e uma fosfatase alcalina ancorada à GPI. O GPI é suscetível à ação de uma fosfatase C específica endógena do inseto e permite sua união com a toxina de maneira específica. Em lepidópteros, a Cry1A se liga a APN de 120 kDa e as proteínas do tipo caderina (Bt-R1) de 210 kDa. As caderinas e as APN interagem de modo consecutivo com diferentes estruturas da toxina. Inicialmente, a toxina ativa se liga a caderina provocando a primeira modificação conformacional onde expõe a região da α -hélice para ser clivada por proteases da membrana. Após a clivagem ocorre a formação de um complexo pré-poro (na forma de um tetrâmero) (Gómez *et al.* 2002; Bravo *et al.*, 2007). Este oligômero se liga a APN, que está ancorada a membrana pela sua ligação ao GPI, e em seguida, ocorre a inserção da toxina ativa na membrana de forma irreversível e induzindo a abertura ou formação de poros que provocam uma quebra no balanço osmótico da célula e conseqüente lise celular (Knowles & Ellar, 1987; Hofman *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 1994). A etapa de

união aos receptores é importantíssima para determinação do espectro de ação das delta-endotoxinas e tem sido alvo de vários estudos (Bravo *et al.*, 2007; Soberón *et al.*, 2007).

A intoxicação nos insetos da ordem *Lepidoptera* se manifesta por uma paralisação imediata do tubo digestivo e peças bucais, levando à lise celular e à interrupção da alimentação. As células colunares e caliciformes são destruídas e propiciam a entrada dos esporos que germinam (Du & Nickerson, 1996), conduzindo à lise do intestino médio, inanição e posterior septicemia, levando o inseto à morte (Dai & Gill, 1993; Monnerat & Bravo, 2000).

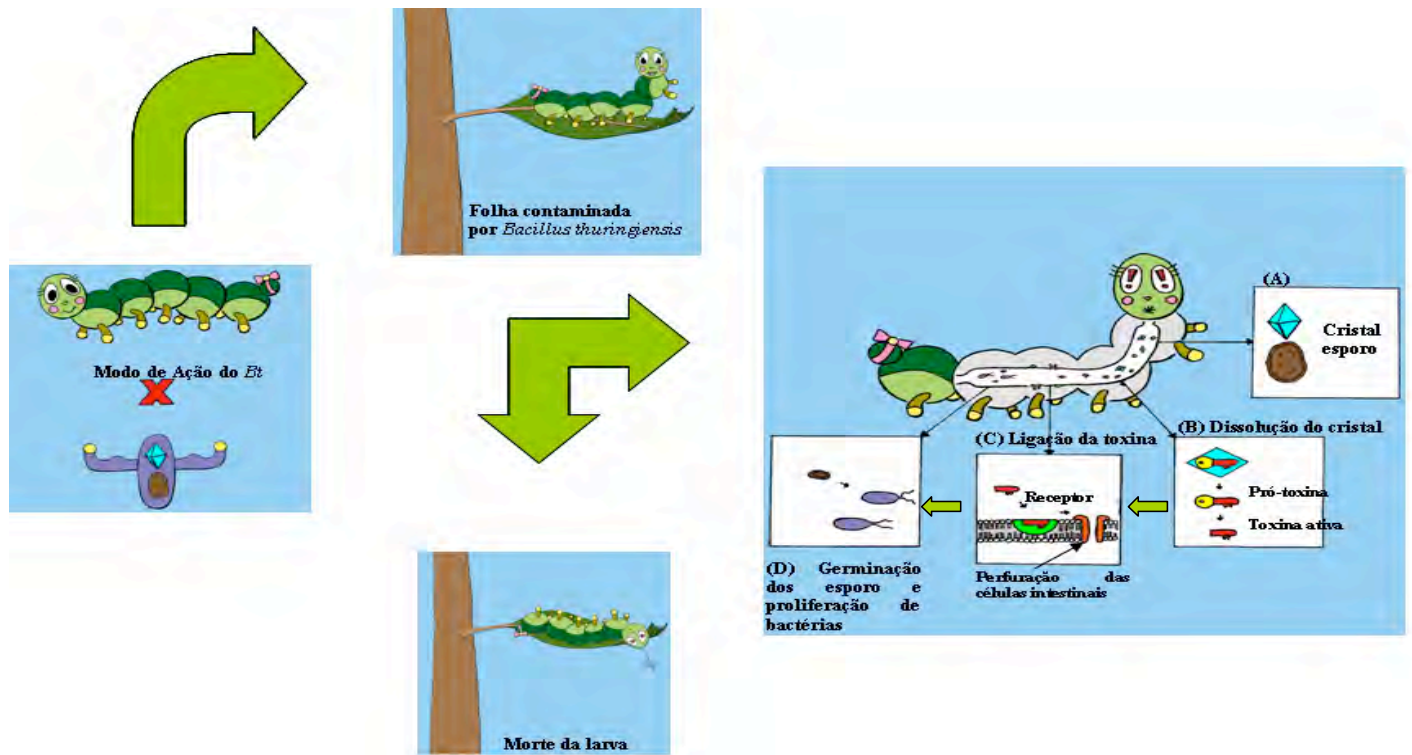


Figura 4 – Esquema representativo do modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* (A) Ingestão de esporo e cristal pela larva suscetível, em seguida, estes migram pelo trato digestivo; (B) dissolução dos cristais em pH alcalino no intestino médio da larva e processamento da pró-toxina por proteases liberando a toxina ativa; (C) A toxina se liga a receptores específicos ocasionando a abertura de poros que leva a um desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, lise celular; (D) Os esporos germinam e levam a lise do intestino médio. Após a morte da larva, os esporos são liberados no ambiente (Esquema gentilmente cedido por Breno Tenório R. Abreu).

2.1.4 Organização dos genes *cry*

B. thuringiensis tem um genoma que varia de 2,4 a 5,7 Megabases (Mb), contendo vários elementos extra-cromossomais, representando de 10 a 20% do genoma da bactéria, podendo possuir até 17 plasmídeos, com tamanhos que variam de 2 até 200 pares de quilobases (pkb) (Carlson *et al.*, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Pérez, 2004).

Os genes *cry* estão presentes em plasmídeos conjugativos maiores do que 30 Megadaltons (MDa) (González *et al.*, 1982; Lereclus *et al.*, 1989), embora já se tenha observada a presença desses genes em fragmentos cromossomais por hibridização com sondas de genes *cry*, ainda não foi esclarecida a relação desses homólogos cromossomais na produção dos cristais (Schnepf *et al.*, 1998). Esse fato pode ser explicado de duas formas. A primeira mais simples, levando em consideração que esses genes estão presentes em plasmídeos de alto peso molecular, que durante o processo de extração se rompem e ao serem analisados por eletroforese os mesmos co-migram com o DNA cromossomal explicando dessa forma a presença dos genes *cry* (Pérez, 2004). A outra explicação foi dada por Carlson & Kolsto (1993), pela análise do mapeamento cromossomal de uma cepa de *B. thuringiensis*, que mostrou a presença de uma seqüência com alto nível de similaridade com a família dos genes *cry*.

A mobilidade desses genes pode estar associada à presença de transposons do tipo "Insertion Sequence" (IS) (Mahillon *et al.*, 1994). Já foram descritas quatro famílias de IS e a sua distribuição não se restringe apenas à espécie *B. thuringiensis* sendo encontrada em *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. mycoides* (Leonard *et al.*, 1997). Dentre elas foram descritos os tipos de IS em Bt: IS231, IS232, IS240, Tn4430, Tn5401 e TnBthI (Lereclus *et al.*, 1986; Baum, 1994; Baum *et al.*, 1999; Schnepf *et al.*, 1998).

A possível mobilização por elementos móveis ou por plasmídeos conjugativos tem implicações biológicas importantes, podendo explicar a multiplicidade e a diversidade observada para o espectro de ação em *B. thuringiensis* (Pérez, 2004).

2.1.5 Regulação da expressão dos genes *cry*

As δ -endotoxinas são produzidas durante a fase estacionária e se acumulam no compartimento da célula-mãe sob a forma de cristais, e correspondem a 25 - 30% das proteínas totais da bactéria em esporulação (Agaisse & Lereclus, 1995). A síntese é bastante eficiente devido à presença de uma maquinaria especial, que no caso de *B. thuringiensis* envolve mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (Schnepf *et al.*, 1998). Baseado na expressão, os genes *cry* podem ser agrupados em dependentes e não dependentes da esporulação.

2.1.5.1 Genes dependentes da esporulação

As espécies de *Bacillus* produzem no interior da célula uma estrutura denominada de endósporo durante o processo de esporulação (Agaisse & Lereclus, 1995). Vários estudos demonstraram que as proteínas que regulam a esporulação em *B. subtilis* apresentam funções semelhantes em *B. thuringiensis*, incluindo os fatores sigma (σ) (Adams *et al.*, 1991). Em *B. subtilis*, a diferenciação celular é regulada de forma temporal e em nível transcricional, pela ativação de seis fatores sigma que, pela ligação à RNA polimerase, determinam quais promotores específicos serão reconhecidos (Helmann & Chamberlin, 1988). Esses fatores são denominados de: fator σ^A , e cinco fatores (σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K) que são regulados temporalmente durante o processo de esporulação.. Os fatores σ^A e σ^H atuam antes da formação do septo que dá origem a compartimentalização, já os fatores σ^E e σ^K são ativos na célula-mãe e σ^F e σ^G são ativos no compartimento do pré-esporo (Agaisse & Lereclus, 1995).

O gene *cry1Aa* é exemplo típico de genes *cry* dependentes de esporulação que é expresso apenas no compartimento da célula-mãe de *B. thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998). Esse gene começa a ser transcrito a partir de dois sítios de iniciação com sobreposição de atividade (Wong *et al.*, 1983): o BtI, que é ativado no início da esporulação entre t_2 e t_6 (onde t_n indica o número de horas após o início da fase de esporulação) e o BtII, que é ativado a partir de t_5 (Höfte & Whiteley, 1989). Brown & Whiteley (1988, 1990), realizaram experimentos *in vitro* para demonstrar que a transcrição a partir do promotor BtI é iniciada pelo fator σ^{35} , enquanto que a do BtII ocorre a partir do fator σ^{28} . Os genes que codificam os fatores σ^{35} e σ^{28} foram clonados, seqüenciados e as seqüências de aminoácidos apresentaram uma identidade 88% e 85% com os fatores σ^E e σ^K de *B. subtilis*, respectivamente (Adams *et al.*, 1991). Vários promotores de genes *cry* foram identificados e suas seqüências foram determinadas (Schnepf *et al.*, 1998). Os resultados mostram que outros genes tais como *cry1Aa*, *cry1Ba*, *cry2Aa*, *cry4*, *cry11* e *cry15Aa* são considerados dependentes de esporulação.

2.1.5.2 Genes não dependentes de esporulação

O gene *cry3* é um típico exemplo de gene não dependente de esporulação. Esse gene é expresso durante a fase vegetativa, embora também possa ser expresso em baixas concentrações na fase estacionária (Schnepf *et al.*, 1998). O promotor é ativado no final da fase exponencial de crescimento e permanece ativo até t_8 (Agaisse & Lereclus, 1995). Apesar do promotor estar na posição -558 (ponto de início da transcrição), o mesmo assemelha-se a promotores reconhecidos pelo primeiro fator σ^A de célula vegetativa (Agaisse & Lereclus, 1994)

2.1.5.3 Estabilidade do mRNA

A estabilidade do RNA mensageiro dos genes *cry* é outro fator responsável pelos altos níveis de síntese destes genes. Glatron & Rapoport (1972), relataram que a meia-vida dos genes *cry* pode ser em torno de 10 min, sendo pelo menos cinco vezes maior que a meia-vida do mRNA bacteriano em geral. Wong & Chang (1986), identificaram um retro-regulador positivo (contendo seqüências repetidas com orientação invertida – *inverted repeat*) responsável pelo aumento da meia-vida do seu transcrito e, conseqüentemente, aumento da expressão do gene *cry*. Este retro-regulador está localizado na extremidade 3' do mRNA do gene *cry1Aa*. A transcrição dessa região leva a formação de uma estrutura em alça que protege o mensageiro contra degradação por exonucleases com atividade 3'>5'. Seqüências terminadoras similares, potencialmente capazes de formar estrutura em alça, são encontradas *downstream* de vários genes *cry* e podem contribuir para o seu alto nível de expressão pela estabilização do transcrito (Schnepf *et al.*, 1998).

A inserção da região 5' não-traduzida (nucleotídeos -129 a -12) entre o promotor de *B. subtilis* e o gene repórter *lacZ* aumentou cerca de 10 vezes tanto a estabilidade do mRNA fusionado ao *lacZ* como também a síntese de β -galactosidase (Agaisse & Lereclus, 1995; Schnepf *et al.*, 1998). O provável elemento estabilizador é uma seqüência homóloga à seqüência consenso Shine-Dalgarno (SD) e que está presente na extremidade 5' do mRNA de *cry3A*. Essa estabilidade pode ser devida a interações da seqüência SD com a extremidade 3' do RNA ribossomal (rRNA) 16S. A ligação da subunidade ribossomal 30S a seqüência SD pode proteger o mRNA de ribonucleases com atividade 5' > 3'. Seqüências de SD presentes em outros genes da classe *cry3*, *cry3Ba*, *cry3Bb* e *cry3Ca* sugerem que os correspondentes transcritos são estabilizados por mecanismos semelhantes (Agaisse & Lereclus, 1995).

2.1.6 Controle biológico utilizando *B. thuringiensis*

B. thuringiensis é o principal agente do controle biológico de insetos, sendo responsável por aproximadamente 1% do mercado mundial de inseticidas (Navon, 2000). Dentre os bioinseticidas utilizados, *B. thuringiensis* é responsável por aproximadamente 90% do faturamento mundial. A aplicação de *B. thuringiensis* é por volta de 13.000 toneladas por ano, gerando um mercado anual de 60 a 90 milhões de dólares (Hansen & Salamitou, 2000; Gitahy *et al.*, 2006).

Essa bactéria é considerada um agente seguro devido à sua alta especificidade aos insetos-alvo, sendo inócuo aos mamíferos e vertebrados e por não poluir o meio ambiente. Essas características influenciaram no desenvolvimento de uma formulação de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Whiteley & Schnepf, 1986; Vilarinhos *et al.*, 1998). A primeira formulação foi produzida na França em 1938 e desde então mais de 100 formulações já foram colocadas no mercado mundial (Polanczyk & Alves, 2003, Polanczyk, 2004).

O bioinseticida à base de *B. thuringiensis* com maior aplicação é o Dipel®, à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Essa estirpe foi selecionada para a produção do bioinseticida porque apresentou toxicidade até 200 vezes superior às cepas utilizadas nos outros produtos comerciais. O Dipel® é altamente eficiente para mais de 170 lepidópteros-praga, sendo pouco tóxico para insetos das ordens *Coleoptera*, *Diptera* e *Hymenoptera*, e algumas espécies de ácaros (Dulmage, 1970; Beegle & Yamamoto, 1992; Glare & O'Callaghan, 2000).

Devido às vantagens do uso do *B. thuringiensis* como agente de controle biológico, aumentaram nos últimos anos o número de estirpes isoladas e a busca por outras cepas mais tóxicas é crescente no mundo inteiro (Monnerat *et al.*, 2001). A preocupação em criar e manter coleções de *B. thuringiensis* é importante para a

caracterização de novas δ -endotoxinas que sejam eficazes contra diversas ordens de insetos e também contra outros invertebrados, nematóides e protozoários. Estima-se que existam mais de 40.000 isolados de *B. thuringiensis* em coleções espalhadas pelo mundo (Miralles & Pérez, 2004).

Na década de 80, a manipulação genética se tornou uma importante ferramenta molecular no estudo de combinações de proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* em um único produto (Navon, 2000). A capacidade de transferência de genes em *B. thuringiensis* torna possível o uso de proteínas recombinantes com melhores características permitindo melhorar a atividade, o rendimento e a estabilidade, expressando vários genes de toxinas dessa bactéria, gerando novos produtos ativos. As modificações genéticas obtidas em estirpes de *B. thuringiensis* são: cura plasmidial, conjugação, transformação, recombinação e construções de proteínas híbridas (Navon, 2000; Céron, 2004).

