

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Vinícius Fiuza Dumas

Orientadora: Dra. Rose Gomes Monnerat

Co-orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade de Brasília, como requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 15 de maio de 2009

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular

Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Vinícius Fiuza Dumas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade de Brasília, como requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Dra. Cynthia Maria Kyaw
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Joseilde Oliveira Silva Werneck
Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Rose Gomes Monnerat
Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Orientadora

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho aos meus pais, pois
sempre acreditaram nos meus sonhos.
Obrigado pelo amor, carinho e apoio
incondicional nos momentos difíceis.**

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiaram e me deram estrutura para buscar meus sonhos, especialmente meus pais, meus irmãos e a Bene.

À Dra. Rose Gomes Monnerat, minha orientadora, pelo carinho, atenção, dicas, conselhos e oportunidades oferecidas. Uma segunda mãe dentro do laboratório. Obrigado por tudo!

Ao professor Bergmann Moraes Ribeiro pela oportunidade concedida, pela grande ajuda na realização desse trabalho e pela paciência quase ilimitada.

À Érica Soares Martins pela paciência absurda, ensinamentos e amizade. Muito obrigado! Não sei nem como agradecer.

Aos meus amigos do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas em especial à Viviane, Felipe, Lílian, Guilherme, Paulo, Edylaine, Murilo, Elias, Rafael, Ete, Murilo, Ana e Luciano. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Willian, Helinho, Dudu, Isabela, Fábio, Rogério, Cláudia, Zilda, Aninha, Luciana e Ramón.

Aos meus amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, em especial ao Roberto, Gláucia, Maria, Annabele, Aline e Clarinha.

À Cla e Nat, pessoas especiais que tiveram muita paciência e compreensão durante a realização desse trabalho. Obrigado por todo amor e carinho!

À todos os componentes do malagroup e à Elisa pela compreensão, amizade, carinho e conselhos.

À galera da Biologia pelas viagens, curtidas e estudos em grupo.

Aos meus amigos do Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja em especial aos técnicos Fábio e Ivanilda. A dedicação de vocês dois é invejável. Obrigado!

À Ana da Secretaria do Departamento de Biologia Celular pela ajuda, organização e paciência. Muito obrigado!

Às pesquisadoras Cynthia, Joseilde, Débora e Luzia pelas críticas, aprendizados e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

À Universidade de Brasília e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para duas populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).....	18
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. A Cultura da soja.....	20
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	21
2.2.1. Aspectos gerais.....	21
2.2.2. Biologia do inseto.....	22
2.2.3. Controle biológico.....	24
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
2.3.1. Breve histórico.....	24
2.3.2. Características gerais.....	26
2.3.3. Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
2.3.4. Estrutura tridimensional das proteínas Cry.....	31

2.3.5. Modo de ação das δ -endotoxinas.....	32
2.3.6. Proteínas Cry com atividade para Lepidópteros.....	37
2.4. Resistência de insetos às toxinas de Bt.....	39
2.4.1. Defeito na ativação das proteínas Cry.....	42
2.4.2. Modificações dos sítios de ligação.....	43
2.4.3. Elevada resposta imune e produção de esterases intestinais.....	43
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. Objetivo geral.....	45
3.2. Objetivos específicos.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Criação de <i>A. gemmatalis</i>	46
4.2. Purificação, solubilização e quantificação das proteínas.....	46
4.3. Ativação das proteínas com tripsina.....	47
4.4. Ativação das proteínas com suco gástrico.....	47
4.5. Biotinilação das proteínas.....	48
4.6. Extração das “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs).....	49
4.7. Ensaio de ligação.....	49
4.8. Ensaio de competição heteróloga.....	50
4.9. Ensaio para a determinação do tamanho do receptor.....	51
4.10. Bioensaios com a mistura de esporos e cristais.....	52
4.11. Bioensaios com as proteínas purificadas.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. Purificação e solubilização das proteínas.....	54
5.2. Ativação das proteínas com tripsina.....	55
5.3. Ativação das proteínas com suco gástrico.....	55

5.4. Biotinilação das proteínas.....	59
5.5. Ensaio de ligação.....	60
5.6. Ensaio de competição heteróloga.....	63
5.7. Ensaio para determinação do tamanho do receptor.....	65
5.8. Bioensaios para <i>A. gemmatalis</i> : mistura de esporos e cristais.....	67
5.9. Bioensaios para <i>A. gemmatalis</i> : proteínas purificadas.....	71
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CAPÍTULO II: Clonagem do gene <i>cyt1Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> no genoma do baculovirus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AcMNPV) e em uma estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> acristalífera.....	
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	91
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	91
2.1.1. Aspectos gerais.....	91
2.1.2. Biologia do inseto.....	92
2.1.3. Controle biológico.....	93
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	94
2.2.1. Aspectos gerais das proteínas Cyt.....	94
2.2.2. Estrutura tridimensional das proteínas Cyt.....	95
2.2.3. Modo de ação das proteínas Cyt.....	96
2.2.4. Sinergismo das proteínas Cyt com as proteínas Cry.....	98
2.2.5. Expressão homóloga e heteróloga das proteínas de Bt.....	99
2.3. Baculovírus.....	101
2.4.1. Histórico e características gerais.....	101
2.4.2. Replicação viral.....	102
2.4.3. Modo de ação.....	103

3. OBJETIVOS.....	106
3.1. Objetivo geral.....	106
3.2. Objetivos específicos.....	106
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	107
4.1. Células e vírus.....	107
4.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene <i>cyt1Aa</i>	107
4.3. Construção do plasmídeo pFastcyt1Aa.....	109
4.4. Purificação do vírus recombinante vFastcyt1Aa.....	110
4.5. Construção do plasmídeo pSVPcyt1Aa.....	113
4.6. Transformação do Bt acristalífero.....	114
4.7. Análises da expressão da proteína Cyt1Aa.....	114
4.8. Análise da toxicidade da proteína Cyt1Aa para larvas de <i>A.aegypti</i>	116
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
5.1. Amplificação e clonagem do gene <i>cyt1Aa</i> no vetor pGEM®-T Easy.....	117
5.2. Seqüenciamento do gene <i>cyt1Aa</i>	118
5.3. Clonagem do gene <i>cyt1Aa</i> no vetor pFastBac™1.....	119
5.4. Construção do bacmídeo recombinante.....	121
5.5. Construção do plasmídeo pSVPcyt1Aa.....	123
5.6. Transformação do Bt acristalífero.....	125
5.7. Análise da expressão da proteína Cyt1Aa.....	125
5.8. Toxicidade da proteína Cyt1Aa.....	128
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para duas populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)

Figura 1: Estádios de desenvolvimento da <i>Anticarsia gemmatalis</i>	23
Figura 2: Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry.....	30
Figura 3: Representação esquemática da estrutura das proteínas Cry.....	31
Figura 4: Representação esquemática do processamento proteolítico de algumas proteínas Cry.....	33
Figura 5: Receptores moleculares das proteínas Cry1A.....	34
Figura 6: Modo de ação das toxinas Cry.....	36
Figura 7: Representação esquemática do novo modelo proposto para o modo ação das proteínas Cry.....	37
Figura 8: Esquema dos fatores que podem ocasionar o surgimento de resistência dos insetos às proteínas de Bt.....	42
Figura 9: Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%.....	55
Figura 10: Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A com tripsina (SDS-PAGE a 12%).....	56
Figura 11: Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab ativadas com tripsina, proteases de <i>A. gemmatalis</i> susceptíveis e proteases de <i>A. gemmatalis</i> resistentes.....	58
Figura 12: Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Ac e Cry2Aa ativadas com tripsina, proteases de <i>A. gemmatalis</i> susceptíveis e proteases de <i>A. gemmatalis</i> resistentes.....	58
Figura 13: Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A (SDS-PAGE a 12%).....	60

Figura 14: Ensaio de ligação das proteínas solubilizadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A aos receptores intestinais das populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis*.....61

Figura 15: Ensaio de ligação das proteínas ativadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A aos possíveis receptores intestinais de populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis*.....62

Figura 16: Ensaio de competição heteróloga das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A aos receptores intestinais de populações de *A. gemmatalis* susceptível e resistente.....63

Figura 17: Ensaio de ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A aos possíveis receptores intestinais de *A. gemmatalis*.....66

CAPÍTULO II: Clonagem do gene *cyt1Aa* de *Bacillus thuringiensis* no genoma do baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e em uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* acristalífera

Figura 1: Estádios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*.....92

Figura 2: Representação esquemática da estrutura da toxina Cyt1Aa.....96

Figura 3: Representação esquemática das hipóteses do modo de ação das proteínas Cyt1A.....97

Figura 4: Interação das toxinas Cyt e Cry em larvas de dípteros.....98

Figura 5: Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus.....105

Figura 6: Mapa físico do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega).....108

Figura 7: Mapa físico do plasmídeo pFastBacTM1 (Invitrogen).....109

Figura 8: Esquema de construção de baculovírus recombinates via transposição (sistema Bac-to-Bac, Invitrogen).....111

Figura 9: Mapa físico do plasmídeo pSVP27A.....113

Figura 10: Clonagem do gene *cyt1Aa* no pGEM®-T Easy.....117

Figura 11: Seqüência completa do gene <i>cytIAa</i> clonado da estirpe S1806.....	119
Figura 12: Clonagem do gene <i>cytIAa</i> no pFastBac TM 1.....	120
Figura 13: Confirmação da transposição do gene <i>cytIAa</i> por PCR.....	121
Figura 14: Clonagem do gene <i>cytIAa</i> no vetor pSVP27A.....	124
Figura 15: Confirmação da transformação de Bt acristalífero com o plasmídeo pSVPcyt1Aa.....	125
Figura 16: SDS PAGE e Imuno-marcação de extrato de proteínas totais da estirpe de Bt transformada com o gene <i>cytIAa</i>	126

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I: Avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para duas populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)

Tabela 1: Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose com as proteínas liofilizadas contra *A. gemmatalis*.....53

Tabela 2: Resultado dos bioensaios para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* utilizando as estirpes liofilizadas, que produzem as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, e a estirpe S1450 (Btk).....69

Tabela 3: Resultado dos bioensaios para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* utilizando as proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa expressas em Bt.....72

CAPÍTULO II: Clonagem do gene *cyt1Aa* de *Bacillus thuringiensis* no genoma do baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e em uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* acristalífera

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *cyt1Aa*.....108

Tabela 2: Bioensaio seletivo para larvas de segundo instar de *A. aegypti* utilizando estirpes de Bt transformadas, que produzem a proteína Cyt1Aa isoladamente.....128

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CL ₅₀	Concentração que mata 50% da população testada
cm ²	Centímetros quadrado
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ditiotreitol
g	Gramma
h.p.i	Horas pós infecção
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilo bases = 1000 pares de base
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
MDa	Megadalton
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ng	Nanograma
ORF	Região aberta de leitura
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
v/v	Volume/volume
X-Gal	5-cromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo
μM	Micromolar (micromol por litro)
μL	Microlitro
μg	Micrograma

RESUMO

Nas últimas décadas, a agricultura mundial vem crescendo exponencialmente. Culturas como as da soja recebem destaque por influenciarem na geração de divisas e empregos em todo mundo. Essa cultura está vulnerável a diversas pragas, dentre estas, destaca-se a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), que é a principal desfolhadora da soja no Brasil. Além de provocar danos econômicos no setor agrícola, os insetos podem causar problemas relacionados à saúde pública. O principal exemplo é o *Aedes aegypti*, que é o vetor de doenças como a dengue e a febre amarela. Uma alternativa para o controle desses insetos é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria possui a capacidade de produzir inclusões protéicas (proteínas Cry e Cyt) tóxicas para insetos e são largamente utilizadas no controle de pragas na agricultura e no controle de vetores de doenças humanas. Desta forma, o estudo do modo de ação e toxicidade dessas proteínas é importante para um melhor entendimento dos mecanismos de interação entre o patógeno e as pragas. Este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade de quatro proteínas Cry de *B. thuringiensis* para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis*, e a construção de um baculovírus e de uma estirpe de Bt recombinantes contendo o gene *cyt1Aa*. Para o primeiro trabalho, as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram expressas individualmente por estirpes de Bt. As proteínas foram purificadas, solubilizadas, ativadas com tripsina e biotinizadas para a realização de bioensaios, ensaios de ligação e ensaios de competição heteróloga. O ensaio de ligação mostrou que ocorreu interação entre todas as proteínas e os receptores das duas populações de lagartas. O ensaio de competição heteróloga e os bioensaios demonstraram haver competição das proteínas pelos mesmos sítios de ligação para a população resistente de *A. gemmatalis* e que essa população tornou-se resistente, provavelmente, devido a alterações nos seus receptores. Além disso, os resultados obtidos nos bioensaios demonstraram que, apesar de todas as toxinas testadas apresentarem toxicidade para lagartas de segundo instar de *A. gemmatalis*, as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac possuem toxicidade elevada quando comparadas com as outras proteínas testadas. No segundo trabalho, o gene *cyt1Aa* da estirpe S1806 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, foi amplificado por PCR, clonado em um vetor de clonagem e seqüenciado. A análise da seqüência do gene mostrou 100% de identidade

com o gene *cyt1Aa* depositado no GenBank. O gene foi removido do vetor de clonagem, introduzido em um vetor de transferência (pFastBacTM1) e transferido para o genoma do baculovírus AcMNPV, utilizando o sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen), originando o baculovírus recombinante vFastCyt1Aa. Entretanto, a expressão da proteína recombinante não foi detectada em células de inseto infectadas com o vFastCyt1Aa. Além disso, o gene *cyt1Aa* foi inserido em um vetor de expressão para células de Bt (pSVP27A) e o plasmídeo recombinante (pSVPcyt1Aa) foi introduzido em uma estirpe de Bt acristalífera. Uma proteína de 27 kDa correspondente ao tamanho esperado para a proteína recombinante Cyt1Aa foi detectada por SDS-PAGE e Western-Blot de extratos de Bt recombinante. Entretanto, o extrato do Bt recombinante mostrou baixa toxicidade para mosquitos.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, baculovírus, proteínas Cry e Cyt

ABSTRACT

In the last decades, the world agriculture has grown exponentially. Crops like soybean have an important role in increasing foreign exchange and jobs all over the world. However, this crop is vulnerable to a diversity of insect pests that cause great economic losses. Among these insect pests, the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1918 (Lepidoptera: Noctuidae) is the main defoliator of soybean in Brazil. Besides the economic damage in agriculture, insects can also cause public health problems. *Aedes aegypti*, the vector of the dengue and yellow fever diseases is the main example. One alternative to control this insect is the use of biological control agents such as *Bacillus thuringiensis* (Bt). This bacterium produces protein inclusions (Cry and Cyt proteins) that are toxic to insects and are widely used for the control of insect pests in agriculture and for the control of human disease vectors. Therefore, the study of the toxins mode of action and toxicity has a great importance for understanding the mechanisms of interaction between insect pests and their pathogens. The aim of this study was the toxicity determination of four Cry proteins of *B. thuringiensis* to resistant and susceptible *A. gemmatalis* populations, and the construction of recombinant baculovirus and Bt containing the *cyt1Aa* gene. For the first work, the proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa were expressed individually by Bt strains. The proteins were purified, solubilized, activated with trypsin and biotinilated for bioassays, binding assays and heterologous competition assays. The binding assay showed binding affinities between all the proteins and the receptors in both populations of caterpillars. The heterologous competition assay and the bioassays showed competition between proteins for the same binding site in the resistant population of *A. gemmatalis* and this population became resistant probably because of modifications in their receptors. Besides that, the results of the bioassays demonstrate that Cry1Ab and Cry1Ac have higher toxicity to second instar larvae of *A. gemmatalis* when compared to the others toxins tested. In the second work, the *cyt1Aa* gene from the strain S1806 of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* was amplified by PCR, cloned in a vector and sequenced. The sequence analyses showed that the cloned gene from strain S1806 has 100% identity with a *cyt1Aa* gene deposited in GenBank. The gene was removed from the cloning vector, introduced into a transfer vector (pFastBacTM1) and transferred to the baculovirus genome AcMNPV, using the Bac-to-Bac[®] system (Invitrogen),

originating the recombinant baculovirus vFastCyt1Aa. However, no recombinant protein expression was detected in insect cells infected with vFastCyt1Aa. Furthermore, the *cyt1Aa* gene was also inserted in an expression vector for Bt cells (pSVP27A) and the recombinant plasmid (pSVPcyt1Aa) introduced into an acrySTALLIFEROUS strain of Bt. A 27 kDa protein of the expected size for the recombinant Cyt1Aa was detected by SDS-PAGE and Western-Blot in recombinant Bt extracts. However, the recombinant Bt extracts showed low toxicity towards mosquitoes.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, *Anticarsia gemmatalis*, *Aedes aegypti*, baculovirus, proteins Cry and Cyt.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA DUAS POPULAÇÕES DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

1 - INTRODUÇÃO

Em todo mundo, os ataques de insetos-praga nas monoculturas têm aumentado a preocupação com os impactos causados na produção. Essas monoculturas possuem diversas pragas que podem provocar danos econômicos significativos todos os anos. Os insetos têm sido uma das maiores causas de danos na produção de alimentos sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial (Estruch *et al.*, 1997).

Dentre as principais pragas agrícolas, destaca-se a *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Essa lagarta é a principal desfolhadora da soja no Brasil, sendo considerada um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros. O inseto, no seu estado larval, alimenta-se das folhas jovens provocando grandes danos à lavoura de soja, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta (Praça *et al.*, 2006).

O uso massivo de inseticidas químicos no controle das pragas agrícolas, muitas vezes de forma inadequada, tem causado desequilíbrios nos ecossistemas, por poluir o meio ambiente, atuar negativamente sobre os inimigos naturais e promover o surgimento de populações de insetos resistentes. A importância dada ao controle de pragas e o aumento da consciência da população para os efeitos diretos e indiretos dos pesticidas, na saúde pública e no ambiente em geral, têm demandado a utilização de novas formas de controle, que sejam mais econômicas e menos danosas ao meio ambiente. Sendo assim, uma alternativa viável para o combate de insetos-praga é a utilização de entomopatógenos, que incluem vírus, bactérias e fungos (Moraes & Capalbo, 1986).

Entre os agentes microbianos com atividade entomopatogênica, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria é caracterizada pela produção de inclusões protéicas cristalinas, que são tóxicas para vários grupos de insetos (Feitelson *et al.*, 1992). Estas inclusões são compostas por proteínas, conhecidas como proteínas Cry, que são produzidas sob forma de protoxinas, sendo transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A proteína ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (Aronson *et al.*, 1986).

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas. Além disso, essa bactéria não possui efeito poluente ao meio ambiente, pois é inócua aos mamíferos, outros invertebrados e às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986). Outra vantagem proporcionada por essa bactéria é o desenvolvimento de culturas de plantas transgênicas contendo genes de proteínas Cry. Essas culturas modificadas geneticamente são capazes de produzir toxinas específicas de *B. thuringiensis*, que são tóxicas a insetos. Desse modo, as plantas transgênicas constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção contra os ataques de insetos-praga.

Desde 1996, várias culturas transgênicas, conhecidas como plantas-Bt, surgiram para controlar de forma eficiente as pragas e diminuir a utilização de inseticidas químicos (Kleter *et al.*, 2007). Apesar de essas culturas serem uma alternativa interessante no controle de pragas, elas podem ocasionar alguns problemas como o surgimento de populações resistentes (Tabashnik *et al.*, 2008). Portanto, o estudo da atividade das toxinas de Bt contra populações susceptíveis e resistentes de lagartas, e suas interações com os receptores das células epiteliais desses insetos torna-se muito importante para a melhor compreensão do modo de resistência dos insetos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de quatro proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa) tóxicas a *A. gemmatalis* e avaliar a interação dessas proteínas com receptores intestinais extraídos de uma população de *A. gemmatalis* resistente e outra susceptível ao produto biológico Dipel, que possui o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* estirpe HD-1 como seu principal ingrediente ativo.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - A Cultura da Soja

A soja (*Glycine max*) é um grão rico em proteínas, cultivado como alimento tanto para humanos quanto para animais. A soja pertence à família Fabaceae, assim como o feijão, a lentilha e a ervilha (ERS-USDA, 2008). A soja hoje cultivada no mundo é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Sua evolução ocorreu por sucessivos processos de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (Silva *et al.*, 2004).