Existem vários relatos de que combinações de proteínas exibem uma atividade sinérgica contra pragas aumentando o espectro de ação (Crickmore *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). Um dos exemplos dessa manipulação é o produto Foil[®], da cepa EG2424, que produz as proteínas Cry1Ac e Cry3A exibindo toxicidade para lepidópteros e coleópteros (Gawron-Burke & Baum, 1991.).

Um outro processo que permitiu o controle de insetos-praga foi a inserção de genes *cry* de *B. thuringiensis* em plantas (Adang *et al.*, 1993). Gheysen *et al.* (1987), foram os primeiros a relatar a introdução de genes da δ -endotoxina em plantas de tabaco produzindo grandes quantidades de proteínas para o controle de larvas de *Manduca sexta*. Vários trabalhos demonstram a importância das plantas transgênicas expressando

genes de *B. thuringiensis* como ferramenta no manejo integrado de pragas (Vaeck *et al.*, 1987; Koziel *et al.*, 1993; Pielcher *et al.*, 1997; Kota *et al.*, 1999).

O algodão Bt, ou seja, o algodão geneticamente modificado que contém gene da bactéria *B. thuringiensis* já vem sendo comercializado em todo o mundo. Segundo a Cotton Advisory Board (2008), na Índia houve um aumento de 50% no uso de algodão Bt, reduzindo dessa forma as aplicações de inseticida.

Outra alternativa para o controle biológico, principalmente de pragas de difícil controle, como é o caso da *Diatrea saccharalis*, que se alimenta do tecido interno da planta, é o uso de bactérias endofíticas transgênicas. Salles *et al.*, (2000), relataram a expressão de gene *cry3A* em bactéria diazotrófica (*Gluconoacetobacter diazotrophicus* BR11281 e *Herbaspirillum seropedicae* BR11335) que se mostraram eficientes vetores, sendo capazes de colonizar endofiticamente os tecidos das plantas, permitindo controlar as pragas que se alimentam dos tecidos internos.

A manipulação de genes *cry* oferece uma alternativa para melhorar a sua eficácia e a persistência da proteína no meio ambiente, eliminando certas características indesejáveis dos cristais tais como rápida degradação quando expostos a radiação ultravioleta, instabilidade na água e a incapacidade no controle de insetos que se alimentam do tecido interno da planta (Navon, 2000; Salles *et al.*, 2000).

2.1.7 Proteínas das classes Cry2A e Cry11A

As proteínas Cry codificadas pelos genes do grupo *cry2* têm massa molecular que pode variar de 65 a 71 kDa. Essas proteínas apresentam-se na forma de cristais

cubóides em *B. thuringiensis* (Hofte & Whiteley, 1989). A proteína Cry2A pode ser isolada das subespécies *kurstaki*, *tolworthi*, *kenyae*, *aizawai* e *galleriae* (Sasaki *et al.*, 1997) O gene *cry2A* é formado por cinco subgrupos: *cry2Aa* (Donovan *et al.*, 1989), *cry2Ab* (Widner & Whiteley, 1989), *cry2Ac* (Wu *et al.*, 1991), *cry2Ad* (Choi *et al.*, 1999) e *cry2Ae* (Baum *et al.*, 2003).

As proteínas do grupo Cry2 são naturalmente truncadas e não apresentam as características do domínio conservado C-terminal, que é encontrado nas proteínas de 130-140 kDa. Uma vez que a região C-terminal está associada à formação do cristal, vários estudos sugerem que essa proteína necessite de proteínas auxiliares para a formação do cristal (Crickmore *et al.*, 1994; Staples *et al.*, 2001).

Enquanto a maioria dos genes *cry* está organizada como unidades monocistrônicas, os genes *cry2Aa* e *cry11A* apresentam-se na forma de operon (Baum & Malvar, 1995). No operon do gene *cry2Aa*, encontram-se mais duas fases abertas de leitura (ORF, do inglês: "open reading frame"), *orf1* e *orf2*. Sabe-se que a proteína codificada pela *orf2* pode atuar auxiliando na cristalização da proteína Cry2Aa (Crickmore & Ellar, 1992; Crickmore *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1997; Staples *et al.*, 2001). A deleção do gene *orf2* ocasiona reduções drásticas na produção de Cry2Aa em *B. thuringiensis* (Baum & Malvar, 1995).

A proteína Cry2Aa tem atividade tóxica para *Lepidoptera* (*Helicoverpa armigera*, *Heliothis virescens*, *Lymantria dispar*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua* e *Trichoplusia ni*) e *Diptera* (*Culex quinquefasciatus*), enquanto as proteínas Cry2Ab e Cry2Ac são tóxicas apenas contra *Lepidoptera* (Donovan *et al.*, 1988; Moar *et al.*, 1994; Bravo, 2004).

O gene *cry11A* codifica uma proteína com massa molecular entre 65 e 72 kDa e está localizado em um plasmídeo de 72 MDa presente em *B. thuringiensis* subsp.

israelensis (Donovan *et al.*, 1988; Höfte & Whiteley, 1989; Krieger *et al.*, 1999). A toxina é altamente tóxica para insetos da ordem *Diptera* (*Aedes*, *Culex* e *Anopheles*) (Hughes *et al.*, 2005). Yamagiwa *et al.* (2004), verificaram que a pró-toxina Cry11A, de aproximadamente 70 kDa, é processada em dois fragmentos 34 e 32 kDa por proteases do intestino da larva. Os autores sugerem que a forma ativa da toxina é um heterodímero que consiste de dois fragmentos Cry11A essenciais para determinar a atividade inseticida. Acreditam ainda, que a remoção de nove aminoácidos da região N-terminal é uma etapa importante para a ativação da proteína (Bravo *et al.*, 2007).

A proteína Cry11A, a exemplo do que ocorre com Cry2Aa, também necessita de algumas proteínas acessórias que ajudem no processo de cristalização. As proteínas P19 (19 kDa) e P20 (20 kDa), duas proteínas acessórias encontradas em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*), são codificadas pelo operon do gene *cry11A*, e proporcionam uma maior eficiência na produção de Cry11A (Agaisse & Lereclus, 1995, Wu & Federici, 1995; Shao & Yu, 2004). P20 foi inicialmente descoberta durante um estudo de expressão do gene *cyt1A*, mostrando ser eficiente para a produção de Cyt1A (Adams *et al.*, 1989, Visick & Whiteley, 1991). Acredita-se que ela atua como uma possível chaperona molecular durante a expressão dessas proteínas (Shao *et al.*, 2001).

2.2 Baculovírus

Baculovírus são vírus específicos de artrópodes encontrados em vários ambientes e têm sido isolados principalmente de insetos hospedeiros incluindo as ordens *Lepidoptera*, *Hymenoptera* e *Diptera* (Ribeiro *et al.*, 1998; Adams & McClintock, 1991; Castro *et al.*, 1999; Jehle *et al.*, 2006a; b). Eles são vírus de DNA com o genoma circular, dupla fita, *supercoiled* contendo entre 80 e 200 kpb, os nucleocapsídeos encontram-se na forma de bastões, por isso o nome baculovírus é uma

referência à forma do nucleocapsídeo (Arif, 1986). Até o momento, os genomas de 29 espécies de baculovírus foram seqüenciados gerando um banco de dados com mais de 4.000 genes (Slack & Arif, 2007).

Os baculovírus pertencem à família Baculoviridae e taxonomicamente são subdivididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Uma das características que diferencia esses gêneros é a composição protéica e estrutura dos seus corpos de oclusão. O corpo de oclusão do baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* é denominado de poliedro constituído principalmente da proteína poliedrina, enquanto que o do gênero *Granulovirus* é conhecido como grânulo e é composto pela proteína granulina (Ribeiro *et al.*, 1998) (Figura 5).

Esses vírus têm um grande potencial como agentes do controle biológico de insetos-praga. Apresentam algumas vantagens como uma alta especificidade a uma ou poucas espécies relacionadas e por apresentar-se na forma de corpos de oclusão protéicos que permite a formulação de biopesticidas de fácil aplicação, representando um agente seguro em relação aos inseticidas químicos (Castro *et al.*, 1999).

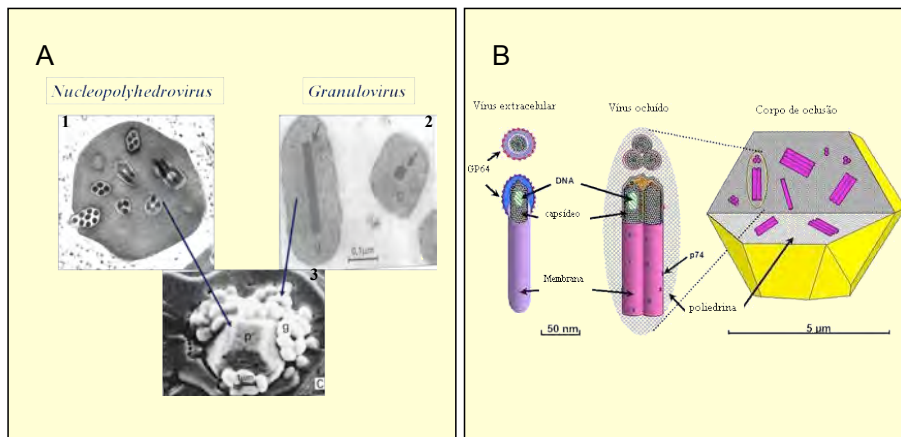


Figura 5 – Estrutura do corpo de oclusão de baculovírus. (A) Microscopia eletrônica de transmissão (1 e 2) e varredura (3) dos corpos de oclusão dos gêneros *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus* denominados de poliedros e grânulos, respectivamente (Adaptação de Ribeiro *et al.*, 1998); (B) Representação esquemática da organização do poliedro mostrando os diferentes fenótipos do baculovírus, o vírus extracelular ou BV (*budded virus*) e o vírus ocluído ou ODV (occlusion-derived virus) que está inserido no corpo de oclusão (Adaptação do site www.answers.com/topic/baculovirus).

2.2.1 Mecanismo de infecção *in vivo*

A infecção inicia quando o inseto ingere os vírus na sua forma ocluída (OBs - poliedros ou grânulos) que estão presentes no meio ambiente. O pH altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) presente no intestino do inseto ajuda a dissolver os OBs e as partículas virais são liberadas. Essas partículas penetram por fusão de membrana nas células epiteliais do intestino médio do inseto dando início a infecção (Horton & Burand, 1993; Ribeiro *et al.*, 1998). Essa etapa da infecção é conhecida como infecção primária e a partir da replicação viral e saída de novas partículas virais é estabelecida a infecção secundária que vai disseminar os vírus para outros tecidos (Volkman *et al.*, 1990).

Quando o vírus entra na célula, os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo, onde perdem sua capa protéica e liberam o DNA viral. Após a entrada no núcleo, o DNA viral é replicado, apresentando uma nova progênie de nucleocapsídeos em 8 h.

Nesta fase, pode-se observar núcleo hipertrofiado e formação do estroma virogênico. Os nucleocapsídeos atravessam a membrana nuclear e são então transportados para a região basolateral das células do intestino médio sendo liberados para infectar tanto células da traquéia quanto hemolinfa (Engelhard *et al.*, 1994). Uma outra rota de infecção sistêmica, ocorre a partir da passagem direta das partículas virais pelas células do epitélio intestinal e a infecção das células da traquéia e hemolinfa (Engelhard *et al.*, 1994; Barret *et al.*, 1998).

As células infectadas produzem entre 12 e 24 h após a infecção (p.i), um fenótipo chamado de vírus extracelular ou "budded virus" (BV). Estes BVs brotam da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular, sendo envelopados individualmente. Um segundo fenótipo, os ODVs (do inglês, "occluded derived-virus"), é produzido mais tarde no núcleo e permanecem até a morte celular por volta de 72 h.p.i. Estes ODVs estão oclusos nos corpos de oclusão (OBs) e adquirem o envelope viral pela síntese *de novo* no núcleo da célula infectada (Granados & Williams, 1986; Federici, 1997). Os BVs produzidos são responsáveis por propagar a infecção de célula à célula e disseminar a infecção nos tecidos do inseto enquanto que os OBs, contendo os ODVs, logo após a morte do inseto, serão liberados no meio ambiente propagando a infecção para outros insetos (Ribeiro *et al.*, 1998) (Figura 6).

A infecção em insetos da ordem Lepidoptera geralmente se espalha rapidamente para outros tecidos a partir do sistema traqueal, levando a morte do inseto em poucos dias. (Engelhard *et al.*, 1994, Ribeiro *et al.*, 1998).

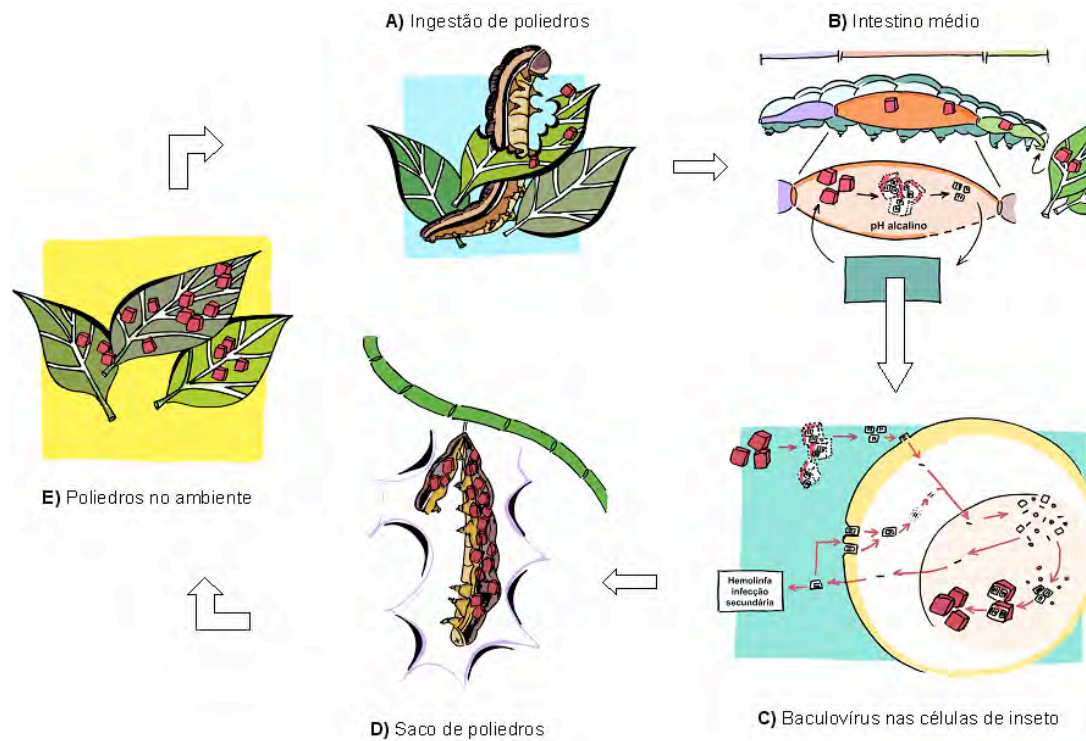


Figura 6 – Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de um lepidóptero infectado com baculovírus. (A) Ingestão de poliedros pela larva do inseto e, após ingestão, estes seguem pelo trato digestivo; (B) dissolução pelo pH no intestino do inseto e liberação das partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (infecção primária) e, em seguida, partir para outros tipos celulares, permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (infecção secundária). (C) A infecção se espalha causando a morte da larva; (D) e ela se torna um “saco” de poliedros que, quando se rompe, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras larvas (E) (Barros, 2007).

2.2.2 Baculovírus como vetor de expressão

Nos últimos 25 anos, os baculovírus vêm sendo bastante utilizados como vetores de expressão para a produção de proteínas heterólogas em células de insetos (Smith *et al.*, 1983a; Luckow & Summers, 1988; O'Reilly *et al.*, 1992).

O protótipo dos baculovírus é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), isolado da lagarta *A. californica*. Este vírus pode ser propagado facilmente em várias linhagens celulares derivadas de diferentes insetos, como por exemplo, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (Possee, 1997).

O sistema de expressão utilizando o baculovírus baseia-se na introdução do gene exógeno no genoma de um baculovírus no local de um gene que não é essencial para a replicação. Essa expressão geralmente é dirigida por um promotor forte (por exemplo, o promotor do gene da poliedrina, *polh*). Ao inativar o gene *polh*, seja por deleção ou inserção de uma seqüência de DNA, o vírus produzido será capaz de se replicar normalmente em células de inseto, contudo não haverá mais a formação da forma ocluída (OB ou poliedro), já que a poliedrina é a principal proteína do OB e é codificada por um gene não-essencial. As células infectadas pelo vírus, que não produz OB, são facilmente localizadas por microscopia óptica, pela ausência de OB intracelular característicos dos vírus normais. A expressão do gene da poliedrina é conduzida a partir de um promotor forte, por volta de 70 h após a infecção (p.i), produzindo uma quantidade de poliedrina equivalente a 20-50% de toda a proteína produzida na célula infectada. Por isso, o modelo mais simples de vetores para o sistema de expressão é a troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo de interesse sob o controle do promotor da poliedrina (Miller *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1983 a, b).

A tecnologia para a construção de baculovírus vetores é feita com base em plasmídeos de transferência, inserindo uma seqüência que codifica a proteína de

interesse dentro do vetor de transferência (Miller *et al.*, 1983; Jarvis, 1997). Esta construção pode ser feita por recombinação homóloga ou por transposição *in vivo*.

Para construir um baculovírus recombinante por recombinação homóloga é necessário um vetor de transferência que tenha um sítio de clonagem no qual será introduzido o gene exógeno sob o comando de um promotor forte. Este cassete é flanqueado por regiões homólogas às seqüências do genoma viral onde ocorrerá a recombinação. Após a inserção do gene de interesse no vetor plasmidial, esse é introduzido em células de inseto juntamente com o DNA viral, e através da recombinação homóloga entre as seqüências virais no vetor e no DNA viral, ocorre a troca entre o gene viral não-essencial e o gene de interesse presente no vetor. A frequência de recombinantes é de aproximadamente 0,1% a 1% e a progênie é selecionada por diluição seriada em placas de 96 poços ou ensaios em placa (do inglês, "plaque assay"), os quais podem levar de 4 a 6 semanas. O clone recombinante é identificado por microscopia óptica através do fenótipo distinto (ausência de OB) nas células infectadas (O'Reilly *et al.*, 1992; Luckow *et al.*, 1993).

Esforços para eliminar a necessidade de seleção por diluição em placa do vírus recombinante principalmente por causa do tempo para escolha dos clones, foi desenvolvida uma metodologia por transposição *in vivo* (Luckow *et al.*, 1993, Kost *et al.*, 2005). Este método envolve a transposição sítio específica de um gene exógeno de um plasmídeo doador para o genoma do baculovírus (bacmid), controlado pelo promotor da poliedrina, e propagado em células de *Escherichia coli* DH10BacTM (Invitrogen) (Luckow *et al.*, 1993). Este método utiliza um vetor de transferência pFastbacTM 1 (Invitrogen) e as células hospedeiras *Escherichia coli* DH10BacTM possuem o genoma do baculovírus e um plasmídeo "helper" confere resistência a tetracilina e codifica uma transposase bacteriana que reconhece as seqüências repetidas

invertidas, que flanqueiam o gene exógeno, presentes no pFastbacTM 1. Dessa forma, ocorre a transposição do cassete de expressão do gene heterólogo para o bacmid dentro do gene marcador *lacZ*, interrompendo a seqüência codificadora da β -galactosidase, facilitando a seleção dos clones com extração subsequente do DNA viral para realizar a transfecção em células de inseto. Esse sistema é comercializado como kit Bac-to-Bac[®] pela empresa Invitrogen (Luckow *et al.*, 1993) (Figura 7).

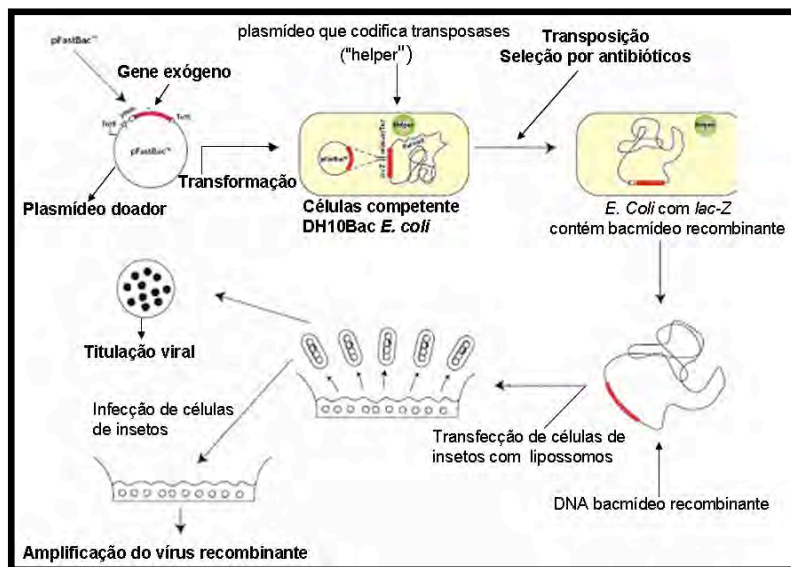


Figura 7 – Representação esquemática da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição *in vivo* (Adaptação do Kit Bac-to-Bac[®] Baculovírus Expression System).

A alta especificidade dos baculovírus representa uma grande vantagem para utilização dos mesmos como vetores de expressão, uma vez que não causam danos ao homem. Outra característica importante é a inserção de genes de interesse no genoma do baculovírus sob o comando de promotores fortes que ajudam na expressão elevada das proteínas heterólogas, podendo co-expressar dois genes ou mais. Além disso, é

considerado um sistema de fácil manipulação quando comparado a outros vetores de expressão (Castro *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998; Kost *et al.*, 2005).

Com a finalidade de tentar aumentar a velocidade de ação bem como a patogenicidade viral para larvas de insetos vários grupos têm inserido no genoma do baculovírus genes *cry* na forma intacta, truncada ou fusionada à poliedrina, principal proteína produzida pelo baculovírus (Merryweather *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993, 1998; Martens *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003; Martins, 2005, 2008; Aguiar, 2006, 2007; Corrêa, 2007). O uso de baculovírus como vetor de expressão permite estudar proteínas Cry isoladamente, ou em associação com outras proteínas, podendo contribuir para o desenvolvimento de bioinseticidas mais potentes e menos suscetíveis ao aparecimento de resistência nos insetos-alvo.

3. Objetivos:

3.1 Geral

Estudar a expressão de toxinas Cry em células de inseto utilizando o baculovírus como vetor de expressão, além de avaliar a toxicidade das proteínas heterólogas contra larvas de *Lepidoptera* e *Diptera*.

3.2 Específicos

- Amplificar por reação de polimerase em cadeia (PCR) os genes *cry2Aa* e *cry11A* de cepas de *B. thuringiensis*, clonar no vetor p-GEM- T Easy e sequenciar;
- Clonar os genes de interesse no vetor de transferência;
- Construir os baculovírus recombinantes vAcCry2Aa e vAcCry11A;
- Analisar a expressão das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A por SDS-PAGE;
- Avaliar a influência das proteínas acessórias (ORF2 e P20) na expressão das proteínas Cry2Aa e Cry11A por SDS-PAGE;
- Analisar a morfologia dos cristais das proteínas Cry2Aa e Cry11A por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a atividade tóxica das proteínas Cry2Aa e Cry11A para larvas de *Lepidoptera* e *Diptera*, respectivamente.

4. Material e Métodos

4.1 Células e vírus

Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (Granados *et al.*, 1994) e *S. frugiperda* (IPLB-Sf21-AE, Vaughn *et al.*, 1977), foram mantidas a 27 °C em meio TC100 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL) e serviram de hospedeiras para replicação do vírus selvagem AcMNPV e dos vírus recombinantes vAcCry2Aa e vAcCry11A (deste trabalho).

As estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447 e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* S1806 pertencentes ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram utilizadas como fonte dos genes *cry2Aa* e *cry11A*, respectivamente.

Células de *E. coli* DH5- α TM (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho: pGemcry2Aa, pGemcry11A, pFastcry2Aa, pFastcry11A.

Células de *E. coli* DH10Bac (Invitrogen) foram utilizadas para a construção dos baculovírus recombinantes.

4.2 Extração DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina conforme descrito por Sambrook *et al.*(1989). Brevemente, duas culturas de cada estirpe S447 e S1806 de *B. thuringiensis* foram crescidas em 5 mL de meio LB (NaCl 10 g/L, Peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L), sob agitação de 200 rpm a 28 °C. As células foram centrifugadas a 6.000 rpm em uma microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, por 10 min, a 4 °C e cada precipitado foi ressuspenso em 300 μ L da solução TES (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, sacarose 20%) contendo 4 mg/mL de lisozima (preparada

na hora do uso) e incubado a 37 °C por 1 h para obtenção de 10 a 50% de protoplasto. A formação dessas estruturas foi monitorada por microscopia óptica. Após esse tempo, foram adicionados 200 µL da solução de NaOH 0,2M/SDS 0,1%. As amostras foram homogeneizadas gentilmente e mantidas à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 200 µL de acetato de potássio 5 M, pH 5,5, e as amostras homogeneizadas e mantidas no gelo por 15 min. Após a centrifugação, a 10.000 rpm em uma microcentrifuga Eppendorf, modelo 5415C, por 20 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 0,6 V de isopropanol, sendo a mistura incubada por 1 h a -20 °C. Em seguida, foi novamente centrifugado a 10.000 rpm em uma microcentrifuga Eppendorf, modelo 5415C, por 20 min, o “pellet” lavado com etanol 70% e seco a temperatura ambiente até completa evaporação do etanol. O precipitado foi ressuspendido em 70 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH8.0; EDTA 1mM).

4.3 Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos genes *cry2Aa* e *cry11A*.

Os genes *cry2Aa* e *cry11A* obtidos das cepas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447 e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* S1806, respectivamente, foram amplificados por reação de PCR utilizando 50 ng DNA plasmidial, 1X tampão, 1U Taq DNA polimerase (Phoentria), 0,4 mM MgCl₂, 0,4 µM dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (*cry2Aa*Forward, *cry2Aa*Reverse, *cry11A*Forward e *cry11A*Reverse) (Tabela 2), contendo no início da sua seqüência o sítio da enzima de restrição *Bam*HI, para um volume total de 25 µL. As etapas de amplificação foram 1 ciclo a 95°C/2 min, 31 ciclos 95°C/1 min, 52°C/1min e 30s, 72°C/1 min; 1 ciclo 72°C/1min. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGem®-T easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A ligação foi utilizada para transformar a bactéria *E. coli* DH5α (Invitrogen) e o DNA dos plasmídeos recombinantes pGemcry2Aa e pGemcry11A foram

purificados utilizando o kit de purificação de DNA Wizard®Plus SV minipreps (Promega) e seqüenciados no aparelho 377-Applied Biosystem na plataforma de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília com oligonucleotídeos universais (SP6 e T7) que se anelam nas regiões flanqueadoras do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pGem-T easy (Promega). Os oligonucleotídeos utilizados para completar o sequenciamento dos genes *cry* foram obtidos a partir de oligonucleotídeos desenhados para as regiões internas dos genes (Tabela 2). A análise da seqüência foi feita utilizando-se os programas BLAST e ORF finder, disponíveis no site www.ncbi.nlm.nih.gov.

Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Seqüência (5'>3')	Utilidade
cry2AaForward	GGGATCCATGAATAATGTATTGAATAGTGAAG	PCR/Seqüenciamento
cry2AaReverse	GGGATCCTTAATAAAGTGGTGAAGATTAGTTGGC	PCR/Seqüenciamento
cry2Aa408F	CCCTACTCAAAACCCTGTTC	Seqüenciamento
cry2Aa1449R	GTACCATTTTCATTAG	Seqüenciamento
cry2AaintFw	GAATATGGTATCCATTTGGTC	RT-PCR/Seqüenciamento
cry2AaintRev	ATTCGTAGAGGTAGCAACGCC	Seqüenciamento
cry11AForward	CAGGATCCATGAATTATATGGAAGAT	PCR/Seqüenciamento
cry11AReverse	CAGGATCCCTACTTTAGTAACGGATT	PCR/Seqüenciamento
cry11AintFow	CGGAATCCTAGCAGGGAGTGCAT	RT-PCR/Seqüenciamento
cry11AintRev	GCAGAGCAGGAATTACATAACTATC	Seqüenciamento
cry11AF890	TTCACAAATGAACCAGCTGA	Seqüenciamento
cry11AR1763	ACCCATTCTGGATTAGCATT	Seqüenciamento
SP6	GTAAAACGACGGCCAGT	Seqüenciamento
T7	GGAAACAGCTATGACCATG	Seqüenciamento
T1	CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Síntese cDNA
T2	CCTGCAGGATCCTTAGGTT	Síntese cDNA/RT-PCR

4.4 Construção dos vetores de transferência

Um µg de cada um dos plasmídeos pGemcry2Aa e pGemcry11A foi digerido com 1 U da enzima de restrição *Bam*HI (Promega) de acordo com instruções do fabricante, em seguida, os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos correspondentes aos genes *cry* foram eluídos e purificados do gel usando kit Purelink gel extraction (Invitrogen). Os genes *cry2Aa* e *cry11A* foram clonados no vetor de transferência pFastbac1® (Invitrogen), digerido previamente com *Bam*HI, conforme instruções do fabricante, dando origem aos plasmídeos pFastcry2Aa e pFastcry11A. Para confirmar a orientação correta dos genes foram realizados ensaios de restrição enzimática com os novos plasmídeos pFastcry2Aa e pFastcry11A utilizando as enzimas *Bgl*III e *Eco*RI (Promega), respectivamente.

4.5 Construção e isolamento dos vírus recombinantes

Um µg de cada um dos plasmídeos recombinantes pFastcry2Aa, pFastcry11A foi transformado em *E.coli DH10Bac*TM (Invitrogen) por choque térmico, seguindo as instruções do kit Bac-to-Bac (Invitrogen). Dentro da bactéria ocorre transposição sítio-específica da região contendo o gene de interesse sob o comando do promotor da poliedrina para o locus do gene da poliedrina que possui o sítio de inserção. As células foram incubadas em placa de Petri contendo tetraciclina (10 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), IPTG (40 µg/mL) e X-gal (100 µg/mL) a 37°C por 48 h e os clones positivos selecionados por apresentarem coloração branca devido à interrupção do gene *lac Z* pelo gene *cry2Aa* ou *cry11A*. Colônias brancas contendo o possível bacmídeo recombinante foram isoladas, amplificadas e o DNA extraído, seguindo as instruções do kit bac-to-bac (Invitrogen). A confirmação da inserção dos cassetes gênicos no genoma do bacmídeo foi feita por PCR com oligonucleotídeos

específicos (*cry2AaForward*, *cry2AaReverse*, *cry11AForward* e *cry11ARreverse*), conforme instruções do kit Bac-to-Bac (Invitrogen). Um µg de DNA dos bacmídeos foi diluído em 500 µL de meio de cultura TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm. A mesma diluição foi realizada com 10 µL de lipofectina (Cellfectin[®], Invitrogen). As diluições foram misturadas e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das placas de células de BTI-Tn5B1-4 foi, posteriormente, substituído por um mililitro 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 à 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. Após este tempo, os sobrenadantes das placas foram utilizados para amplificar os vírus em novas placas de 100 mm contendo, em cada uma, células BTI- Tn5B1-4 (5×10^6 células). A infecção das células foi observada por microscopia de luz invertida (Axiovert 100, Zeiss). O DNA de ambos os vírus foi purificado (O' Reilly *et al.*, 1992) e utilizado em uma reação de PCR para confirmar a presença dos genes heterólogos usando oligonucleotídeos específicos (para o gene *cry2Aa* foram utilizados os primers *cry2AaForward* e *cry2AaReverse* e para o gene *cry11A* os primers *cry11AForward* e *cry11ARreverse*, citados anteriormente na tabela 2).