A soja é uma cultura cuja origem se atribui ao continente asiático, principalmente na China, onde é utilizada há mais de 5.000 anos na alimentação. Sua disseminação para outros países ocorreu pelo estabelecimento de novas rotas comerciais. Nos séculos XV e XVI, a soja foi introduzida em países como Japão, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Índia, entre outros (Silva *et al.*, 2004).

Apesar de conhecida como grão sagrado e explorada intensamente na dieta alimentar do Oriente, o Ocidente ignorou seu cultivo até a segunda década do século XX, quando os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial. No Brasil, o desenvolvimento da soja iniciou-se por volta de 1882. Entretanto, nas décadas seguintes os primeiros cultivares de soja foram estudados com o propósito de avaliar seu desempenho como forrageira e na rotação de culturas. Em meados dos anos 60, a área cultivada para a produção de grãos cresceu de forma exponencial, não apenas nos Estados Unidos, como também no Brasil e na Argentina, principalmente. Apesar do significativo crescimento da produção nos anos 60, foi na década seguinte que a soja consolidou-se como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas em 1979 (Silva *et al.*, 2004).

Em 2004, o Brasil foi o segundo produtor mundial com produção de 50 milhões de toneladas ou 25% da safra mundial, montante menor que o de 2003, quando o País produziu 52 milhões de toneladas. Em 2006, o Brasil manteve-se entre os grandes produtores de soja, apresentando uma produção semelhante à de 2003 (Silva *et al.*, 2004). Atualmente, a produção nos países da América do Sul ultrapassa os Estados Unidos. Em conjunto, os países produtores do Cone Sul produzem 47% de toda a soja

do mundo. Os três maiores produtores são Brasil, que participa com 57% da produção sul-americana, seguido pela Argentina, com 40% e pelo Paraguai, com 3% (ERS-USDA, 2008).

Algumas regiões do Brasil possuem potencial para aumentar a produtividade de soja, porém esses cultivos são afetados por diversos fatores, que ocasionam perdas irreparáveis aos agricultores. Dentre os principais fatores, destaca-se a ação dos insetos-praga. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam ser controlados.

2.2 - *Anticarsia gemmatalis*

2.2.1 - Aspectos gerais

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie de clima tropical e subtropical com ampla distribuição, ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina (Ford *et al.*, 1975). Esta lagarta, conhecida como “lagarta-da-soja”, é a principal desfolhadora da soja no Brasil, representando um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros (Moscardi, 1998). O inseto, no seu estado larval, alimenta-se das folhas jovens, provocando grandes danos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta.

A soja é capaz de suportar uma desfolha de até 30% antes da floração e de até 15% na fase entre a floração e o desenvolvimento das vagens (Gallo *et al.*, 2002). Porém, em ataques severos, os danos são geralmente elevados, pois as lagartas chegam a desfolhar completamente a planta. Apesar de ser considerada primariamente uma praga de leguminosas (Ford *et al.*, 1975), a lagarta da soja pode causar prejuízos em outras culturas como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, feijão-vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até no período da floração (Fugi, 2003).

2.2.2 - Biologia do inseto

A. gemmatalis Hübner, 1818 é um inseto da ordem Lepidoptera e da família Noctuidae. Dependendo das condições ambientais, esse inseto pode possuir um ciclo biológico de aproximadamente 30 dias (Gallo *et al.*, 2002). Os ovos (Figura 1A) esféricos desse inseto medem aproximadamente 0,5 mm de diâmetro e apresentam coloração branca esverdeada, que tendem a escurecer, devido ao seu desenvolvimento, até a coloração marrom avermelhado (Ellisor, 1942). O seu período de incubação é geralmente de três a cinco dias (Schmidt *et al.*, 2001). A oviposição de *A. gemmatalis* é realizada durante a noite de forma agrupada ou isolada, na face inferior das folhas, nas hastas, pecíolos e caules (Greene *et al.*, 1973; Gallo *et al.*, 2002).

As lagartas recém eclodidas apresentam coloração verde, variando do verde claro ao escuro, com cinco estrias brancas longitudinais sobre o dorso (Schmidt *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2002). Em condições de alta população ou escassez de alimento assumem colorações escuras (Silva, 1981). A temperatura e as condições climáticas podem exercer influência sobre o número de ínstars, assim, o período larval de *A. gemmatalis* apresenta, normalmente, de cinco a seis instares (Gazzoni & Yoriniori, 1995). As lagartas possuem quatro pares de falsas pernas abdominais e podem atingir comprimentos entre 40 e 50 mm (Gazzoni & Yoriniori, 1995). Essas lagartas, nos ínstars iniciais (Figura 1B), comportam-se como a lagarta mede-palmo (Gallo *et al.*, 2002), no entanto em ínstars mais avançados (Figura 1C) são muito ativas e dotadas de grande agilidade. A capacidade de consumo da *A. gemmatalis* cresce com a idade da lagarta e, ao final desta fase, que dura cerca de 12 a 14 dias, um indivíduo pode consumir em média 90 cm² de folhas até completar seu desenvolvimento larval (Gazzoni & Yoriniori, 1995).

A fase de pré-pupa dura em torno de dois dias (Praça *et al.*, 2006). Nesta fase, a lagarta pára de se alimentar, fica encolhida com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso. Nessa fase, as lagartas são encontradas formando um casulo e unindo partículas de fezes por uma espécie de teia (Praça *et al.*, 2006). Em seguida, inicia-se a fase de pupa (Figura 1D), que ocorre a pouca profundidade do solo (Costilla, 1988). Inicialmente, a pupa apresenta coloração verde-clara e em seguida torna-se marrom avermelhada e brilhante. Perto da emergência do adulto, a pupa adquire uma coloração quase preta e pode medir em torno de 17 a 20 mm. A duração do período pupal é inversamente proporcional à temperatura, isto é, quanto maior a temperatura, menor

será a quantidade de dias dessa fase (Silva,1981; Reid, 1975). De acordo com Gazzoni & Yoriniori (1995), a fase de pupa pode durar em torno de sete a nove dias.

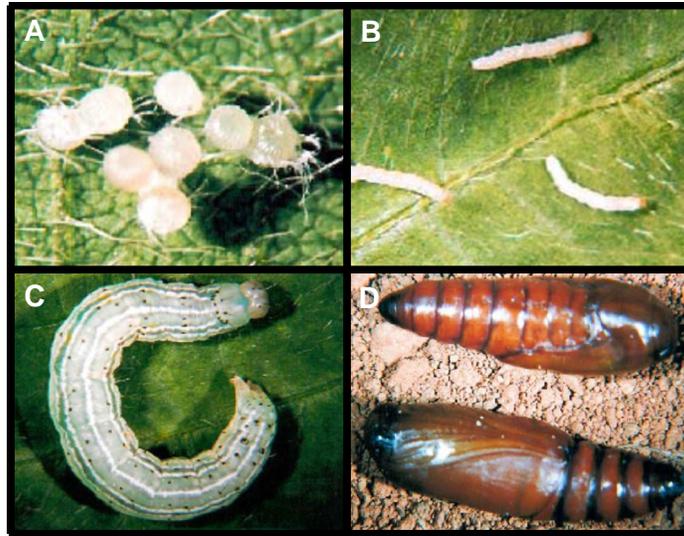


Figura 1. Estádios de desenvolvimento da *A. gemmatalis*. A) Ovos esféricos; B) Lagartas de segundo instar; C) Lagartas de quinto instar; D) Pupas. (Praça *et al.*, 2006).

O adulto é uma mariposa de coloração variada e hábito noturno. Nessa fase, o inseto, geralmente, possui uma coloração pardo-acinzentada e mede em torno de 40 mm (Schmidt *et al.*, 2001). De acordo com Gallo *et al.* (2002), essas mariposas pousam de asas abertas e possuem uma listra transversal escura, que une as pontas das asas. Durante o dia, essas mariposas são encontradas em locais sombreados, porém todo o processo reprodutivo ocorre durante o período noturno (Schmidt *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2002). A longevidade dos adultos de *A. gemmatalis* pode variar em função da temperatura, da fenologia das plantas de soja de que as lagartas se alimentaram e do acasalamento (Fugi, 2003). Em condições de dieta artificial, Moscardi *et al.* (1981a) obtiveram 11,2 dias de longevidade dos adultos a 32,2 °C e 24,8 dias de longevidade dos adultos a 21,1 °C. Em condições de dieta natural (folhas de soja), a longevidade média das fêmeas acasaladas variou de 14,1 dias, quando alimentadas com folhas de plantas senescentes, até 17,5 dias, quando alimentadas com plantas em florescimento (Moscardi *et al.*, 1981b).

2.2.3 - Controle Biológico

Para o controle da *A. gemmatalis* utiliza-se, predominantemente, inseticidas químicos, com até três aplicações por safra, ocasionando enormes prejuízos ambientais e elevados custos aos produtores. Além disso, os inseticidas químicos provocam a redução de inimigos naturais, que contribuem para o controle dessa praga. A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada por vários laboratórios ao redor do mundo devido, principalmente, à necessidade de preservação do meio ambiente (Praça *et al.*, 2006).

O controle biológico de pragas é uma das alternativas encontradas para a redução da utilização de pesticidas químicos. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* mostram várias vantagens sobre o uso de agentes químicos, como sua alta especificidade ao inseto alvo (Schnepf *et al.*, 1998). Atualmente, existem vários produtos biológicos disponíveis no mercado que possuem essa bactéria como princípio ativo. O bioinseticida mais conhecido e utilizado por agricultores é o Dipel da empresa Abbott Laboratories. Esse produto possui o *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, estirpe HD-1, como ingrediente ativo podendo ser encontrado na forma de pó molhável e suspensão concentrada.

Em nível mundial, os produtores perdem bilhões de dólares com a redução da produtividade ocasionada pelo ataque de insetos e pelo alto custo de defensivos agrícolas. Assim, a necessidade de diminuir os custos, minimizar os danos ambientais e reduzir os riscos à saúde dos produtores, tem tornado o *B. thuringiensis* uma alternativa promissora para o controle da *A. gemmatalis*.

2.3 - *Bacillus thuringiensis*

2.3.1 – Breve histórico

A primeira descoberta de doenças em insetos causadas por *Bacillus thuringiensis* data de 1901, quando o biólogo japonês Ishiwata descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade de populações do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. O pesquisador chamou essa nova bactéria de *Bacillus sotto*. Ernst Berliner descreveu a mesma bactéria isolando-a de lagartas da traça da farinha, *Anagasta kuhniella*, na

Alemanha em 1911. Em 1915, Berliner chamou-a de *Bacillus thuringiensis* devido ao local aonde as lagartas foram encontradas (Whiteley & Schnepf, 1986) e reportou a existência de cristais, porém a atividade destes ainda era desconhecida.

Em 1920, fazendeiros começaram a utilizar o *B. thuringiensis* (Bt) como uma alternativa para o controle de insetos na agricultura e, em 1938, uma formulação à base dessa bactéria, a Sporeína, foi produzida na França (Weisier, 1986). Vários outros produtos foram formulados nessa época, porém diversos destes tinham sérias limitações. Os produtos de Bt à base de “sprays” eram rapidamente lavados com a chuva e se degradavam com a radiação solar (UV). Além disso, existiam vários insetos que não eram susceptíveis ao número limitado de estirpes descritas na época, pois a maioria das estirpes conhecidas era tóxica somente para lagartas de lepidópteros (Monnerat & Bravo, 2000).

Nos anos 50, aumentaram os estudos e descobertas a respeito da bioquímica, estrutura e modo geral de ação das inclusões cristalinas de origem protéica de Bt. Desde então, diversos países como Alemanha, Rússia e Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base de Bt (Weisier, 1986). Na década de 60, foi isolada uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Dulmage, 1970) que apresentou toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir dessa descoberta, aumentou-se a procura por estirpes que possuíssem novas toxinas ativas contra outras ordens de insetos.

Antes de 1977, poucas estirpes de Bt tinham sido descritas e todas eram tóxicas somente para algumas espécies de lepidópteros. Neste ano, a primeira subespécie tóxica para dípteros foi identificada (Goldberg & Margalit, 1977). Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi descrita como patogênica para coleópteros (Krieg *et al.*, 1983). Nos anos 80, a utilização de Bt cresceu ainda mais, principalmente quando começaram a surgir populações de insetos altamente resistentes aos inseticidas sintéticos. Além disso, os estudos de cientistas e ambientalistas começaram a relatar os problemas causados pelos produtos químicos aos seres vivos e ao meio ambiente (Monnerat & Bravo, 2000).

Com o avanço da biologia molecular, ficou cada vez mais fácil a inserção e expressão em plantas de genes, que codificam as proteínas entomopatogênicas de Bt. As primeiras plantas transgênicas, expressando toxinas de Bt, foram as de tabaco e tomate e a primeira plantação de milho transgênico foi registrada nos Estados Unidos em 1995 (Fischhoff, 1987; Jouanin *et al.*, 1998). Com o passar dos anos, novas tecnologias foram

sendo desenvolvidas e novas estirpes descobertas demonstrando cada vez mais a importância dessa bactéria e sua utilização no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de saúde pública.

Atualmente, uma grande quantidade de estirpes de Bt foi isolada e caracterizada, e vários laboratórios, no mundo todo, continuam procurando novas toxinas. Estima-se que haja mais de 50.000 estirpes conhecidas em todo o mundo. Dentre estas estirpes, existem aquelas que são eficazes contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (Feitelson *et al.*, 1992).

2.3.2 - Características gerais

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram-positiva, da família *Bacillaceae*, que apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Durante a fase de esporulação, o Bt produz proteínas inseticidas (cristais parasporais) na fase estacionária do seu ciclo de crescimento. Essas bactérias são consideradas de ocorrência ubíqua (Krywunczyk & Fast, 1980) por terem sido isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo *et al.*, 1998).

Os cristais protéicos de *B. thuringiensis* têm sido utilizados como bioinseticidas há mais de 35 anos e sua utilização é uma alternativa viável para o controle de insetos, diminuindo assim, o problema de resistência dos insetos aos pesticidas químicos. Uma das vantagens na utilização de Bt é sua especificidade aos insetos susceptíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986).

As inclusões protéicas cristalinas são compostas por proteínas Cry e Cyt (δ -endotoxinas), que são tóxicas para uma grande variedade de pragas agrícolas e para vetores de doenças, e podem ser visualizadas por microscopia óptica (Bravo *et al.*, 1998; Monnerat & Bravo, 2000). Mais de 350 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram seqüenciados. As δ -endotoxinas estão classificadas em 56 grupos de proteínas Cry, organizados em diferentes subgrupos, e dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de identidade de seus aminoácidos. Portanto, a identidade de seqüências de

aminoácidos das diferentes proteínas Cry e Cyt é a base da nomenclatura dessas proteínas e a atualização constante desses dados pode ser visualizada via Internet no endereço: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/.

2.3.3 - Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamiou, 2000). Além disso, a ação sinérgica dos esporos produzidos com as proteínas Cry também pode contribuir para a patogenicidade apresentada pelos cristais (Johnson & McGaughey, 1996). Todos esses fatores podem contribuir para a patogenicidade da toxina Cry em condições naturais, mas a exata contribuição desses fatores ainda não foi totalmente esclarecida.

A α -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolípidios que formam as membranas celulares de diversos tipos celulares (Faust & Bulla, 1982). Esta toxina é termolábil, solúvel em água e altamente tóxica a alguns insetos quando administrada via oral ou intra-hemocélica. Nesse caso, essa proteína pode causar degeneração e lise de hemócitos (Krieg, 1971; Hansen & Salamiou, 2000). Além disso, a toxina também pode apresentar toxicidade a ratos e outros vertebrados. O gene correspondente a essa exotoxina já foi clonado e seqüenciado (Lechner *et al.*, 1989).

As β -exotoxinas, também conhecidas como Thuringiensinas, são toxinas termoestáveis produzidas por certas estirpes de Bt durante a fase vegetativa. Existem dois tipos de β -exotoxinas, que são secretadas no meio de cultura. A toxina do tipo I é um análogo do ATP composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 Daltons (Farkas *et al.*, 1969). Esta toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP, sendo altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamiou, 2000). A toxina do tipo II é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à do tipo I, principalmente para coleópteros (Levinson *et*

al., 1990). Segundo esses autores, os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxinas estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa.

As proteínas “Vip” (*vegetative insecticidal proteins*) são proteínas produzidas e secretadas por algumas estirpes de Bt durante sua fase vegetativa e de esporulação. Essas proteínas são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Estruch *et al.*, 1996).

As proteínas Vip foram excluídas da nomenclatura Cry por não possuírem homologia com a sequência ou estruturas das δ -endotoxinas. Em concentrações letais, a Vip3A causa paralisia e lise das células epiteliais do intestino médio dos insetos. Essas manifestações físicas da intoxicação provocada pela Vip3A lembram aquelas das proteínas Cry (Yu *et al.*, 1997). O gene *vip3A* codifica uma proteína de aproximadamente 88,5 kDa, que possui atividade tóxica para insetos pouco sensíveis à maioria das δ -endotoxinas, tais como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera exigua*. Além disso, essas proteínas demonstram ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas proteínas Cry, mas principalmente contra larvas de lepidópteros (Loguercio *et al.*, 2002).

As δ -endotoxinas, também conhecidas como proteínas Cry e Cyt, são toxinas produzidas por estirpes de Bt. As proteínas Cry formam inclusões parasporais em Bt que exibem efeito tóxico a um organismo alvo, ou possuem uma sequência bastante similar a uma proteína Cry conhecida, mas sem efeito tóxico conhecido. Por outro lado, as proteínas Cyt formam inclusões protéicas parasporais de Bt que exibem atividade citolítica, ou possuem uma sequência similar a uma proteína Cyt conhecida. O processo de formação do cristal está ligado à esporulação, em que essa estrutura é formada a partir do segundo estágio de esporulação e é liberada no momento em que as células são lisadas (Monnerat & Bravo, 2000).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas como, por exemplo, no *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 14 e 142 kDa (Schnepf *et al.*, 1998). Dependendo da composição da protoxina, o cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou, ainda, sem forma

definida. Essa habilidade de cristalização das protoxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (Schnepf *et al.*, 1998).

As proteínas Cry e Cyt pertencem a uma classe de toxinas formadoras de poros (TFP), que são secretadas como proteínas solúveis em água, passando por modificações estruturais para a sua inserção e o seu translocamento na membrana celular do hospedeiro. Existem dois principais grupos de TFP: as toxinas α -hélice (α -helicoidais), nas quais a região α -hélice forma um poro na membrana, e as toxinas β -barril, que se inserem na membrana formando um β -barril composto de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas (Parker e Feil, 2005 citado por Bravo *et al.*, 2007). O primeiro grupo de proteínas inclui as proteínas Cry contendo três domínios, enquanto o segundo grupo inclui as proteínas Cyt. No geral, as bactérias secretam esses tipos de toxinas, que interagem com um receptor específico localizado na superfície celular do hospedeiro (Bravo *et al.*, 2007).

As δ -endotoxinas são classificadas a partir da homologia da seqüência dos aminoácidos, em que cada protoxina possui um nome baseado no recurso mnemônico (Cry ou Cyt) e quatro etapas hierárquicas que consistem em: números, letras maiúsculas, letras minúsculas e números (Exemplo: Cry25Aa1), de acordo com a posição da proteína na árvore filogenética. As proteínas com menos de 45% de identidade na sua seqüência de aminoácidos diferem no primeiro quesito (Exemplo: Cry1 e Cry2), enquanto 78% e 95% de identidade constituem os limites para os quesitos secundários e terciários, respectivamente (Crickmore *et al.*, 1998).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos permite uma visão das relações evolucionárias entre as diferentes classes de proteínas Cry, revelando a presença de cinco blocos de seqüências conservadas (Figura 2), o que sugere que eles sejam importantes para a função biológica dessas proteínas, principalmente por se localizarem nas regiões internas da proteína e na região de contato entre domínios. Isso também permite dizer que as proteínas Cry formam uma família com blocos similares e mecanismos de ação muito semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000).