4.6 Análise transcricional dos genes *cry* expressos em células de inseto

A extração do RNA total foi realizada a partir de 5×10^6 células BTI-Tn5B1-4 infectadas com 10 pfu/célula dos vírus recombinantes vAcCry2Aa e vAcCry11A. A extração foi realizada 72 h.p.i utilizando o reagente Trizol[®], seguindo instruções do fabricante (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado usando um primer específico T1 (5'- CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3') na concentração de 0,4

μM e o kit M-MLV-RT (Invitrogen), seguindo as instruções do fornecedor. Em seguida, foi feita uma reação de PCR para amplificar o cDNA correspondente aos mRNAs dos genes estudados, utilizando os $10 \mu\text{M}$ dos primers específicos para o gene *cry2Aa* (*cry2AaintFw* 5'-GAATATGGTATCCATTTGGTC - 3') e o primer reverso T2 (5'-CCTGCAGGATCCTTAGGTT - 3'). O primer *cry2AaintFw* anela entre os nucleotídeos 762 a 783 depois do códon de iniciação do gene *cry2Aa* e *cry11AintForward* do 507 ao 529 do gene *cry11A*, enquanto a seqüência T2 é idêntica aos 19 nucleotídeos do primer T1 (Rodrigues *et al.*, 2001). Foram adicionados à reação, 10 mM de dNTP, $0,4 \mu\text{M}$ de MgCl_2 , 1U da enzima Taq DNA polimerase (Phonetrutria) e tampão 1X da enzima. As etapas de amplificação foram 1 ciclo a $95^\circ\text{C}/2 \text{ min}$, 31 ciclos $95^\circ\text{C}/1 \text{ min}$, $51^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ e 30s, $72^\circ\text{C}/1 \text{ min}$; 1 ciclo $72^\circ\text{C}/1 \text{ min}$. Os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes aos genes estudados foram eluídas do gel utilizando o kit Purelink gel extraction (Invitrogen). A confirmação dos resultados foi feita por uma outra reação de PCR utilizando as mesmas condições citadas anteriormente.

4.7 Análise da expressão das proteínas heterólogas em cultura de células e em lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*

Células BTI-Tn5B1-4 (5×10^6 células) foram infectadas com 10 pfu/célula dos vírus recombinantes e observadas por microscopia ótica ao longo da infecção até 120 h p.i. Após esse período, os sedimentos foram coletados por centrifugação a 4.000 rpm em um centrífuga Beckman – modelo J2MI, rotor JA-14, por 10 min e ressuspensos em $100 \mu\text{L}$ de 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) e armazenados a -80°C .

Trezentas larvas (para cada vírus) de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas com uma injeção de 15 µl do estoque viral (10^8 pfu/mL AcMNPV, vAcCry2Aa e vAcCry11A). A 120 h p.i., as lagartas foram coletadas e maceradas em um mililitro de água para cada 10 larvas. Os homogeneizados foram filtrados em lã de vidro e centrifugados a 7.000 rpm (centrifuga Beckman – modelo J2MI, rotor JA-14) por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi descartado, os sedimentos foram ressuspensos em solução contendo 0.5% de SDS e novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os “pellets” ressuspensos em solução contendo 0.5 M de NaCl e centrifugado a 7.000 rpm (centrifuga Beckman – modelo J2MI, rotor JA-14) por 10 min. Os “pellets” foram ressuspensos em solução contendo 100 mM de EDTA, 40 mM de EGTA e 1 mM de PMSF. 10 µL das amostras foram misturadas ao tampão de amostra 2X (50% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 20% glicerol, 125 mM Tris-HCl pH 6.7, 0.002% azul de bromofenol) em seguida incubadas a 100 °C por 5 min. Posteriormente, as amostras foram analisadas em gel de SDS-PAGE a 12% (Mini-Protean II, Bio-Rad)(Laemmli, 1970) e a quantificação da proteína foi realizada pelo programa Image Phoretix 2D (Pharmacia) pertencente ao Laboratório de Bioquímica da Universidade de Brasília. As amostras dos extratos das larvas foram armazenadas a -80 °C.

4.8 Análise da interação entre as proteínas Cry2Aa e Cry11A com as proteínas acessórias ORF2 e P20.

Para determinar a interação entre as proteínas Cry com as proteínas acessórias foram utilizados os vírus recombinantes vAcORF2 e vAcP20 (construídos pelo sistema bac-to-bac e gentilmente cedidos por Raimundo Wagner de Souza Aguiar). Esses vírus foram utilizados para infectar 10^6 células IPLB-Sf21-AE, juntamente com os vírus vAcCry2Aa e vAcCry11A (10 pfu/célula de cada vírus). Foram infectadas placas com

os vírus vAcCry2Aa, vAcCry2Aa+vAcORF2, vAcCry2Aa+vAcP20, vAcCry2Aa+vAcORF2 + vAcP20, outras duas placas com os vírus vAcCry11A e vAcCry11A+vAcP20, respectivamente. As placas foram incubadas a 27°C e as células coletadas a 96 h.p.i. foram centrifugadas a 4.000 rpm (Beckman – modelo J2MI, rotor JA-14) por 10 min e ressuspensos em 300 µL de PBS. 15 µL de cada amostra foram analisados em SDS-PAGE 12% (Mini-Protean II, Bio-Rad)(Laemmli, 1970) e a concentração da proteína total de cada amostra foi determinada pelo kit de Bradford (Biorad-Laboratories).

Em seguida, outra análise foi realizada por SDS-PAGE 10% utilizando 30 µg de cada amostra para avaliar se houve aumento da expressão das proteínas Cry2Aa e Cry11A quando associadas com as proteínas acessórias.

4.9 Bioensaios

Para se determinar a concentração letal necessária para matar 50% (CL₅₀) das larvas, foram realizados bioensaios para larvas de segundo instar de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* adicionando diferentes concentrações da proteína heteróloga Cry2Aa (30, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL). A proteína heteróloga Cry11A por apresentar atividade conhecida para dípteros foi testada apenas para larvas de segundo instar de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* com as concentrações 300, 240, 190, 150, 90, 60 e 30 ng/mL. Para ambas as proteínas, foram utilizadas três repetições de cada dose e um controle negativo sem adição da proteína.

Os testes para larvas de lepidópteros foram realizados distribuindo 35 µL de cada uma das concentrações da proteína sobre a dieta em 24 poços de placas de cultivo de célula. A proteína foi absorvida pela dieta e em seguida uma larva de segundo instar foi colocada em cada poço. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação fotofase 14/10 h. A primeira leitura foi efetuada com 48 h após o início do ensaio e as lagartas

Acer 10/3/09 10:24

Comment: Já foi citado anteriormente por isso, a Joseilde fala que não há necessidade de colocar novamente a formulação.

foram transferidas para copos de plástico de 50 mL, contendo a dieta sem a proteína, e realizada a primeira leitura. A 120 h após a troca, foi realizada a última leitura (Monnerat *et al.*, 2001; Silva-Werneck & Monnerat, 2001). Os ensaios foram estimados pela análise de probit (Finney, 1991) e a CL_{50} foi determinada. Foram utilizadas como controle positivo, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 diluídas (10^{-1} a 10^{-10}), partindo da dose de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Os bioensaios realizados com larvas de segundo instar de *A. aegypti* foram realizados utilizando as proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A. Cada dose foi aplicada em um copo de plásticos de 200 mL contendo 100 mL de água e 25 larvas do mosquito. Os experimentos foram mantidos em câmara de incubação fotofase 14/10 h. A leitura foi realizada com 24 h e os dados coletados foram analisados pela análise de probit para determinar a CL_{50} . Foram utilizadas como controle positivo, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) IPS82 nas concentrações 10, 8, 6, 4, 2, 1 e 0.5 ng/mL.

4.10 Análise estrutural e ultraestrutural das possíveis proteínas Cry2Aa

4.10.1 Microscopia eletrônica de Varredura

A análise microscópica foi feita com a proteína heteróloga Cry2Aa. O extrato de lagartas infectadas com o vírus vAcCry2Aa foi obtido conforme descrito no item 4.7. A amostra foi aplicada em um gradiente de sacarose contendo soluções de 84%, 79%, 72% e 67% em seguida foi submetida à centrifugação por 1 h a 24.000 rpm (centrífuga Beckman – modelo J2MI, rotor JA-14). As duas bandas superiores correspondentes à proteína Cry2Aa foram coletadas e lavadas com Triton X-100 a 1% (Sigma). Três centrifugações foram realizadas, sendo as amostras ressuspensas em solução de Triton

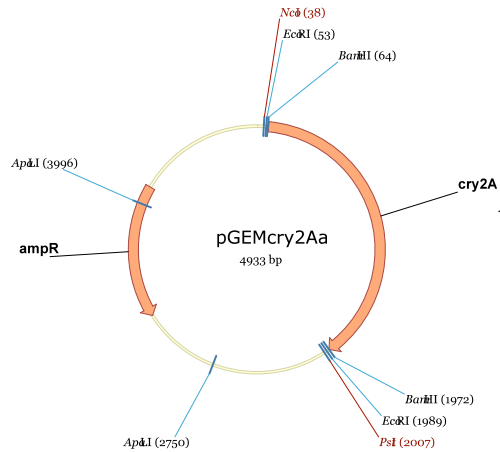
X-100 a 1% previamente às centrifugações. Os cristais foram lavados duas vezes com PMSF a 1 mM (Bravo *et al.*, 2001). 100 µL da amostra foram centrifugados a 10.000 rpm (centrífuga Eppendorf- modelo 5415C) por 1 min, o sedimento aplicado sobre suportes metálicos e cobertos com ouro por 180 s (metalizador Emitech modelo K550). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM962 a 10-Kv.

5 - Resultados

5.1 Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos genes *cry2Aa* e *cry11A*

Neste trabalho, foram amplificados, por PCR, fragmentos de DNA com aproximadamente 1.900 pb correspondentes aos genes *cry2Aa*, da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447, e *cry11A*, da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* S1806, pertencentes ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os mesmos foram clonados no vetor pGem®-T easy, gerando os plasmídeos pGemcry2Aa (4.933 pb) e pGemcry11A (4.974 pb) (Figura 8). A confirmação da clonagem foi feita por restrição enzimática com a enzima *Bam*HI (Figura 9). A análise do sequenciamento revelou que os genes *cry2Aa* e *cry11A* possuem ORFs de 1.902 pb e 1.947 pb, respectivamente, codificando possíveis proteínas de 633 e 646 aminoácidos. A análise de BLAST das seqüências de nucleotídeos do gene *cry2Aa*, da cepa brasileira de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447, mostrou que este gene é praticamente idêntico ao gene *cry2Aa* descrito por Donovan *et al.* (1989) (Genebank = M31738), possuindo apenas uma base nucleotídica diferente na posição 576 (mudança de t para c) (Figura 10). Entretanto, essa diferença não modificou o códon para o aminoácido 192 (isoleucina, att para atc). O mesmo foi observado para o gene *cry11A*, possuindo 100% de identidade com o gene *cry11A* descrito por Berry *et al.* (2002) (Genebank = AL731825). (Figura 11).

A



B

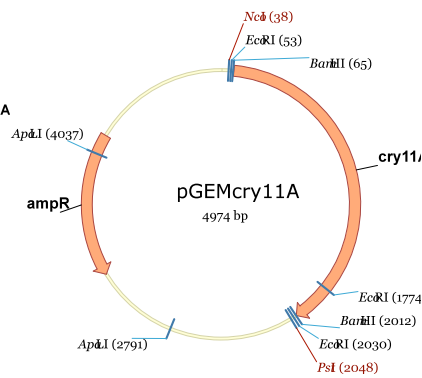


Figura 8 – Mapa dos plasmídeos (A) pGemcry2Aa e (B) pGemcry11A. Os sítios de algumas enzimas de restrição são mostrados na figura. ampR representa o gene da beta-lactamase, que confere resistência à ampicilina. A posição e direção dos genes *cry2Aa* e *cry11A* estão indicadas na figura. Mapas construídos com o auxílio do programa Vector NTI da companhia Invitrogen.

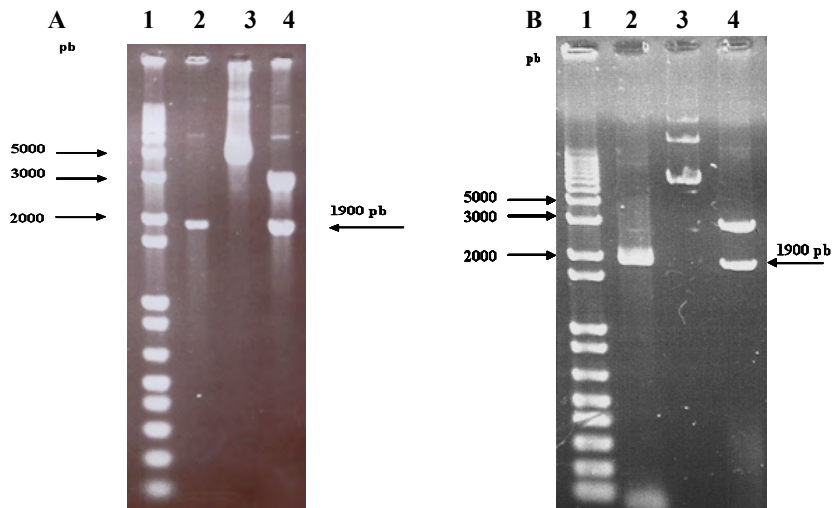


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de fragmentos de DNA contendo os genes *cry2Aa* (A) e *cry11A* (B). Gel A Poço 1- 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), 2- produto de amplificação por PCR do gene *cry2Aa* de *Btk* S447, 3- DNA do plasmídeo pGemcry2Aa intacto, 4- fragmentos de DNA derivados da digestão do pGemcry2Aa com *Bam*HI; Gel B Poço 1- 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), 2- produto de amplificação do gene *cry11A* de *Bti* S1806, 3- plasmídeo pGemcry11A intacto, 4- digestão do pGemcry11A com *Bam*HI.

cry2AaForward

1 atgaataatgtattgaatagtggaagaacaactatttggatgctgataatgtagtagccatgatccatttagttttgaacataaatcattagataccatccaaaagaatggatggag
M N N V L N S G R T T I C D A Y N V V A H D P F S F E H K S L D T I Q K E W M E

121 tggaaaagaacagatcatagtttatgtagctcctgtagtcggaactgtgtctagtttttgcctaaagaaagtgggagtccttattggaaaaggatattgagtgaaattatgggggata
W K R T D H S L Y V A P V V G T V S S F L L K K V G S L I G K R I L S E L W G I

241 atatttctagtggtagtagacaatcctaatgcaagatattttaaaggtagacagaacaattcctaatacaagacttaatacagatacccttgctcgtgtaaatgcagaattgatagggtcc
I F P S G S T N L M Q D I L R E T E Q F L N Q R L N T D T L A R V N A E L I G L

Cry2A408F

360 caagcgaataataaggagtttaatacaacaagtagataattttttaaacctactcaaaaccctgttcctttatcaataacttcttcggttaatacaatgcagcaattatttctaaataga
Q A N I R E F N Q Q V D N F L N P T Q N P V P L S I T S S V N T M Q Q L F L N R

480 ttacccagttccagatatacagataccagttgtattattaccctttattgtcacaggcagccaatagcatctttctttattagagatggtatccttaatgcagatgaatgggtatt
L P Q F Q I Q G Y Q L L L L P L F A Q A A N M H L S F I R D V I L N A D E W G I

600 tcagcagcaacattacgtatcgatcgagattacctgagaaattatacaagagattattcctaattattgtataaatacgtatcaaacctgcgttttagagggttaaacaccggttacacgat
S A A T L R T Y R D Y L R N Y T R D Y S N Y C I N T Y Q T A F R G L N T R L H D

Cry2AintFw

720 atgttagaatttagaacatataatgttttttaaatgtattgaaatgtagtccatttggctcattgttttaaatatcagagtccttaggtatcttctggcgcctaatttatatgctagcggtag
M L E F R T Y M F L N V F E Y V S I W S L F K Y Q S L M V S S G A N L Y A S G S

840 ggaccacagcagacacaatcatttacagcacaaaactggcatttttatctctctttccaagtttaactgaattatattatctggatttagtggtactaggctttctattaccttc
G P Q Q T Q T Q S F T A Q N W P F L Y S L F Q V N S N Y I L S G I S G T R L S I T F

960 cctaataattgggtgggttagtactcaactcattcatlgaatagtgccagggttaattatagcggaggatttcatctggtctcctataggggcgactaatctcaatcacaacttt
P N I G G L P G L P G S T T T H S L N S A R V N Y S G G V S S G L I G A T N L N H N F

cry2AaintRev

1080 aattgcagcaggtctcctcctcttatacaaccatttggtagaagtggctgattcaggtacagatcgagagggcgttgctacctctacgaattggcagacagaatcctttcaaca
N C S T V L P P L S T P F V R S W L D S G T D R E G V A T S T N W Q T E S F Q T