O primeiro grupo é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9 e Cry10, que são muito relacionadas e suas toxinas ativas compartilham cinco blocos de significativa homologia (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1993; Baum & Malvar, 1995). Um segundo grupo é formado pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry 21, onde se observa homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, sendo encontrada uma variabilidade do bloco conservado 1 em relação aos grupos 1 e 2. As

proteínas do segundo grupo apresentam uma variante no bloco 2 e o terceiro bloco completamente ausente (Schnepf *et al.*, 1998). Para ambos os grupos, quando a proteína apresenta a região C-terminal, os blocos 6, 7 e 8 estão invariavelmente presentes. O terceiro grupo é formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, constituído pelo bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2. (Schnepf *et al.*, 1998; Lereclus *et al.*, 1993).

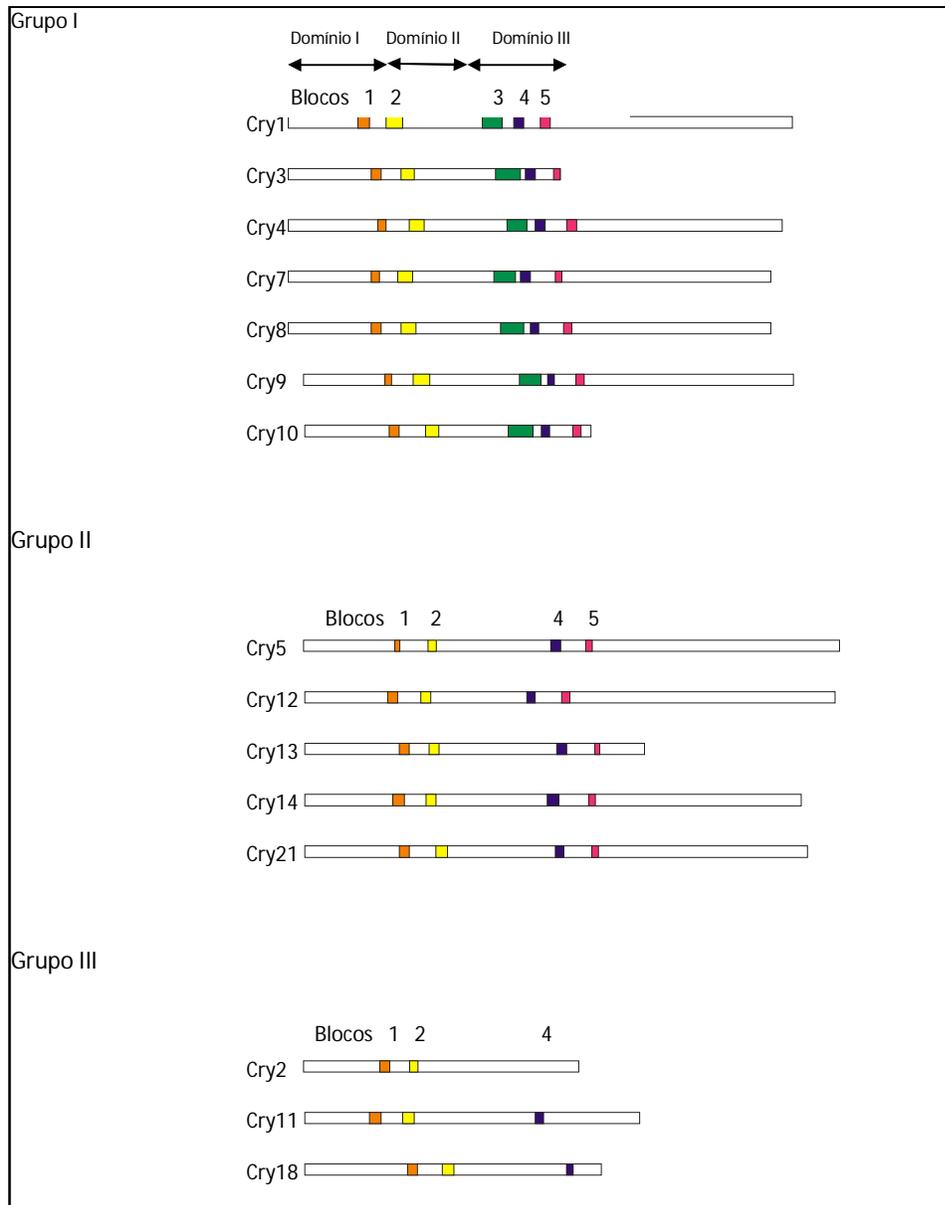


Figura 2. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Os retângulos coloridos correspondem às seqüências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa. Adaptado de: de Maagd *et al.*, 2001.

2.3.4 - Estrutura tridimensional das proteínas Cry

As toxinas Cry incluem as proteínas tóxicas aos insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e outros. A primeira estrutura molecular de uma proteína cristal (Cry3A) foi determinada através de técnicas de cristalografia de raios-X por Li *et al.* (1991). A estrutura tridimensional das formas ativas das proteínas Cry consiste de três domínios (Figura 3). O domínio I (N-terminal) consiste de 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$), que envolvem uma hélice central e hidrofóbica ($\alpha 5$). Este domínio está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro. O domínio II é formado por três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula (Shimizu & Morikawa, 1996 ; Rukmini *et al.*, 2000). O domínio III (C-terminal) consiste de duas folhas- β antiparalelas formando um β -sanduíche. Estes dois domínios estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Além disso, acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural da proteína (de Maagd *et al.*, 2001), protegendo a toxina de degradação durante o processamento proteolítico, controlando as interações toxina-toxina e pode estar agindo em conjunto com o domínio I, na formação do poro (Rukmini *et al.*, 2000).

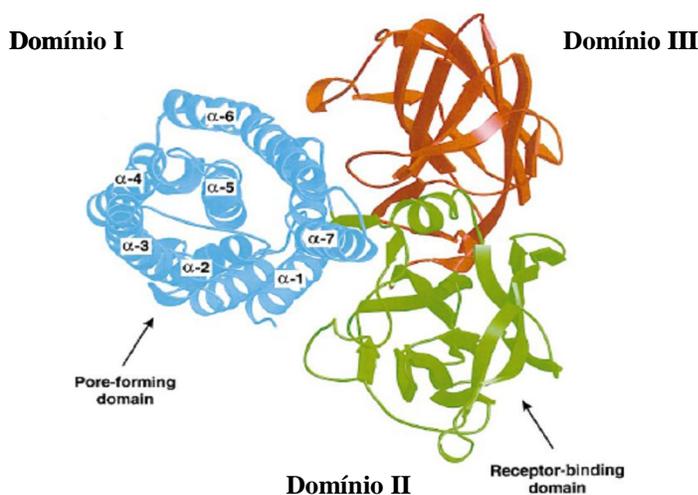


Figura 3. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry3A (Li *et al.*, 1991). O domínio I (região azul) possui sete α -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II (região verde) está relacionado com a ligação aos receptores de membrana. Este domínio é formado por três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III (região vermelha) corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas- β antiparalelas, formando um β -sanduíche e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural e a ligação ao receptor.

2.3.5 - Modo de ação das δ -endotoxinas

O modo de ação das proteínas Cry foi determinado, principalmente, em larvas de lepidópteros (Knowles & Dow, 1993). As proteínas Cry provocam lise das células epiteliais intestinais das larvas de insetos susceptíveis pela formação de poros na região apical das microvilosidades (Aronson & Shai, 2001; de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005). Os sintomas que são observados a partir desse momento são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e por fim, morte (Aronson *et al.*, 1986). O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em várias etapas, como descrito a seguir.

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos susceptíveis, são solubilizados no intestino médio (pH alcalino), liberando uma ou mais proteínas Cry. Além disso, é necessário um ambiente redutor já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa. O intestino médio da maioria das larvas de insetos susceptíveis (lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros) apresenta alto pH e condições redutoras (Knowles, 1994). Entretanto, existem exceções, como o caso da proteína Cry3A que se dissolve tanto em pH ácido (3,9 a 4,2) quanto em pH alcalino (9,5 a 11,3), permanecendo insolúvel em pH neutro (Koller *et al.*, 1992).

Após os cristais ingeridos por larvas susceptíveis terem sido dissolvidos no ambiente alcalino do intestino, as protoxinas solúveis e inativas são clivadas por proteases do hospedeiro originando proteínas ativas de 60-70 kDa (Bravo *et al.*, 2005). A ativação da toxina envolve a remoção proteolítica da porção N-terminal dos peptídeos (25-30 aminoácidos para a Cry1 e 57 resíduos para Cry3A, por exemplo) e aproximadamente metade da proteína restante da porção C-terminal (no caso de protoxinas longas) (Figura 4). O processamento é um fator que pode contribuir na determinação da especificidade. A toxina Cry1Ab da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* tóxica para lepidópteros (*Pieris brassicae*), por exemplo, quando solubilizada com suco gástrico de *A. aegypti* e ativada com tripsina torna-se tóxica para esse inseto (Bravo *et al.*, 2007).

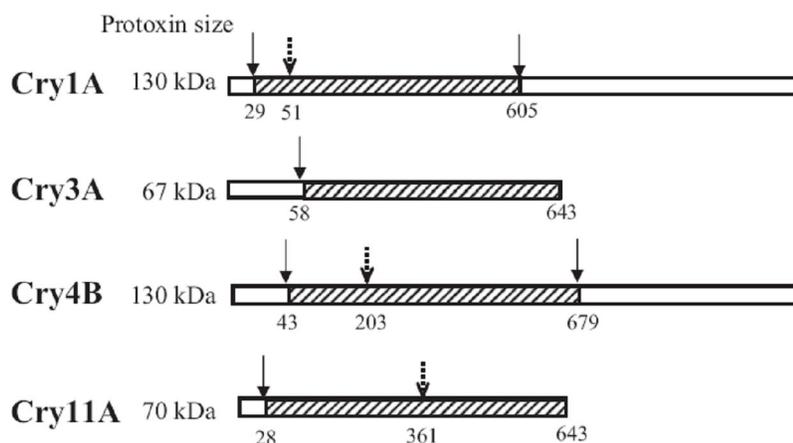


Figura 4. Representação esquemática do processamento proteolítico de algumas proteínas Cry. As caixas brancas representam as protoxinas, enquanto as regiões listradas representam as toxinas ativas. As setas sólidas demonstram os sítios de clivagem nas porções N-terminal e C-terminal das toxinas ativas. As setas listradas mostram clivagens intramoleculares das proteínas ativas (Bravo *et al.*, 2007).

As proteínas ativas ligam-se aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das larvas de insetos susceptíveis (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005). A inserção da toxina promove a formação de poros na região apical das microvilosidades. A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (Monnerat & Bravo, 2000). As metodologias mais utilizadas são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas com biotina e vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA) ou “brush border membrane vesicles” (BBMVs).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos susceptíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Van Rie *et al.*, 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf *et al.*, 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (Van Rie *et al.*, 1989; Monnerat & Bravo, 2000). A interação

inicial está relacionada à ligação entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto a irreversível está associada com uma interação proteína-proteína (Liang *et al.*, 1995).

Em relação às toxinas Cry1A, pelo menos quatro diferentes receptores (Figura 5) foram descritos em diferentes larvas de lepidópteros: a proteína do tipo caderina (CADR), uma fosfatase alcalina (ALP) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma aminopeptidase-N (APN) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (Bravo *et al.*, 2007).

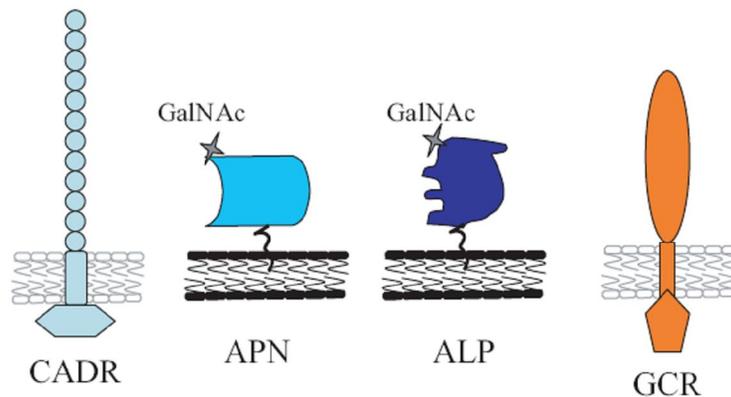


Figura 5. Receptores moleculares das proteínas Cry1A. Receptor do tipo caderina (CADR); receptor aminopeptidase-N (APN); receptor fosfatase alcalina (ALP); receptor glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (Bravo *et al.*, 2007).

As proteínas caderinas são glicoproteínas transmembrânicas com um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular com uma série de repetições de caderinas. O domínio extracelular contém sítios de ligação de cálcio e seqüências para a ligação de caderinas. Em lepidópteros, os receptores do tipo caderina têm sido muito estudados como receptores para as proteínas Cry1A. A primeira caderina de 210 kDa (denominada BT-R1) que demonstrou interação com essas proteínas foi isolada e caracterizada das BBMV de *Manduca sexta*. Além disso, outros receptores do tipo caderina já foram identificados em outras espécies de lepidópteros, como por exemplo, as BtR175 de 175 kDa, isolada das BBMV de *Bomby mori*, e as HelvCaLP isoladas de uma população resistente a proteína Cry1Ac de *Heliothis virescens* (Pigott & Ellar, 2007).

As APN e as ALP são proteínas ancoradas a GPI, e estão incluídas dentro de plataformas de lipídios (“lipid rafts”) que estão ordenadas em espaços diferenciados

dentro de microdomínios das membranas celulares. Essas plataformas de lipídios são enriquecidas com glicosfingolipídios, colesterol e com proteínas ancoradas a GPI e possivelmente, estão envolvidas em vias de transdução de sinal. De acordo Masson *et al.* (1995), a toxina Cry1Ac liga-se ao receptor APN através do domínio III que reconhece, especificamente, a N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Após ligação a receptores específicos, a toxina Cry se une rápida e irreversivelmente à membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros, ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Rabinovitch *et al.*, 2000).

Várias proteínas formadoras de poros (TFP) formam uma estrutura oligomérica solúvel antes de sua inserção na membrana. No caso da toxina Cry1Ab, que se liga a receptores do tipo caderina em *M. sexta*, ocorre uma clivagem adicional na porção N-terminal da proteína (hélice α -1) quando ela se liga ao receptor. Esse processo facilita a formação de um “pré-poro”, que é uma estrutura oligomérica responsável pela inserção da proteína na membrana e sua toxicidade (Gómez *et al.*, 2002; Russeal *et al.*, 2004 citados por Bravo *et al.*, 2007). A formação dessa estrutura oligomérica já foi demonstrada para uma grande quantidade de proteínas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa e Cry3 (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004; Muñoz-Garay *et al.* 2006 citados por Bravo *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos sugerem que após a ligação da proteína ao receptor caderina e a formação do oligômero, ocorre uma segunda interação com outro receptor (fosfatase alcalina ou aminopeptidase), que facilita a inserção da toxina na membrana (Pardo-López *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes & Adang, 2006). Durante este evento há um leve desdobramento da toxina, provocado pelo pH do ambiente, que também auxilia nesta inserção. A estrutura oligomérica, ou pré-poro é então inserido na membrana formando realmente o poro e levando à turgidez e lise celulares (Bravo *et al.*, 2004).

A partir do processo de formação do poro, as toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isso causa um colapso na diferença de potencial da membrana, ocasionando uma má redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. Além disso, ocorre alcalinização do citoplasma, interferindo no metabolismo celular normal e, conseqüentemente, ocorre morte celular e destruição do epitélio (Wolfersberg, 1992).

Assim que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso à hemolinfa (Du & Nickerson, 1996), ambiente no qual germinam. Tais eventos conduzem à lise das células epiteliais do intestino dos insetos e, finalmente, à morte dos insetos por inanição e septicemia (Dai & Gill, 1993; Monnerat & Bravo, 2000). O modo de ação das proteínas Cry é explicado de forma resumida na figura 6.

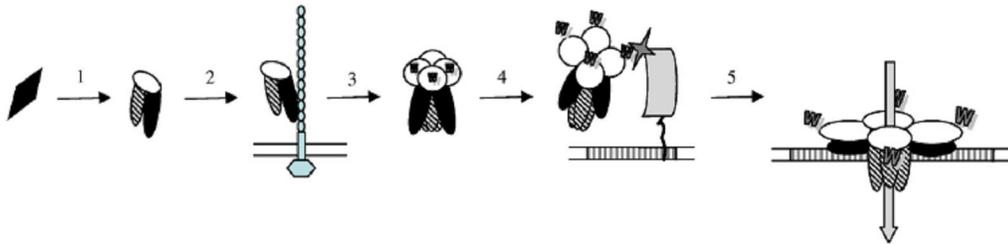


Figura 6. Modo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da proteína. (2) Ligação da toxina monomérica com o primeiro receptor (CADR), mudança conformacional da toxina e clivagem da hélice α -1. (3) Formação oligomérica. (4) Ligação da toxina ao segundo receptor (GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína. (5) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (Bravo *et al.*, 2007).

Apesar do modelo descrito acima ser o mais aceito, existe outro modelo proposto para o modo de ação das proteínas Cry. Enquanto o primeiro modelo caracteriza-se pela formação de poros na membrana epitelial de células intestinais, o segundo modelo caracteriza-se pela transdução de sinais. Além disso, a hipótese que defende a formação de poros tem sido estudada em nematóides e em várias ordens de insetos (Bravo *et al.*, 2007). A grande maioria dos resultados desses estudos confirma o modelo de formação dos poros (Bravo *et al.*, 2007). O modelo de transdução de sinal foi proposto em estudos realizados somente em células de insetos (Zhang *et al.*, 2006).

O primeiro passo nos dois modelos é idêntico, isto é, os cristais protéicos são ingeridos pelas lagartas e em seguida solubilizados no intestino médio pelo pH alcalino. Desse modo, as protoxinas são clivadas por proteases intestinais, dando origem a proteínas de 60 kDa, aproximadamente (descrito anteriormente). Assim, as proteínas ativas ligam-se aos receptores do tipo caderinas, que estão presentes nas microvilosidades intestinais. A partir disso, os dois modelos tornam-se diferentes.

O novo modelo proposto (Figura 7) retrata uma série de eventos associados à membrana celular. A ligação de proteínas Cry1Ab aos receptores BT-R1 (do tipo caderina) estimula regiões específicas de uma proteína G que imediatamente torna-se ativa. Em seguida, a proteína G aciona a adenilato ciclase (AC), que é responsável pela produção de cAMP. O acúmulo de cAMP ativa a proteína quinase (PKA). Essas enzimas influenciam a transcrição de genes responsáveis pela produção de proteínas que desestabilizam o citoesqueleto celular e canais iônicos presentes na membrana. O defeito na integridade estrutural e funcional da célula provoca um inchaço celular e posteriormente sua morte (Zhang *et al.*, 2006). Esse modelo é muito similar aos modelos de várias toxinas de bactérias. Essas toxinas afetam as células hospedeiras pela sua ligação a receptores da membrana plasmática e manipulação de reações críticas, que são responsáveis por várias respostas celulares (Zhang *et al.*, 2006).

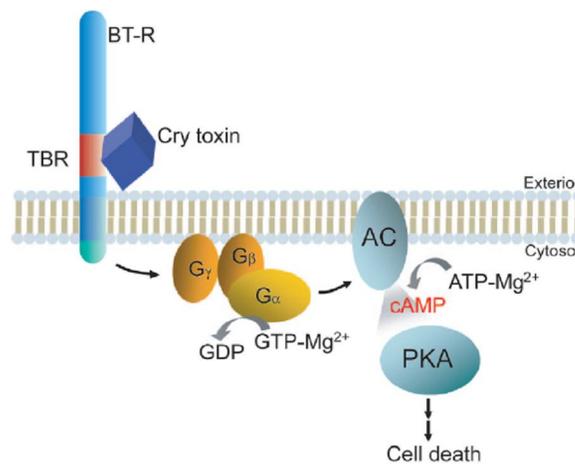


Figura 7. Esquema do novo modelo proposto para o modo ação das proteínas Cry. As proteínas Cry ligam-se aos receptores BT-R1 estimulando a proteína G e a adenilato ciclase, que são responsáveis pela produção de cAMP. Essa molécula ativa a enzima proteína quinase que promove desestabilização do citoesqueleto e dos canais iônicos, provocando assim, a morte celular (Zhang *et al.*, 2006).