1200 actttaagtttaaggtgtggtctttttcagcccgtgaaattcaaacatttccagattattttatccgtaattttctggggttccttttagttattagaaacgaagatctaacaaga
T L S L R C G A F S A R G N S N Y F P D Y F I R N I S G V P L V I R N E D L T R

1320 ccgttacactataaccaataagaatataagaagtccttcgggaacacctgggtggagcagggcctatttggatctctgcatatacagaaaaataatctctatgcccgttaataaaaaat
P L H Y N Q I R N I E S P S G T P G G A R A Y L V S V H N R K N N I Y A A N E N

cry2Aa1449R

1440 ggtagctatgatccatttggcgcagagaattatacaggatttactatatacgccaatcatgccaactcaagtgaataatcaaacctcgaacatttatttctgaaaaatttggaaatcaaggt
G T M I H L A P E D Y T G F T I S P I H A T Q V N N Q T R T F I S E K F G N Q G

1560 gattccttaagatttgaacaaagcaacacgacagctcgttatagcgttagaggaatgaaatggtacaacttttatttaagagatcttcaataggaattcaactattcaggttact
D S L R F E Q S N T T A R Y T L R G N G N S Y N L Y L R V S S I G N S T I R V T

1680 ataaacgtagagtttatactgtttcaaatgttaataaccactacaataacgatggagttatgataatggagctcgtttttcagatattaatcggtaataatagtagcaagtgataat
I N G R V Y T V S N V N T T T N N D G V N D N G A R F S D I N I G N I V A S D N

Cry2AaReverse

1800 actaatgtaacgtagatataaatgtgacattaaactccggtactcatttgatctcatgaaatattatgtttgtgccaactaatcttccaccactttattaa 1902
T N V T L D I N V T L N S G T P F D L M N I M F V P T N L P P L Y *

Figura 10. Sequência de nucleotídeos do gene *cry2Aa* (1.902 pKb) e de amino ácidos da proteína Cry2Aa (633 aa) de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S447. Sequências realçadas em cinza correspondem às regiões de anelamento dos oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento do gene. Os nomes dos oligos estão do acima da sequência de nucleotídeos e do lado de setas, que indicão a direção 5'> 3' de cada oligonucleotídeo. Os sítios de início (*atg*) e término da tradução (*taa*) estão indicados na figura. A base realçada em amarelo indica a única diferença da sequência do gene *cry2Aa* descrito neste trabalho com o gene *cry2Aa* descrito por Donovan *et al.* (1989) (Genebank = M31738).

cry11AForward

1 *atgaattatatggaagat*adttcttttagatactttaagtatagttaatgaaacagactttccattatataataattataccgaacctactattgcccagcattaatagcagtagctccc
M N Y M E D S S L D T L S I V N E T D F P L Y N N Y T E P T I A P A L I A V A P

120 atcgcaaatatcttccaacagctatagggaaatggcggcgaagggcagcattttcaaaagtactatcactttatattcccaggttctcaacctgctactatggaaaaagtctgtacagaa
I A Q Y L A T A I G K W A A K A A F S K V L S L I F P G S Q P A T M E K V R T E

240 gtggaacaccttataaatcaaaaattagccaagctcagtgcaatataatcaaacgagaataatagggggattattgaggttagtgatgtattgatgcgtatattaacaaccaggtttt
V E T L I N Q K L S Q D R V N I L N A E Y R G I I E V S D V F D A Y I K Q P G F

360 acccctgcaacagcccaaggttattttctaaatctaaagtggtgctataataacaacgattaccctcaatttgaggttcaaacatagaaggagatctatagcactttttactcaaatgtgt
T P A T A K G Y F L N L S G A I I Q R L P Q F E V Q T Y E G V S I A L F T Q M C

Cry11AintFow

480 acacttcatttaactttatataaaga*cggaatcctagcaggagtgcat*ggggatttactcaagctgatgtagattcatttataaaattatttaacaaaaagtattagattacagacc
T L H L T L L K D G I L A G S A W G F T Q A D V D S F I K L F N Q K V L D Y R T

600 agattaatgagaatgtacacagaaggttcggaagattgtgtaagtcagtccttaagatggattgacgttccggaatagtgtaatttatatgtgttccatttgctgaagcctgggtct
R L M R M Y T E E F G R L C K V S L K D G L T F R N M C N L Y V F P F A E A W S

720 ttaatgagatagaaggattaaaattcaaaagctctctatcattatgggattatgtgtgtctcaattcctgtaaatataatgaatggggaggactagttataagttattaatgggg
L M R Y E G L K L Q S S L S L W D Y V G V S I P V N Y N E W G G L V Y K L L M G

cry11AF890

840 gaagtaatacaagattaacaactgttaaatattatctt*tcactaatgaaccagctga*ataccagcaagagaaaattattcgtggcgtccatcctatatacagatcctagttctggg
E V N Q R L T T V K F N Y S F T N E P A D I P A R E N I R G V H P I Y D P S S G

960 cttacaggtgagtaggaaacggaagaacaacaatttttaattttgtctgataacaatggcaatgaaattatggaagttagaacacaaactttttataaaaatccaaataatgagcctata
L T G W I G N G R T N N F N A D N N G N E I M E V R T Q T F Y Q N P N N E P I

1080 gcgcctagagatattataaatcaaattttaactgcgccagcaccagacactatttttaaaaatgcagatataaatgtaaagttcacacagtggtttcagctactctataggggtgg
A P R D I I N Q I L T A P A P A D L F F K N A D I N V K F T Q W F Q S T L Y G W

1200 aacattaactcggtagacacaacgggttttaagtagtagaacgggaacaataccaccaatatttagcatatgatggatattatattcgtgctatttcagcttgccaagaggagtctca
N I K L G T Q T V L S S R T G T I P P N Y L A Y D G Y Y I R A I S A C P R G V S

1320 cttgcatataatcagatcttacaacactaacatataatagaatagatgatgattcactactacagaaaatattattgtagggtttgcaccagataataactaaggactttttattctaaa
L A Y N H D L T T L T Y N R I E Y D S P T T E N I I V G F A P D N T K D F Y S K

cry11AintRev

1440 aaatctcactatttaagtgaacgaat*gatagttatgtaattcctgctctg*caattttgctgaagtttcagatagatcattttttagaagatagccagatcaagcaacagagcggcagatt
K S H Y L S E T N D S Y V I P A L Q F A E V S D R S F L E D T P D Q A T D G S I

1560 aaatttgcagctactttcattagtaaatgaagctaaagtactctattagactaaaaccgggtttaaatacggcaactagatataaattaattatcagggtaagatccttatcgcttacct
K F A R T F I S N E A K Y S I R L N T G F N T A T R Y K L I I R V R V P Y R L P

cry11AR1763

1680 gctggaatacgggtacaatctcagaatcgggaaataatagaatgctagcagttttactgca*atgctaatccagaatgggt*ggattttgtcacagatgcatttacatttaacgattta
A G I R V Q S Q N S G N N R M L G S F T A N A N P E W V D F V T D A F T F N D L

1800 gggattacaactcagtagcaaatgctttatgtatttttagtattttcagatagtttaaatctggagaagagtggtatttatcgagttgttttagtaaaagaatcggccttacgacgcaa
G I T T S S T N A L F S I S S D S L N S G E E W Y L S Q L F L V K E S A F T T Q

cry11A Reverse

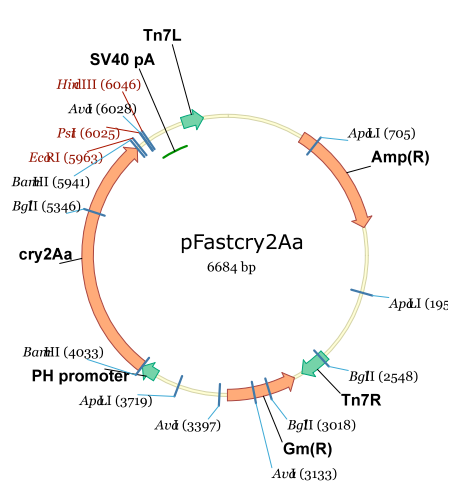
1920 att*atccgttactaaagtag* 1947
I N P L L K *

Figura 11 Sequência de nucleotídeos do gene *cry11A* (1.941 pKb) e de amino ácidos da proteína Cry11A (646 aa) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* S1806. Sequências realçadas em cinza correspondem às regiões de anelamento dos oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento do gene *cry11A*. Os nomes dos oligos estão do acima da sequência de nucleotídeos e do lado de setas, que indicão a direção 5'> 3' de cada oligonucleotídeo. Os sítios de início (*atg*) e terminção da tradução (*tag*) são mostrados em itálico. O gene *cry11A* acima, possui 100% de identidade com o gene *cry11A* descrito por Berry *et al.* (2002) (Genebank = AL731825).

5.2 Construção dos vírus recombinantes vAcCry2Aa e vAcCry11A

Os fragmentos correspondentes aos genes *cry2Aa* e *cry11A* foram clonados no sítio de *Bam*HI do vetor de transferência pFastbac1® formando os novos plasmídeos recombinantes pFastcry2Aa (6.684pb) e pFastcry11A (6.723 pb) (figuras 12 e 13). Para confirmar a orientação dos genes estudados, os novos plasmídeos foram digeridos com as enzimas *Bgl*II e *Eco*RI. Após a digestão do plasmídeo pFastcry2Aa, foram liberados três fragmentos em torno de 3.890 pb, 2.349 pb e 470 pb, confirmando a orientação do gene. O mesmo foi observado para o plasmídeo pFastcry11A com a liberação dos fragmentos de aproximadamente 6.429 pb e 284 pb (Figura 14). Após a confirmação da clonagem dos genes de interesse pela análise dos fragmentos em gel de agarose, estes plasmídeos foram utilizados para a construção dos vírus recombinantes por transposição sítio-específica. Os DNA dos plasmídeos foram transformados em células competentes *E. coli* DH10Bac contendo o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de bacmídeo. A confirmação da inserção dos genes *cry2Aa* e *cry11A* no genoma do bacmídeo foi demonstrada pela amplificação por PCR dos fragmentos de aproximadamente 1.909 pb (oligonucleotídeos *cry2Aa*Forward e *cry2Aa*Reverse) e 1.947 pb (oligonucleotídeos *cry11A*Forward e *cry11A*Reverse), respectivamente (Dados não mostrados).

A



B

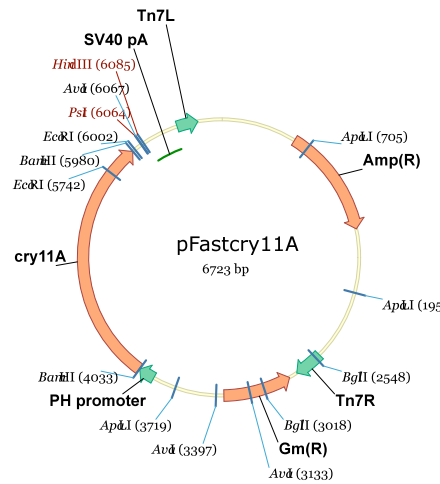


Figura 12 – Esquema dos plasmídeos (A) pFastcry2Aa e (B) pFastcry11A. Os sítios de algumas enzimas de restrição são mostrados na figura. ampR representa o gene da beta-lactamase, que confere resistência à ampicilina, Tn7R e Tn7L são seqüências necessárias para transposição. pH promoter representa o promotor do gene da poliedrina. Gm(R) representa o gene de resistência ao antibiótico gentamicina. SV40pA representa a seqüência de poliadenilação do vírus SV40. A posição e direção dos genes *cry2Aa* e *cry11A* estão indicadas na figura. Mapas construídos com o auxílio do programa Vector NTI da companhia Invitrogen.

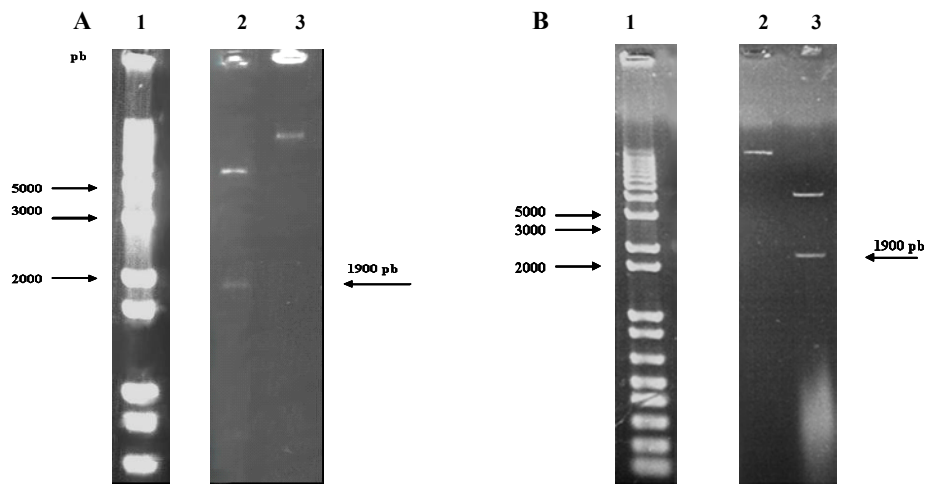
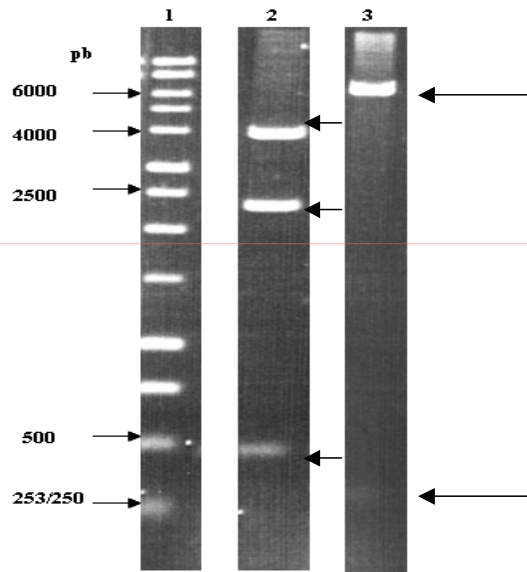


Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 0,8% de fragmentos de DNA contendo os genes *cry2Aa* (A) e *cry11A* (B) no vetor pFastbac1®. Gel A Poço 1- 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), 2- Fragmentos de DNA derivados da digestão do pFastcry2Aa com *Bam*HI, 3- DNA do plasmídeo pFastcry2Aa intacto; Gel B Poço 1- 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), 2- plasmídeo pFastcry11A intacto, 3- digestão do pFastcry11A com *Bam*HI.



Acer 10/3/09 10:24
Comment: Aqui a Joseilde falou que os valores dos fragmentos obtidos no poço 3 estavam errados, mas eles estão corretos.

Figura 14 Confirmação da clonagem dos genes *cry2Aa* e *cry11A* na orientação correta no vetor de transferência pFastbac1[®]. Gel de agarose 0,8% mostrando o perfil de restrição dos vetores pFast*cry2Aa* e pFast*cry11A*. 1 – Marcador 1 kb DNA ladder (Promega), 2 – confirmação da direção do gene obtida por digestão do vetor pFastCry2Aa com a enzima *Bgl*III (Promega) gerando três fragmentos de aproximadamente 3.890 pb, 2.349 pb e 470 pb, 3 – mostra a presença de dois fragmentos em torno de 6.463 pb e 260 pb obtidos por digestão com a enzima *Eco*RI (Promega) confirmando a orientação correta do gene no vetor pFast*cry11A*.

5.3. Análise transcricional dos genes *cry2Aa* e *cry11A* em células de inseto infectadas com os vírus recombinantes

A análise da transcrição dos genes *cry2Aa* e *cry11A* foi realizada por RT-PCR. A amplificação obtida na reação de RT-PCR apresentou, para o gene *cry2Aa*, um fragmento de aproximadamente 1.100 pb e algumas bandas inespecíficas, e o mesmo aconteceu para o gene *cry11A* que, além da presença de um fragmento de aproximadamente 1.500 pb, apareceram outras bandas inespecíficas. Esse fato pode ser explicado pela baixa especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, bem como a

temperatura de anelamento utilizada na reação de PCR. Além disso, a presença de fragmentos maiores que 1.100 e 1.500 pb podem representar sítios de terminação diferentes. Para a confirmação dos transcritos, os fragmentos de 1.100 e 1.500 pb obtidos foram eluídos e purificados a partir do gel de agarose e nova reação de PCR foi feita utilizando os primers específicos dos genes (Tabela 2). A reação de PCR confirmou a presença dos fragmentos de genes *cry2Aa* e *cry11A*, demonstrando assim, que pelo menos os fragmentos eluídos eram específicos aos genes estudados (Figura 15).

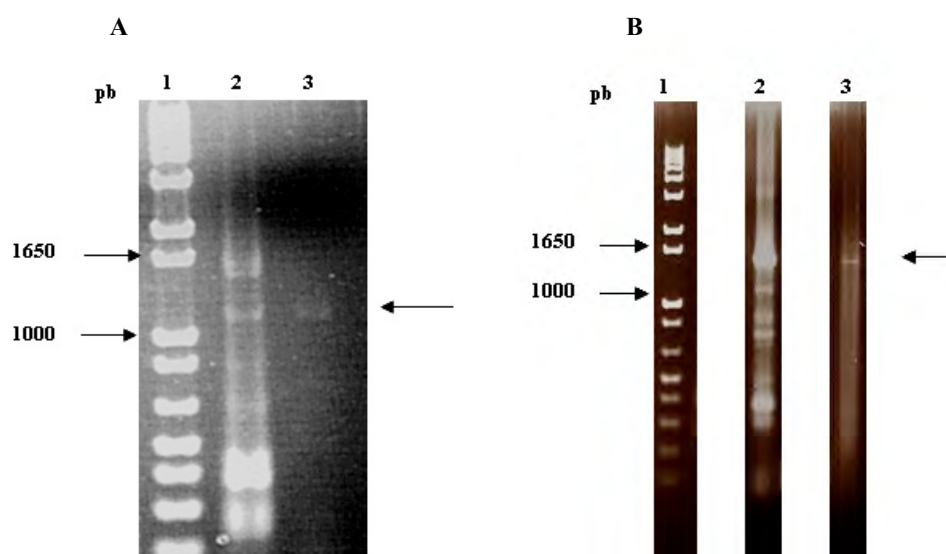


Figura 15 Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de amplificação por RT-PCR dos genes *cry*. (A) RT-PCR do gene *cry2Aa*. 1 – Marcador 1 kb ladder plus (Invitrogen), 2– Amplificação do produto RT-PCR a partir do mRNA de células infectadas com o vírus vAcCry2Aa, 3 – Confirmação por PCR com oligonucleotídeos específicos (*cry2AaFw* e T2) do fragmento eluído gerando um produto correspondente a 1.100 pb. (B) Análise da transcrição por RT-PCR do gene *cry11A*. 1 – Marcador 1 kb ladder plus (Invitrogen), 2– Amplificação do produto RT-PCR a partir do mRNA de células infectadas com o vírus vAcCry11A, 3 – Confirmação por PCR com oligonucleotídeos específicos (*cry11AintFow* e T2) do fragmento eluído gerando um produto correspondente a 1.500 pb

5.4. Análise da expressão das proteínas heterólogas em extrato de lagartas

As amostras dos extratos de larvas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes contendo os possíveis cristais das proteínas heterólogas foram avaliadas em géis desnaturantes de poliacrilamida. Uma banda de aproximadamente 65 kDa foi observada em gel SDS-PAGE 12% nas amostras dos extratos de insetos infectados com o vírus vAcCry2Aa e outra de aproximadamente 70 kDa com o vírus vAcCry11A, correspondentes às pró-toxinas (Figura 16).

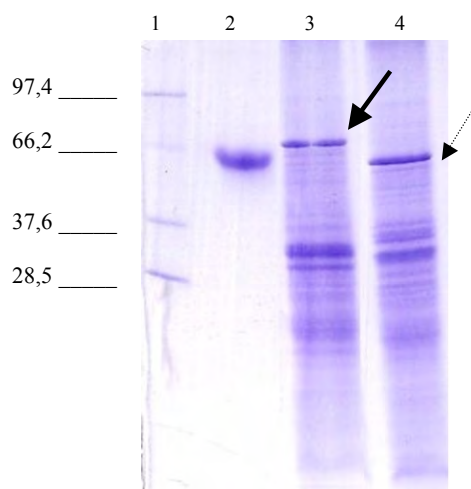


Figura 16 Análise da expressão das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A em insetos infectados com os vírus vAcCry2Aa e vAcCry11A. SDS-PAGE (12%) mostrando em 1 - Marcador de Massa Molecular (Protein Molecular Weight Marker, MoBitec®), 2 BSA (Sigma), 3 - Extrato de lagartas infectadas com o vírus vAcCry11A mostrando uma banda de aproximadamente 70 kDa, na concentração de 19 μ g (seta larga), 4 - extrato de lagartas infectadas com o vírus vAcCry2Aa apresentando uma banda em torno de 65 kDa, na concentração de 21 μ g (seta tracejada).

Acer 10/3/09 10:24

Comment: Foi pedido para colocar a concentração de cada amostra

5.5 Análise ultraestrutural das proteínas Cry

Células de BTI-Tn5B1-4 infectadas foram observadas por microscopia óptica ao longo da infecção (até 120 h p.i.) para verificar a presença de possíveis cristais. As células infectadas com os vírus recombinantes revelaram que cristais protéicos derivados das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A não são produzidos *in vitro*, pois os mesmos não foram visualizados pela microscopia de luz.

Porém, ao analisar as proteínas Cry2Aa purificadas a partir dos extratos das larvas de terceiro instar infectadas com os vírus recombinantes foi observada a presença de grandes cristais na forma cubóide (Figura 17). O mesmo não aconteceu para a proteína Cry11A. Por microscopia eletrônica de varredura não foi possível verificar a formação de cristais.

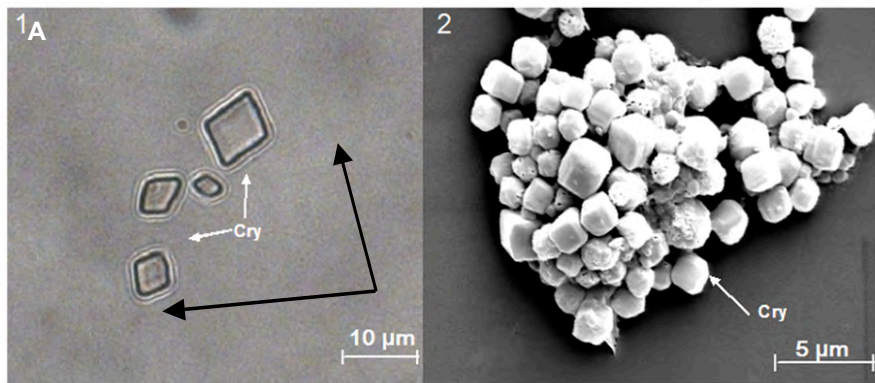


Figura 17 Análise estrutural e ultraestrutural dos cristais purificados de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vAcCry2Aa. (A) microscopia óptica dos cristais Cry2Aa. (B) microscopia eletrônica de varredura mostrando a presença de cristais cubóides da proteína heteróloga Cry2Aa.

5.6 Análise da interação entre as proteínas Cry2Aa e Cry11A com as proteínas acessórias ORF2 e P20

Para verificar se a interação entre as proteínas Cry2Aa e Cry11A com as proteínas acessórias, ORF2 e P20, poderia contribuir para uma melhor expressão das mesmas, células foram infectadas com as proteínas recombinantes e em seguida analisadas em gel de SDS-PAGE. Aparentemente não houve nenhuma diferença significativa que demonstre a presença dessas proteínas acessórias relacionadas ao aumento da expressão das proteínas recombinantes Cry2Aa e Cry11A.

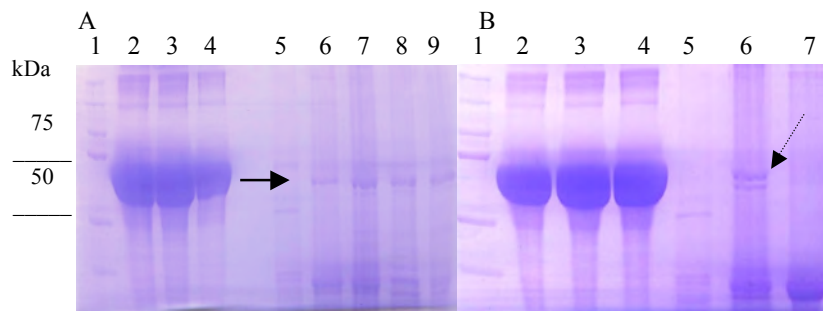


Figura 18 Análise da expressão das proteínas Cry2Aa e Cry11A e sua interação com as proteínas acessórias ORF2 e P20, respectivamente, em gel SDS-PAGE (12%). Gel A, poço 1 - Marcador de Massa Molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker - Promega®), 2-4 BSA (Sigma), 5 - Extrato células não infectadas, 6- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry2Aa, 7- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry2Aa + vAcORF2, 8- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry2Aa + vAcP20, 9- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry2Aa +ORF2 + vAcP20 mostrando bandas de aproximadamente 65 kDa (seta larga). Gel 2 - poço 1 - Marcador de Massa Molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker - Promega®), 2-4 BSA (Sigma), 5 - Extrato células não infectadas, 6- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry11A, 7- Extrato de células infectadas com o vírus vAcCry11A + vAcP20 mostrando banda de aproximadamente 70kDa (seta tracejada).

5.7 Bioensaio

O bioensaio foi realizado para confirmar a atividade biológica das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A através da determinação da concentração letal para matar 50% dos insetos testados (CL₅₀). A proteína Cry2Aa foi testada em larvas de segundo instar de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *C. quinquefasciatus*. O resultado da CL₅₀ foi de

Acer 10/3/09 10:28

Comment: Aqui pediram para resumir. Porém, não vejo onde. Afinal, a figura tem que ser auto explicativa.

1,036 µg/mL para larvas de *A. gemmatalis* (Tabela 3), porém não apresentou atividade para larvas de *S. frugiperda*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Os resultados obtidos demonstram que a proteína Cry2Aa não apresenta diferença significativa em relação à toxicidade obtida pela estirpe padrão *BtK* HD-1, devemos entender que a estirpe padrão expressa mais de um tipo de proteína Cry e que talvez a atividade tóxica obtida tenha sido em decorrência da ação sinérgica dessas proteínas.

Tabela 3 - Atividade inseticida das proteínas heterólogas Cry2Aa contra larvas de segundo instar de *A. gemmatalis*.

Amostra	CL ₅₀ (µg/mL) ¹
Cry2Aa	1,036 (0,082 - 2,621) ²
<i>Btk</i>	2,27 (1,455 - 9,490) ²

¹ Resultados da CL₅₀ da proteína Cry2Aa contra *A. gemmatalis*, com base de três repetições.

² Intervalo de confiança de 95%

A proteína heteróloga Cry11A foi testada contra larvas de segundo instar de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e apresentou uma CL₅₀ de 53,3 ng/mL. Já a linhagem padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, apresentou uma maior toxicidade, CL₅₀ de 2,2 ng/mL (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade inseticida das proteínas heterólogas Cry11A contra larvas de segundo instar de *A. aegypti*

Amostra	CL ₅₀ (ng/mL) ¹
Cry11A	53,3 (6,5 - 79,00) ²
<i>Bti</i>	2,20 (0,93 - 3,39) ²

¹ Resultados da CL₅₀ da proteína Cry11A contra *A. aegypti* com base de três repetições.

² Intervalo de confiança de 95%

6. Discussão

Baculovírus têm sido modificados geneticamente com a finalidade de aumentar a patogenicidade e para diminuição do tempo para matar o seu hospedeiro (Moscardi, 1998; Castro *et al.*, 1999; Kost *et al.* 2005). Alguns exemplos de genes exógenos que foram incorporados ao genoma do baculovírus são genes que codificam neurotoxinas de escorpião, hormônio diurético, hormônio juvenil esterase e delta-endotoxinas (Bonning & Hamnã infectadas, 1996; Burden *et al.*, 2000; Kamita *et al.*, 2005).

Vários trabalhos descreveram a expressão de proteínas Cry na forma intacta ou truncada (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, CryII e Cry11A) de *B. thuringiensis* utilizando baculovírus como sistema de expressão (Martins *et al.*, 2008, Aguiar *et al.*, 2006, Chang *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 1995, Ribeiro & Crook, 1993; Pang *et al.*, 1992; Merryweather *et al.*, 1990). Merryweather *et al.* (1990), mostraram que o gene da pró-toxina (Cry1Ab) foi inserido no genoma do baculovírus AcMNPV e a proteína expressa mostrou-se biologicamente ativa. Porém, a dose letal e o tempo para matar 50% das larvas (LD₅₀ e TL₅₀, respectivamente) utilizando tanto o vírus selvagem quanto o recombinante não mostraram diferença significativa. O mesmo foi observado por Ribeiro & Crook (1993) ao introduzirem no genoma de AcMNPV formas truncadas e intacta do gene *cry1Ab* e a forma intacta do gene *cry1Ac*. Todos os dois genes foram altamente expressos em células de inseto e as proteínas produzidas mostraram-se semelhantes à proteína nativa de *B. thuringiensis*. Contudo, as TL₅₀ dos vírus recombinantes não mostraram diferença com relação ao vírus selvagem. Esses trabalhos demonstraram que esse sistema era capaz de produzir a proteína em grandes quantidades e com muita similaridade às proteínas nativas de *B. thuringiensis*, porém, não observaram aumento na toxicidade. Entretanto, quando a proteína Cry1Ac foi

fusionada à poliedrina (principal proteína produzida pelo baculovírus) foi observado um aumento na patogenicidade do vírus recombinante (Chang *et al.*, 2003).

Neste trabalho, os genes *cry2Aa* e *cry11A* foram introduzidos no genoma do baculovírus AcMNPV com a finalidade de observar a possível formação de cristais nos insetos, bem como verificar a atividade tóxica dessas proteínas para larvas de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *A. aegypti*.

Uma alta expressão das proteínas heterólogas Cry2Aa e Cry11A foi detectada no gel de SDS-PAGE, pela presença de proteínas com aproximadamente 65 kDa e 70 kDa, respectivamente. A massa molecular da proteína Cry2A é de 70 kDa e é acumulada em *B. thuringiensis* como cristais cubóides (Widner & Whiteley 1989, Yamamoto *et al* 1981). A diferença na massa molecular observada para a proteína Cry2Aa pode ser devido à degradação por protease que estão presentes no cadáver dos insetos infectados pelo vírus recombinante. Recentemente, Aguiar *et al.* (2006) também detectaram, a partir de extrato de lagartas uma possível proteína de 65 kDa, possivelmente processada por proteases, em gel de SDS-PAGE de um baculovírus recombinante contendo uma versão truncada do gene *cry1Ca*.

As proteínas Cry1 são geralmente sintetizadas como proteínas na forma intacta de 130-140 kDa, que são clivadas por proteases presentes no intestino do inseto, gerando uma toxina ativa de aproximadamente 65 kDa (Höfte & Whiteley 1989).

Muitas proteínas Cry expressas em células de inseto são capazes de formar cristais (Ribeiro & Crook 1993, Aguiar *et al.*, 2006). Esses cristais podem ser facilmente purificados por gradiente de sacarose, o que facilita o estudo da toxicidade contra diferentes insetos-praga. Como demonstrado por outras proteínas Cry expressas em insetos infectados com baculovírus recombinantes, a proteína heteróloga Cry2Aa formou grandes cristais em insetos infectados com o baculovírus recombinante

vAcCry2Aa. Esses cristais apresentam a mesma forma cubóide que os encontrados nas linhagens de *B. thuringiensis* nativas que contém os genes da família *cry2* (Yamamoto *et al* 1981, Widner & Whiteley, 1990).

Os cristais das proteínas Cry2Aa e Cry11A estudados neste trabalho não puderam ser visualizados por microscopia óptica em culturas de células derivadas de células de *T. ni* (BTI-Tn5B1-4) infectadas com os baculovírus recombinantes. Contudo, foi possível visualizar a presença de cristais da proteína Cry2Aa apenas em extrato de larvas infectadas. Aguiar *et al.*(2006), mostraram a formação de cristais cubóides da proteína Cry1Ca truncada no citoplasma das células infectadas com o baculovírus recombinante carregando o gene truncado *cry1Ca*. Por outro lado, Ribeiro & Crook (1993), também não detectaram a formação de cristais Cry1Ac em culturas de células de *S. frugiperda* (Sf21), apenas em larvas de *Heliothis virescens* .