2.3.6 - Proteínas Cry com atividade para Lepidópteros

O *B. thuringiensis* é o agente de controle biológico mais utilizado como alternativa ao uso de produtos químicos tanto para o controle de pragas agrícolas quanto para o controle de vetores de saúde pública (Kirouac *et al.*, 2005). Os produtos mais

empregados na agricultura possuem o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 como principal ingrediente ativo (Schnepf *et al.*, 1998). Essa estirpe de Bt é capaz de produzir quatro tipos de proteínas tóxicas aos insetos: Cry2Aa, Cry1Aa, Cry1Ab, e Cry1Ac.

O grupo de proteínas do tipo Cry2 é formado por oito subgrupos: Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag e Cry2Ah. Atualmente, foram caracterizados oito genes da classe *cry2A* que são: *cry2Aa* (Donovan *et al.*, 1988), *cry2Ab* (Dankocsik *et al.*, 1990), *cry2Ac* (Wu *et al.*, 1991), *cry2Ad* (Genebank: AF200816), *cry2Ae* (Genebank: AAQ52362), *cry2Af* (Genebank: EF439818), *cry2Ag* (Genebank: ACH91610) e *cry2Ah* (Genebank: EU939453). Apesar das proteínas Cry2A terem sido isoladas do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, elas podem ser produzidas por estirpes de várias subespécies. O gene da classe *cry2A* codifica uma proteína entre 65 e 71 kDa, aproximadamente, que se acumula na bactéria formando um cristal cubóide durante a fase de esporulação (Hofte & Whiteley, 1989). Um dos sítios de clivagem para a proteína Cry2Aa está localizado entre as hélices α_3 e α_4 (Nichols *et al.*, 1989).

As proteínas Cry2Aa e Cry2Ac apresentam toxicidade para lepidópteros e para dípteros, enquanto a proteína Cry2Ab possui atividade somente para lepidópteros (Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). As toxinas Cry2Aa e Cry2Ab são algumas das proteínas mais tóxicas para *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (Liao *et al.*, 2002). Vários estudos demonstram que as proteínas Cry2Aa não possuem os mesmos receptores das proteínas Cry1A para alguns lepidópteros (Karim & Dean, 2000; Karim *et al.*, 2000). Além disso, a proteína Cry2Aa possui baixa homologia com as toxinas Cry1A, o que as tornam atraentes para a construção de cultivares transgênicos (Tabashnik *et al.*, 1996).

As toxinas Cry1A de 130 kDa são clivadas na porção N-terminal e C-terminal por proteases produzindo toxinas de 60 kDa, aproximadamente (Schnepf *et al.*, 1998). No caso dessas proteínas, os 28 primeiros resíduos de aminoácidos são removidos da porção N-terminal e metade dos resíduos de aminoácidos é removida da porção C-terminal, aproximadamente (Bietlot *et al.*, 1989).

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, que possuem entre si identidade acima de 85% nas suas seqüências de aminoácidos, são tóxicas para alguns grupos de lepidópteros (Bravo *et al.*, 2007). As toxinas Cry1A ligam-se às mesmas moléculas receptoras (APN e CADR). Sugere-se, portanto, que tenham o mesmo modo de ação (Knight *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1995). Alguns trabalhos demonstram a ligação da

proteína Cry1Ac aos receptores do tipo fosfatase alcalina (ALP) de *Manduca sexta* (McNall & Adang, 2003) e *H. virescens* (Jurat-Fuentes & Adang, 2004). O domínio I das toxinas Cry1A é similar, porém os domínios II e III demonstram importantes diferenças em suas seqüências. As diferenças presentes nesses domínios influenciam a atividade dessas proteínas e suas ligações aos receptores, promovendo diferença na suscetibilidade dos grupos de lepidópteros a essas proteínas (Bravo *et al.*, 2004).

O modo de ação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac está sendo muito estudado em lepidópteros (Bravo *et al.*, 2007) acarretando uma série de evidências a respeito do funcionamento das proteínas Cry quando estas são ingeridas por insetos susceptíveis (Bravo *et al.*, 2007). Além disso, os genes dessas proteínas são utilizados na transformação de plantas, originando os cultivares transgênicos (Miklos *et al.*, 2007).

2.4 - Resistência de insetos às toxinas de Bt

O surgimento de populações resistentes às proteínas de Bt deve-se, também, à origem dos cultivares transgênicos (Tabashnik *et al.*, 2008). Desde 1996, várias culturas transgênicas, conhecidas também como plantas-Bt, surgiram para controlar de forma eficiente as pragas e diminuir a utilização de inseticidas químicos (Kleter *et al.*, 2007). Além disso, existem relatos do surgimento de populações resistentes de insetos devido à utilização massiva de bioinseticidas à base de Btk, que produz as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e Cry2Aa (Tabashnik, 1994). Desse modo, o estudo dos mecanismos de resistência dos insetos e da interação dessas toxinas com seus receptores tornam-se extremamente importantes.

O desenvolvimento de resistência caracteriza-se pela redução da suscetibilidade de uma população de insetos a uma toxina (Tabashnik, 1994). Vários insetos são capazes de desenvolver resistência às toxinas de Bt (Griffitts & Aroian, 2005; Sayyed *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007; Tabashnik *et al.*, 2008). As taxas de resistência dos insetos são determinadas a partir de bioensaios laboratoriais, isto é, realiza-se bioensaios com uma mesma toxina para duas populações de insetos diferentes (uma população derivada do campo e a outra população susceptível). Essas taxas são obtidas quando a CL₅₀ (concentração da toxina responsável por matar 50 % da população) apresentada pela população de lagartas presentes no campo é dividida pela CL₅₀ apresentada pela

população susceptível padrão (Tabashnik, 1994; Tabashnik *et al.*, 2008). Quanto maior a taxa de resistência, maior será a resistência dessa população para a toxina testada.

O monitoramento global de seis pragas de lepidópteros evidenciou o surgimento de resistência em algumas populações de *Helicoverpa zea* (lagarta-da-espiga) durante a primeira década de utilização das culturas modificadas geneticamente (Tabashnik *et al.*, 2008). A resistência desse inseto à proteína Cry1Ac inclui 14 populações diferentes que foram obtidas a partir de culturas transgênicas de Bt entre os anos de 2003 e 2006. A taxa de resistência da maioria das populações foi >100, enquanto duas outras populações obtiveram taxas >1000. Em contraste, a taxa de resistência dessas lagartas antes da comercialização de culturas transgênicas era de 1.2 (Tabashnik *et al.*, 2008). O aumento das taxas de resistência de *H. zea* sugere que a exposição dessa lagarta, em culturas transgênicas, à proteína Cry1Ac provocou a seleção de populações de campo resistentes.

Outros dois trabalhos também relataram o surgimento de populações resistentes de *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas), no campo e de *Trichoplusia ni*, em condições simuladas de campo, devido à aplicação excessiva de bioinseticidas à base de Btk, que produz as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (Tabashnik, 1994; Janmaat & Myers, 2003). Nessas ocasiões as taxas de resistência para algumas populações de *P. xylostella* e *T. ni* foram, no máximo, de 700 e 160, respectivamente (Tabashnik, 1994; Janmaat & Myers, 2003).

A caracterização do mecanismo de resistência apresentada por algumas linhagens de lepidópteros originou um tipo determinado de resistência às toxinas de Bt (chamado de “Mode 1”). Esse tipo de resistência ocorre em algumas linhagens de *Plodia interpunctella* (traça-indiana-da-farinha), *Heliothis virescens* (lagarta-das-maçãs) e *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada) (Tabashnik *et al.*, 1998; Bravo & Soberón, 2008). Esse mecanismo de resistência é caracterizado pelas populações de lagarta que apresentam altos níveis de resistência a pelo menos uma toxina da família Cry1A, possuem herança recessiva, apresentam redução na ligação de pelo menos uma proteína da família Cry1A aos receptores e possuem nenhuma ou pouca resistência cruzada à proteína Cry1C (Tabashnik, 1994). Portanto, a resistência é provocada por modificações nos sítios de ligação dos receptores, originando a redução ou a eliminação da ligação das proteínas da família Cry1A aos receptores nos indivíduos homozigotos resistentes. Esse tipo de resistência possui pouco efeito na suscetibilidade dos indivíduos heterozigotos para as toxinas da família Cry1A. Além disso, essas modificações

possuem pouca influência na suscetibilidade dos indivíduos homozigotos resistentes para a toxina Cry1C, que conseguem se ligar aos seus receptores independentemente das modificações apresentadas pelos receptores das toxinas Cry1A (Tabashnik, 1994). Deste modo, não existe resistência cruzada a proteína Cry1C.

A resistência cruzada é definida como a resistência adquirida por uma população de inseto a uma determinada proteína e conseqüentemente essa população torna-se resistente à outra proteína qualquer (Griffitts & Aroian, 2005). Portanto, alguns insetos não precisam, necessariamente, sofrerem uma exposição excessiva a uma toxina para se tornarem resistentes a elas. Deste modo, devido à grande quantidade de fatores que podem tornar um inseto resistente às toxinas de Bt, a determinação exata de um típico caso de resistência de uma espécie de inseto a uma toxina ou a definição do tipo de mecanismo de resistência envolvido pode ser extremamente difícil. Entretanto, vários estudos bioquímicos e toxicológicos sugerem que para algumas proteínas Cry, há um número limitado de mecanismos de resistência (Griffitts & Aroian, 2005).