As proteínas Cry11A estudadas neste trabalho foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, porém não foi possível observar a formação dos cristais. Não podemos concluir que as proteínas não estão sendo cristalizadas, talvez estejam sendo formadas proteínas muito pequenas que não é possível visualizar na microscopia de varredura. Fato semelhante foi observado por Pang *et al.* (1992), que expressaram a proteína Cry11A (na forma intacta e truncada) fusionada à 171 pb da poliedrinado baculovírus AcMNPV em células de *S. frugiperda* e larvas de *T. ni*. A análise em SDS-PAGE de extrato de células infectadas com o baculovírus recombinante mostrou a presença de uma proteína de 72 kDa (intacta) e 68 kDa (truncada), não foi possível visualizar as proteínas através de microscopia óptica, somente após observação das células de inseto infectadas com os vírus recombinantes por microscopia eletrônica de transmissão, verificaram a presença de cristais com morfologia semelhante à proteína nativa..

A porção C-terminal das proteínas Cry de 130 kDa de *B. thuringiensis* como Cry1A, Cry4A and Cry4B, é conhecida pela sua importância na formação dos cristais (Baum & Malvar 1995; Aronson, 1994). Alguns autores relatam que essa região contém muitos resíduos de cisteína que estão relacionados com a formação do cristal, uma vez que são responsáveis pela formação de pontes dissulfeto, sugerindo ser importante para a formação desses cristais (Ge *et al.* 1998; Bietlot *et al.* 1990). Contudo, proteínas Cry menores, tais como Cry2A e Cry11A são naturalmente truncadas e não têm a porção C-terminal e muitos autores mostram evidências que essas proteínas dependem de proteínas acessórias (ORF2 e P20, respectivamente) para a formação do cristal (Crickmore & Ellar 1992; Crickmore *et al.* 1994).

Em *B. thuringiensis*, o operon do *cry2Aa* apresenta, além do gene *cry2Aa*, duas outras ORFs, *orf1* e *orf2*. Foi mostrado que proteína ORF2 atua como uma proteína “helper” que auxilia a cristalização da proteína Cry2Aa, enquanto o papel da ORF1 permanece desconhecido (Crickmore & Ellar 1992; Crickmore *et al.* 1994; Sasaki *et al.* 1997; Staples *et al.* 2001).

Fato semelhante é demonstrado para a proteína Cry11A. A proteína Cry11A é muito semelhante à proteína Cry11B também de *B. thuringiensis*. Contudo, existe uma diferença substancial entre elas, particularmente na região C-terminal, Cry11B abriga 88 aminoácidos, incluindo cinco resíduos de cisteína, que está ausente em Cry11A (Delécluse *et al.*, 1995). O gene *cry11A* é o segundo gene do operon que contém outros genes, *p19* e *p20* (Adams *et al.*, 1989; Dervyn *et al.*, 1995). A proteína P20 atua como uma chaperona estabilizando os componentes da proteína Cry11A para a montagem do cristal. Portanto, a formação dos cristais Cry2Aa e Cry11A em insetos pode ser devido à presença de proteínas celulares presente nas células do inseto que possivelmente atuam como chaperonas ajudando no correto dobramento dessas proteínas.

O bioensaio com a proteína heteróloga Cry11A, expressa em larvas de *S. frugiperda*, apresentou atividade tóxica para larvas de segundo instar de *A. aegypti*. A CL₅₀ da amostra utilizada neste trabalho foi de 53,3 ng/mL. Já era esperado que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* apresentasse maior toxicidade, pois essa bactéria apresenta outros fatores que podem contribuir para o aumento da toxicidade, além da presença dos esporos essa bactéria expressa várias toxinas (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10, Cry11A e Cyt1A) que agem de forma sinérgica potencializando a toxicidade. A proteína heteróloga Cry11Aa expressa em célula de inseto mostrou-se ativa para larvas de segundo instar de *Aedes*, apresentando uma toxicidade em torno de 25 vezes superior à proteína Cry11A utilizada por Beltrão & Silva-Filha (2007) (CL₅₀ 1.350 ng/mL contra larvas de quarto instar de *A. aegypti*). Pang *et al.* (1992) verificaram também que o vírus recombinante vAcCryIVD apresentou toxicidade para larvas de primeiro instar de *A. aegypti* apresentando uma CL₅₀ de 250 ng/mL. Vários fatores podem contribuir para essa diferença de atividade como o estágio larval além das variações genéticas que acontecem no inseto (Robertson *et al.*, 1995). Outros fatores que podem interferir são as condições de temperatura e umidade utilizadas no ensaio (Bird & Akhust, 2007).

A proteína Cry2Aa apresenta 87% de identidade com a seqüência da proteína Cry2Ab, mas diferem com relação à toxicidade. Embora a literatura descreva a proteína Cry2Aa como sendo tóxica para ambos os insetos lepidópteros e dípteros (Widner & Whiteley (1989), neste trabalho, a proteína Cry2A mostrou toxicidade apenas para larvas de segundo instar de *A. gemmatalis*, apresentando uma CL₅₀ de 1,036 µg/ml. A solubilização dos cristais em pH alcalino, presente no intestino do inseto, bem como a clivagem das proteínas Cry podem causar uma diferença na atividade tóxica da proteína (Crickmore *et al.*, 1995). Além disso, quando as proteínas Cry são expressas em insetos,

outras proteases presentes no cadáver da larva podem processar as proteínas Cry de modo diferente das proteases intestinais e apresentar uma influência na toxicidade. O ambiente alcalino do intestino do inseto bem como a composição dos cristais são fatores importantes para determinar a especificidade da proteína (Choma *et al.*, 1990, Aronson *et al.*, 1991).

A introdução de genes *cry* em plantas com interesse econômico representa uma boa estratégia para o controle de insetos-praga e vários trabalhos em todo o mundo vêm sendo realizados (Betz *et al.* 2000, De cosa *et al.* 2001). A proteína Cry2Aa é tóxica para vários insetos-praga tais como *H. armigera* and *H. punctigera* (Lião *et al.* 2002), *Plutella xylostella* (Tabashnik *et al.* 1993) e *S. frugiperda* (Greenplate *et al.* 2003). Kota *et al.* (1999) construíram plantas transgênicas Cry1Ac e Cry2Aa e mostraram que a expressão de Cry2Aa em cloroplasto de folhas transgênicas de tabaco resultou em 100% de mortalidade de *H. virescens*, *H. zea* e *S. exigua* resistentes a Cry1Ac. Portanto, devido à diferença na estrutura e atividade inseticida das proteínas Cry1 e Cry2A, as proteínas Cry2A são candidatas promissoras para controlar o desenvolvimento de resistência em insetos.

O uso de baculovírus como sistema de expressão representa uma excelente ferramenta, uma vez que essa tecnologia pode ser facilmente utilizada na análise de outras proteínas Cry expressas isoladamente, ou em associação com outras proteínas Cry, na tentativa de se compreender o papel na atividade inseticida dessas proteínas. Além disso, a associação de diferentes proteínas Cry associadas à proteína poliedrina de baculovírus, poderá produzir novos bioinseticidas recombinantes com a finalidade de se reduzir o uso de inseticidas químicos.

7. Conclusões

O desenvolvimento de baculovírus recombinantes oferece várias vantagens como aumento da atividade inseticida do vírus e até mesmo a possibilidade de avaliar os efeitos sinérgicos dos múltiplos genes de toxinas Cry.

Neste trabalho, nós mostramos que os genes *cry2Aa* e *cry11A* de *B. thuringiensis* foram inseridos de forma eficiente no genoma do baculovírus AcMNPV, e insetos infectados por esses baculovírus recombinantes foram capazes de produzir cristais protéicos na forma cubóide (Cry2Aa). As proteínas recombinantes expressas, Cry2Aa e Cry11A, apresentaram toxicidade para larvas de lepidóptero e díptero, respectivamente.

Diante desses resultados, podemos concluir que o baculovírus pode ser utilizado como um excelente sistema de expressão de algumas proteínas Cry de *B. thuringiensis* para estudos funcionais e/ou estruturais.

8. Perspectivas

- Avaliar a interação entre as proteínas heterólogas ORF2 e P20;
- Analisar a expressão dessas proteínas utilizando a técnica de RT-PCR;
- Avaliar a presença das proteínas e determinar a sua concentração por gel SDS-PAGE e densitometria, respectivamente.
- Observar se essas proteínas podem ajudar no processo de cristalização

9. Referências Bibliográficas

- ADAMS, L. F., BROWN, K. L., WHITELEY, H. R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **J. Bacteriol.**, 173: 3846-3854, 1991.
- ADAMS, J.R., McCLINTOCK, J.T. Baculoviridae, nuclear polyhedrosis viruses – Nuclear polyhedrosis viruses in insects. In: ADAMS, J.R., BONAMI, J.R. (eds) **Atlas of Invertebrate Viruses**. Boca Raton: CRC Press, 199q. p. 87- 180..
- ADAMS, L. F., VISICK, J.E., WHITELEY, H.R. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 171:521-530, 1989.
- ADANG, M.J., BRODY, M.S., CARDINEU, G., EAGAN, N., ROUSH, R.T, SJHEWMAKER, C.K. JONES, A. OAKER, J.V., McBRIDE, K.E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. **Plant Mol.Biol.** 21:2329-2342, 1993.
- 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.** 176: 4734 -4741, 1994.
- AGAISSE H., LERECLUS D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **J. Bacteriol.** 177:6027-6032, 1995.
- AGUIAR, R.W.S., MARTINS, E.S., VALICENTE, F.H., CARNEIRO, N.P., BATISTA, A.C., MELATTI, V.M, MONNERAT, R.G., RIBEIRO, B.M. A recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Curr Microbiol** 53:287-292, 2006

- AGUIAR, R.W.S. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto.** 2007. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília.
- ARANTES, O.M.N., VILAS-BÔAS, L.A., VILAS-BÔAS, 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, 2002. p. 269-294.
- ARIF, B. M. The structure of the viral genomic. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 131: 21-29, 1986.
- ARONSON, A.I. Flexibility in protoxins composition of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett** 117: 21-28, 1994.
- ARONSON, A.I, HAN, E., MCGAUGHEY, W., JOHNSON, D. The solubility if the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factoring toxicity to insects. **Appl Environ Microbiol** 57:981-986, 1991
- ARONSON, A.I, SHAI, Y., Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol Lett**, 195: 1-8, 2001.
- BARRETT, J. W.; BROWNRIGHT, A.J.; PRIMAVERA, M. J.; RETNAKARAN, A., AND PALLI, S. R. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Tissue Cell**, 30 (6): 602-616, 1998.
- BARROS, M.C.E.S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão.** 2007. Dissertação de Mestrado.

Faculdade de Ciências da Saúde, Pós-graduação em Patologia Molecular,
Universidade de Brasília.

- BARTON, K.A., WHITELEY, H.R., YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* section sign-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiol.** 85:1103-1109, 1987.
- BAUM, J.A. Tn5401, a new class II transposable element from *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.** 176:2835-2845, 1994.
- BAUM, J.A., MALVAR, T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Mol Microbiol** 18: 1-12, 1995.
- BAUM, J.A., GILMER, A.J., LIGHT METTUS, A.M. Multiple roles for TnpI recombinase in regulation of Tn5401 transposition in *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol.** 181: 6271-6277, 1999.
- BAUM, J.A., CHU, C.R., DONOVAN, W.P., GILMER, A.J., RUPAR, M.J. **Lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin composition and methods of use.** Monsanto Technology/US 6593293, 15 de julho 2003.
- BEEGLE, C.B., YAMAMOTO, T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can Entomol** 124:587-616, 1992.
- BERRY, C., O'NEIL S., BEN-DOV, E., JONES, A.F., MURPHY L, QUAIL, M. A., HOLDEN, M.T., HARRIS, D., ZARITSKY, A. PARKHILL, J. Complete Sequence and Organization of pBtoxis, the Toxin-Coding Plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Appl Environ Microbiol** 68:5082–5095, 2002.
- BELTRÃO, H. B. M., SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *Israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvar midgut. **FEMS Microbiol Lett**, 266: 163-169, 2006.

- BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G., FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pest. **Regul Toxicol Pharmacol** 15:375-380, 2000.
- BIETLOT, H.P., VISHNUBHATLA, I., CAREY, P.R., POZSGAY, M., KAPLAN, H. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Biochem J** 267:309-315, 1990.
- BIRD, L.J., AKHURST, R.J. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wlallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. **J Invertebr Pathol** 94:84-94, 2007.
- BOBROWSKI, V.L., PASQUALI, G., ZANETTINI, M.H.B., PINTO, L.M.N., FIUZA, L.M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, 25:129-135, 2002.
- BONNING, B.C., HAMNÃO INFECTADAS, B.D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. **Annu Rev Entomol** 41:191-210, 1996.
- BRAVO, A., ARRIETA, G., BENINTENDE, G., REAL, M.D., ESPINOZA, A.M., IBARRA, J., MONNERAT, R., ORDUZ, S., SOBERÓN, M. **Metodologías utilizadas en investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México: Unam; 2001.
- BRAVO A. Familia de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A., CERON, J. (ed) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico, Bogotá: Editorial Buena Semilla; 2004. p. 49-68.
- BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423-435, 2007.

- BROWN, K. L., WHITELEY, H. R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 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.**, 172: 6682-6688, 1990.
- BURDEN, J.P., HAILS, R.S., WINDASS, J.D., SUNER, M.M., CORY, J.S. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. **J Invertebr Pathol** 75:226-236, 2000.
- CARLSON, C.R., JOHANSEN, T., LECADEC, M.M. KOLSTØ, A.B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1719-1725, 1994.
- CARLSON, C.R., KOLSTØ, A.B. A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome. **J. Bacteriol.** 175: 1053-1060, 1993.
- CASTRO, M. E. B., SOUZA, M. L., SIHLER, W., RODRIGUES, J.C., RIBEIRO, B.M. Biología molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1733-1761, 1999.
- CÉRON, J. Productos Comerciales: Nativos y recombinantes In: BRAVO, A. CERON, J. (Eds) ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico**. Bogotá, Colombia, 2004. p.127-147.
- CHANG, J.H., CHOI, J.Y., JIN, B.R., ROH, J.Y., OLSZEWSKI, A., SEO, S.J., O'REILLY, D.R., J.E., Y.H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **J Invertebr Pathol** 84:30-37, 2003.

- CHEONG, H., GILL, S.S. Cloning and characterization of a cytotoxic and mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3254-3260, 1997.
- CHESTHUKINA, G.G., KOSTINA, I.I., MIKHAILOVA, A.I., TYURIN, S.A., KLEPIKOVA, F.S., STEPANOV, V.M. The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin structure. **Arch. Microbiol.** 132: 159-162, 1982.
- CHOI, S-K., SHIN, B.S., PARK, S.H. Nucleotide sequence of a new *Bacillus thuringiensis* cry2-type gene. 1999. Disponível no site <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?view=gp&query_key=59&db=protein&dopt=GenPept&WebEnv=038G65BYN6m5FQEA7HBE6fX3mQDcKR7FJYhXhANWm1D_F_vLrH_e9arID%40256252D0795DBD80_0115SID&WebEnvRq=1&term=&tool=query&qty=1>. Acesso em 11 de Janeiro 2008.
- CHOMA, C.T., KAPLAN, H. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*. Evidence that the toxic moiety is present in active conformation. **Biochemistry** 29:10971-10977, 1990.
- CORRÊA, R.F.T. **Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em baculovírus recombinantes.** 2007. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde, Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAM, D.H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol Rev** 62:807-813, 1998
- CRICKMORE, N., BONE, E.J., WILLIAMS, J.A. ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the delta-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity

- of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol Lett** 131:249-254, 1995.
- CRICKMORE, N., WHEELER, V.C., ELLAR, D.J. Use of an operon fusion to induce expression and crystallization of a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin encoded by a cryptic gene. **Mol Gen Genet** 242:365-378, 1994.
- CRICKMORE N., ELLAR DJ. Involvement of possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Mol Microbiol** 6:1533-1537, 1992.
- De COSA, B., MOAR, W., LEE, S.B., MILLER, M., DANIELL, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nat Biotechnol** 19:71-74, 2001.
- de MAAGD, R.A., BRAVO, A, CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet** 17:193-199, 2001.
- DONOVAN, W.P., DANKOCSIK, C.C, GILBERT, M.P., GAWRON-BURKE, M.C., GROAT, R.G., CARLTON, B.C. Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* **J Biol Chem** 263:561-567, 1988.
- 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. Bioch. And Molec. Biol.** 23: 273-283, 1983.
- DELÉCLUSE, A., ROSSO, M.L., RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* encoding a highly mosquitocidal activity. **Appl Environm Microbiol** 61:4230-4235, 1995.

- DERVYN, E., PONCET, S., KLIER, A., RAPOPORT, G. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J Bacteriol** 177:2283-2291, 1995.
- DU, C., NICKERSON, K. W. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: 2932–2939, 1996.
- DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **J. Inverteb Pathol.** 15:232-239, 1970.
- ENGELHARD, E. D., KAM-MORGAN, L. N. W., WASHBURN – VOLKMAN, L. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of Autographa California nuclear polydrosus virus. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 91: 3224-3227, 1994
- ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N.B., DESAI, N., NICHOLAS, B., DUCK, N.B., WARREN, G.W., KOZIEL, M.G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nat Biotechnol** 15:137-141, 1997.
- 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**, 93: 5389-5394, 1996.
- FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J. AND SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *Gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, 34: 1118-1120, 1969.
- FAUST, R. M., BULLA, A. L. JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: *Kurstaki, E. (ed.) Microbiol. and Viral Pest.* New York: Marcel Dekker, 1982.p.75-206.
- FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: Miller, L.K. (ed.) **The baculoviruses.** New York: Plenum Press, 1997. p33-58.

- GAWRON-BURKE, C., BAUM, J.A. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. **Genet. Eng.** 13:237-263, 1991.
- GRANADOS, R. R., WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculovirus
In: **The biology of Baculovirus**. Granados, R. R., Federici, B. A., eds. CRC press, Boca Raton, Florida, 89-108, 1986.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. , Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- GE, B., BIDESHI, D., MOAR, J.W., FREDERICI, B.A. Diferential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett** 165:35-41, 1998.
- GHEYSEN, G., VAN MONTAGU, M., ZAMBRYSKI, P. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant sequences. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 84:6169-6173, 1987.
- GITAHY, P.M., GALVÃO, P.G. SIMÕES DE ARAÚJO, J.L., BALDANI, J.I. Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. **Série Documentos n° 124**. Seropédica:Embrapa Agrobiologia, 2006.
- GLARE, T. R., O'CALLAGHAM, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley and Sons; 2000. p. 350.
- 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**, 269: 1338-1341, 1972.
- GONZÁLEZ, J.M.Jr, BROWN, B.J., CARLTON B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmid coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA** 79:6951-6955, 1982.

- 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 Invertebr Pathol.**, 64:260-266, 1994.
- GREENPLATE, J.T., MULLINS, J.W., PENN, S.R., DAHM, A., REICH, B.J., OSBORN, J.A., RAHN, P.R., RUSCHKE, L., SHAPPLEY, Z.W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **J Appl Entomol** 127:340–347, 2003.
- HABIB, M. E. M., ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. ALVES, S. B. (ed) Piracicaba:FEALQ, 1998. p. 383-446.
- HANSEN, B.M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. CHARLES, J.F., DELECLUSE, A., NIELSEN-LE ROUX, C. (eds) Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-44.
- HELMANN, J.D., CHAMERLIN, M.J. Structure and function of bacterial sigma factors. **Annu Rev Biochem** 57:839-872, 1988.
- HOFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HOFTE, H., VAN RIE, J., JANSENS, S., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* σ -endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci.** .85:7844-7848, 1988.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol Rev** 53:242-255, 1989.

- HORTON, H.M., BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **J. Virol.**67:1860-1868. 1993.
- HUGHES, P.A., STEVENS, M.M., PARK, H.W., FEDERICI, B.A., DENNIS, E.S., AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **J Invertebr. Pathol.** 88:34-39, 2005.
- JARVIS, D.L. Baculovirus expression vectors. In: MILLER LK (ed). **The baculovirus**, New York: Plenum; 1997. p 341-389.
- JEHLE, J.A., LANGE, M., WANG, H., HU, Z., WANG, Y., HAUSCHILD, R., Molecular identification and phylogenetic analysis of baculovirus from *Lepidoptera*. **Virology**, 346:180-193, 2006a.
- 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.** 151:1257-1266.
- KAMITA, S.G., KANG, K.D., HAMNÃO INFECTADAS, B.D. genetically modified baculoviruses for pest insect control. In: GILBERT, L.I., IATROU, K., GILL, S.S. (eds) **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 271-307.
- KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in insect Physiology** 24: 275-308, 1994.
- KNOWLES, B. H., ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. **Biochem. Biophys. Acta.** 924: 509-518, 1987.

- KONI, P.A., ELLAR, D.J. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **J. Mol. Biol** 229:319-327, 1993.
- KOST, A., CONDREAY, J.P., JARVIS, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature biotechnology** 23:567-575, 2005.
- KOTA, M., DANIELL, H., VARMA, S., GARCZYNSKI, S.F., GOLD, F., MOAR, W. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proc Natl Acad Sci** 96:1840-1845, 1999.
- KOZIEL, M.G., BELAND, G.L., BOWMAN, C., CAROZZI, N.B., CRENSHAW, R., CROSSLAND, L., DAWSON, J., DESAI, N., HILL, M., KADWELL, S., LAUNIS, K., LEWIS, K., MADDOX, D., McPHERSON, K., MEGHJI, M.R., MERLIN, E., RHODES, R., WARREN, G.W., WRIGHT, M., EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing and insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology** 11:194-200, 1993.
- KRIEG, A. Is the potential pathology of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **J. Invertebr. Pathol.**, 18: 425-426, 1971.
- KRIEGER, I.V., REVINA, L.P., KOSTINA, L.I., BUZDIN, A.A., ZALUNIN, I.A., CHESTUKHINA, G.G., STEPANOV, V.M. Membrane proteins of *Aedes aegypti* larvae bind toxins Cry4B and Cry11A of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Israelensis*. **Biochemistry** 64:1163-1168, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685, 1970.

- LEE, M.K., CURTIS A., ALCANTARA,E, DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gypsi moth, *Lymantria dispar*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:583-586, 1996.
- LEONARD, C. CHEN, Y., MAHILLON, J. Diversity and different distribution of *IS231*, *IS232* and *IS240* among *bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides*. **Microbiology** 143:2537-2547, 1997.
- LERECLUS, D., MAHILLON, J., MENOUE, G., LECADET, MM. Identification of *Tn4430*, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** 204:52-57, 1986.
- LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADET, M.M., KLIER, A., RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I., SLEPECKY, R.A., SETLOW, P. (eds) **Regulation of procaryotic development: structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination**. Washington: American Society for Microbiology,; 1989. p255-276.
- 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.**, 172: 3172-3179, 1990.
- LI, J., CARROLL, J. AND ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, 353: 815-821, 1991.
- LIÃO, C., HECKEL, D.G., AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera*

- (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **J Invertebr Pathol** 80:55-63., 2002.
- LUCKOW V.L., SUMMERS, M.D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Bio/Technology**, 6:47-55, 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 foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. virol.**, 67: 4566-4579, 1993.
- MAHILLON, J., REZSOHHAZY, R., HALLET, B., DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica** 93: 13-26, 1994.
- MARTENS, J.W., HONÉE, G., ZUIDEMA, D., VAN LENT, J.W.M., VISSER, B., VLAK, J.M. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. **Appl Environ Microbiol** 56:2764-2770, 1990.
- MARTENS, J.W., KNOESTER, M., WEIJTS, F., GROFFEN, S.J., HU, Z., BOSH, D., VLAK, J.M. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. **J Invertebr Pathol** 66:249-257, 1995.
- MARTINS, E. S. **Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga.** 2005. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde.
- MARTINS, E. S. ; AGUIAR, R. W. DE S. ; MARTINS, N. F. ; MELATTI, V. M. ; FLACÃO, R. ; GOMES, A. C. M. M. ; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. .

Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

McCLINTOCK, J.T., SCHAFFER, C.R., SJOBLAD, R.D. A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Pest. Sci.** 45: 95-105, 1995.

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

MILLER, L.K., ADANG, M.J., BROWNE, D. Protein kinase activity associated with extracellular and occluded forms of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol** 46:275-278, 1983.

MIRALLES, M.P., PÉREZ, 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, 2004. p.207-232.

MOAR, W.J., TUMBLE, J.T., HICE, R.H., BACKMAN, P.A. Insecticidal activity of the CryIIA protein from NRD-12 isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 896-902, 1994.

MONNERAT, R.G., BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**. MELO, J. L. (ed) Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 3: 163-200, 2000.

- MONNERAT, R.G., SILVA S.F., SILVA-WERNECK, J.O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactéria do gênero *Bacillus*. Brasília:** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65p. 2001.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annu Rev Entomol** 44:257-289, 1999.
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection- reality and prospects. **Crop Protection** 19:669-676, 2000.
- O'REILLY, D.R., MILLER, L.K., LUCKOW, V.A. **Baculovirus expression vectors:** A Laboratory Manual, New York:Freeman; 1992.
- OHBA, M., AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. **J. Invertebrate Pathol.**, 47: 277-282, 1986.
- PANG, Y., FRUTOS, R., FEDERICI, B.A. Synthesis and toxicity of full length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells a baculovirus vector. **J Gen Virol** 73:89-101, 1992.
- PÉREZ, V.J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A., CERON, J. (Ed) ***Bacillus thuringiensis en el control biológico***. Bogotá: Colombia., 2004. p. 207-232
- PIELCHER, C.D. RICE, M.E., OBRYCKI, J.J. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera:Noctuidae). **Journal of Econ. Entomol.** 90:669-678, 1997.
- POLANCZYK, R.A. Estudos de *bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda*. **Tese de Doutorado**. ESALQ, Piracicaba, SP, 2004.
- POLANCZYK, R.A, ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência** 7:1-10, 2003.

- POSSE, R.D. Baculovirus as expression vectors. **Curr Opin Biotechnol** 8:569-572, 1997.
- PRIEST, F.G., GOODFELLOW, M., TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **J. Gen. Microbiol.** 134: 1847-1882, 1988.
- PRIETO-SAMSÓNOV, D.S., VÁZQUEZ-PÁDRON, R.I., AYRA-PARDO, C., GONZÁLEZ-CABRERA, J., de La RIVA, G.A. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 19:202-219, 1997.
- RASKO D.A., ALTHERR, M.R., HAN, C.S., RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 303-329, 2005.
- REDDY, S.T., KUMAR, N.S., VENKATESWERLU, G. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. **Biotechnol.Lett.** 20:, 279-281, 1998.
- RIBEIRO, B.M., CROOK, N.E. Expression of full length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. **J Invertebr Pathol** 62:121-130, 1993.
- RIBEIRO, B.M., CROOK, N.E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. **Braz J Med Biol Res** 31:763-769, 1998.
- ROBERTSON, J.L., PREISLER, H.K., Ng, S.S., HICKLE, L.A., GELERNTER, W.D. Natural variation: a complicating factor in bioassay with chemical and microbial pesticides. **J Econ Entomol** 88:1-10, 1995.
- RODRIGUES, J.C.M., DE SOUZA, M.L., O'REILLY, D.R., VELLOSO, L.M., PINEDO, F.J.R., RAZUCK, F.B., RIBEIRO, B., RIBEIRO, B.M. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes** 22:103-112, 2001.

- SALLES, J.F., GITAHY, P.M., SKOT, L., BALDANI, J.I. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian J. Microbiol.** 31:154-160, 2000.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd edn., New York: Cold Spring Harbor; 1989.
- SAMPSON, M.N., GOODAY, G.W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology** 144:2189-2194, 1998.
- SASAKI, J., ASANO, S., HASHIMOTO, N., LAY, B.W., HASTOWO, S., BANDO, H., IIZUKA, T. Characterization of a *cry2A* gene cloned from an isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto*. **Curr Microbiol** 35:1-8, 1997.
- SCHNEPF, H.E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol Rev** 62:775-806, 1998.
- SERAFINI, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.A. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 433p, 2002.**
- SHAO, X.M., YU, Z. Enhanced expression of insecticidal crystal protein in wild *Bacillus thuringiensis* strains by a heterogenous protein P20. **Current Microbiol.** 48:321-326, 2004.
- SHAO, Z., LIU, Z., YU, Z. Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:5362-5369, 2001.
- SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. G. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Circular Técnica, 2001. v. 10, p. 1-5.

- SLACK, J.M., ARIF, B.M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. **Advances in Virus Res** 69:99-165, 2007.
- SMITH, G. E., FRASER, M. J., SUMMERS, M. D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyedrosis virus genome: deletion mutations the polyhedron gene. **J. Virology**, 46: 584-493, 1983.
- SMITH, G.E., VLAK, J.M., SUMMERS,M.D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyedrosis virus transcript for polyhedrin and a 10,000 molecular weight protein *Spodoptera frugiperda*. **J Virology**, 45: 215-225
- STAPLES, N., ELLAR, D., CRICKMORE, N. Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystalization factor. **Curr Microbiol** 42:388-392, 2001.
- SZEWCZYK, B., HOYOS-CARVAJAL, L., PALUSEK, M., SKRZECZ, I., LOBO DE SOUZA, M. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. **Biotechnology Adv** 24:143-160, 2006.
- TABASHNIK, B.E., FINSON, N., JOHNSON, M.W., MOAR, W.J. Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* causes minimal cross resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Appl. Environ Microbiol** 59:1332-1335, 1993.
- 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.**, 6: 1211-1217, 1992.

- THIERY, I., DELECLUSE, A., TAMAYO, M.C., ORDUZ, S. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. **Appl. Environm. Microbiol.** 63: 468-472, 1997.
- THOMAS, W.E., ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: Effects on insect and mammals cells in vitro and in vivo. **J.Cell Sci.** 60:181-197, 1983.
- TOJO, A., AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. **Appl. Environm. Microbiol.** 45: 576-580, 1983.
- VAECK, M., REYNAERTS, A., HÖFTE, H., JANSENS, S., De BEUKELLER, M., DEAN, C., ZABEAU, M., Van MONTAGU, M., LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature** 328:33-37, 1987.
- VAN RIE, J., JANSENS, S., HOFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **Eur. J. Biochem.** v. 186, p.239–247. 1989.
- VAUGHN, J.L., GOODWIN, R.H., TOMPKINS, G.J., McCAWLEY, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera;Noctuidae). **In Vitro** 13: 213-217, 1977.
- VILARINHOS, P.T.R., DIAS, J.M.C.S., ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de Culicídeos e Simulídeos. In: ALVES, S.B (ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba:FEALQ, 1998. p. 447-480

- VISICK, J.E., WHITELEY, H.R. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. **J.Bacteriol.** 172:1748-1756, 1991.
- VOLKMAN, L.E., KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars Virol** 1:249-256. 1990.
- WANG, X., OOI, B.G., MILLER, L.K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene** 100:131-137, 1991.
- WARD, E.S., ELLAR, D.J., CHILCOTT, C.N. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. **J. Mol. Biol.** 202: 527-535, 1988.
- WIDNER, W.R., WHITELEY, H.R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* possess different host range specificities. **J Bacteriol** 171:965-974, 1989.
- WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **An. Rev. Microbiol.**, 40, 549-576, 1986.
- WONG, H. C., SCHNEPF, H. E, WHITELEY, H. R. Transcriptional and translational start sites of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **J. Biol. Chem.**, 258: 1960-1967, 1983.
- WONG, H. C., CHANG, S. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 3233-3237, 1986.
- WU, D., CAO, X.L., BAI Y.Y., AROSON A.L Sequencing of an operon containing a novel δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** .81:31-36, 1991.

- 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.** 42:697-702, 1995.
- YAMAGIWA, M., SAKAGAWA, K., SAKAI, H. Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68:523-528, 2004.
- YAMAMOTO, T., MCLAUGHLIN, R.E. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. **Biochem Biophys Res Commun** 103:414-421, 1981.
- YU, G. 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.**, 63: 532-536, 1997.