Uma grande quantidade de fatores fisiológicos do organismo dos invertebrados pode proporcionar o surgimento de resistência dos insetos às toxinas de Bt. Esses fatores incluem dificuldades na solubilização das proteínas no intestino do inseto, defeito na clivagem proteolítica das toxinas, degradação das toxinas por proteases intestinais, ligação das proteínas Cry aos sítios específicos de moléculas não-funcionais, dificuldade na ligação das toxinas aos receptores intestinais, defeito na formação do poro, reparação do tecido epitelial (reposição das células atingidas pelas toxinas), elevada resposta imune, e elevada produção de esterases (Griffitts & Aroian, 2005; Gunning *et al.*, 2005). Alguns desses fatores são demonstrados na figura 8.

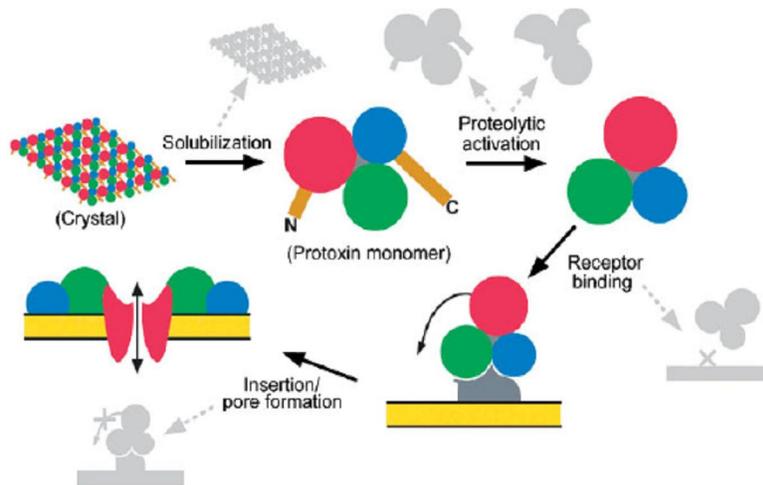


Figura 8. Esquema dos fatores que podem ocasionar o surgimento de resistência dos insetos às proteínas de Bt. Alguns desses fatores incluem dificuldade na solubilização das proteínas, defeito na ativação proteolítica das proteínas, modificações nos sítios de ligação dos receptores e dificuldades de inserção da proteína na membrana plasmática (Griffitts & Aroian, 2005).

2.4.1 - Defeito na ativação das proteínas Cry

A ativação das proteínas Cry por proteases é um passo fundamental no modo de ação dessas toxinas. Em insetos resistentes, a ativação das proteínas tem sido analisada de diversas formas. Alguns estudos demonstraram diferenças na ativação da proteína Cry1Ac, quando esta foi exposta aos sucos gástricos extraídos dos intestinos de populações susceptíveis e resistentes de *P. interpunctella* (Oppert *et al.*, 1994; Oppert *et al.*, 1997). Esses estudos identificaram que a resistência apresentada pela população resistente é devido à falta de uma protease do tipo tripsina, que está presente somente na linhagem susceptível (Oppert *et al.*, 1997).

Trabalhos realizados com populações resistentes de *H. virescens* demonstraram haver resistência moderada dessa lagarta às proteínas Cry1Ab e Cry2Aa (Forcada *et al.*, 1996; Forcada *et al.*, 1999). Os resultados apresentaram um perfil protéico para a população resistente e outro para a população susceptível quando as proteínas foram ativadas com proteases intestinais. Alguns especialistas especulam que o defeito na ativação das proteínas Cry ocasionado pelas proteases intestinais não está relacionada ao surgimento de altos níveis de resistência, pois a falta completa de proteases intestinais provocaria a morte da lagarta (Griffitts & Aroian, 2005).

2.4.2 - Modificações dos sítios de ligação

Em 1990, Van Rie e colaboradores publicaram o primeiro trabalho descrevendo mudanças bioquímicas nas linhagens de insetos resistentes às toxinas de Bt. No trabalho, foi relatado o surgimento de resistência de populações de *P. interpunctella* a proteína Cry1Ab devido a modificações nos receptores. A partir disso, outros trabalhos relacionados a modificações dos receptores e surgimento de populações resistentes de insetos às toxinas de Bt começaram a ser desenvolvidos.

A etapa de ligação das proteínas aos receptores é fundamental na atuação das proteínas Cry, portanto qualquer modificação em suas ligações aos receptores do tipo caderinas ou aos outros receptores pode ocasionar o surgimento de populações resistentes (Bravo & Soberón, 2008). Por exemplo, para algumas pragas do algodão, como *H. virescens*, *P. gossypiella* e *Helicoverpa armigera* (“Old World Bollworm”), a resistência às proteínas Cry1A está relacionada ao surgimento de mutações nos genes responsáveis pela produção dos receptores primários (caderinas) dessas proteínas (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003 e Yang *et al.*, 2007). Todas as populações resistentes desses lepidópteros foram selecionadas em condições de laboratório, adquirindo resistência à proteína Cry1Ac. A seleção e o estudo da resistência desses lepidópteros foram possíveis porque os genes da caderina não são essenciais para a sobrevivência das lagartas. Assim, qualquer mutação nesse gene que de alguma forma modifique a produção do receptor pode conferir resistência das lagartas às toxinas de Bt e não prejudicar seu ciclo de vida (Yang *et al.*, 2007). No caso da *H. virescens*, a mutação no alelo da caderina proporcionou um aumento nos níveis de resistência de 40 a 80 % à proteína Cry1Ac (Gahan *et al.*, 2001).

2.4.3 - Elevada resposta imune e produção de esterases intestinais

Apesar da maioria dos casos de resistência às toxinas de Bt estarem relacionados a defeitos na ativação proteolítica das toxinas ou dificuldades de ligação destas aos seus receptores, existem outros mecanismos que podem ocorrer com frequência nas populações resistentes de insetos (Bravo & Soberón, 2008). Uma população de *H. armigera*, que foi selecionada a partir de cultivares de algodões transgênicos na Austrália, tornou-se resistente à proteína Cry1Ac devido ao aumento na produção de esterases intestinais (Gunning *et al.*, 2005). Essas enzimas, pertencente à classe das

serinas hidrolases, estão sendo apontadas como um mecanismo de resistência de insetos a inseticidas devido a sua capacidade de hidrolisar ésteres e ligar-se a compostos químicos estranhos a um sistema biológico (xenobióticos) (Gunning *et al.*, 1999). Além da maior produção de esterases pela população resistente, comprovou-se a ligação dessas enzimas as protoxinas e as toxinas ativas de Cry1Ac. Deste modo, as proteínas Cry1Ac não conseguem agir.

Outros trabalhos relacionados a fatores de resistência baseiam seus estudos na resposta imune dos insetos quando estes são expostos a toxinas de Bt (Rahman *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a resistência de populações de *Ephesia kuehniella* e *H. armigera* está relacionada com uma elevada resposta imune devido à produção de pró-coagulantes, como as lipoforinas e hexamerinas, que são lipoproteínas circulantes na hemolinfa de insetos. As lipoforinas e as hexamerinas conseguem reconhecer a toxina e formar agregados específicos em volta dessa substância, evitando assim que a toxina aja de forma eficiente (Rahman *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de proteínas de *B. thuringiensis* contra duas populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente) e determinar os mecanismos de resistência existentes na população resistente.

3.2 - Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade das proteínas purificadas, e da mistura esporos e cristais protéicos de *B. thuringiensis* para populações susceptível e resistente de *A. gemmatalis*;
- Identificar possíveis receptores das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa em *A. gemmatalis*;
- Comparar as possíveis diferenças encontradas entre os receptores das populações resistentes e susceptíveis de *A. gemmatalis*;

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Criação de *A. gemmatalis*

As populações susceptível e resistente de *A. gemmatalis* utilizadas nesse trabalho foram provenientes do laboratório de criação massal de insetos da Embrapa Soja (Londrina, PR). As lagartas foram criadas de acordo com Hoffmann-Campo *et al* (1985). As lagartas foram mantidas e alimentadas com dieta artificial em um insetário com temperatura de 28 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 14:10 (luz:escuro). A população resistente de *A. gemmatalis* tornou-se resistente ao produto Dipel, que possui o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* como ingrediente ativo. Essa população foi selecionada a partir de bioensaios de dose utilizando esse produto biológico.

4.2 - Purificação, solubilização e quantificação das proteínas

Três estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* e uma estirpe nativa (doadas gentilmente pelo Dr. Colin Berry da Universidade de Cardiff, País de Gales) foram utilizadas nesse trabalho para a produção das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa. Essas estirpes foram crescidas a 28 °C e 200 rpm durante 72h em um meio de esporulação [8 g/L de Caldo nutriente; 0,25 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1 g/L de KCl; 0,002 g/L de MnCl₂.4H₂O; 0,0732 g/L de Fe₂(SO₄).7H₂O; 0,0056 % de H₂SO₄ (v/v); 0,098 g/L de CaCl₂] (Lereclus *et al.*, 1995), contendo 25µg/mL de eritromicina no meio das estirpes transformadas. Os esporos e cristais foram lavados, primeiramente, com um tampão contendo 0,3 M de NaCl e 0,01 M de EDTA (pH 8,0) e em seguida com um segundo tampão contendo PMSF 1% (v/v). Os cristais foram purificados por gradiente de sacarose de acordo com o protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). Os cristais foram recuperados utilizando Triton 1% (v/v) e PMSF 1% (v/v) e solubilizados com uma solução alcalina contendo tampão carbonato de sódio a 50 mM e pH 10,5 com 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol por 2h a 37 °C com agitação constante de 37 rpm (New Brunswick modelo Innova 2100). Depois desse processo, a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 12.000 x g. Em seguida, realizou-se a dosagem de proteína a partir do sobrenadante (proteínas solúveis) com o reagente de Bradford (Bio Rad) (Bradford,

1976), seguindo as instruções do fabricante. A massa molecular e a integridade das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, conforme Laemmli (1970). O gel foi corado e fixado em solução de metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e Comassie blue 0,1% (m/v) por cerca de 16h, sob leve agitação e descorado em solução de metanol 40% e ácido acético 10% por 3h, sob leve agitação.

4.3 - Ativação das proteínas com tripsina

As proteínas solúveis Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram incubadas com a enzima tripsina durante duas horas a 37 °C com agitação de 37 rpm. A concentração de enzima utilizada variou de acordo com a concentração das proteínas, porém manteve-se a proporção de 10:1 de proteína e enzima (concentração menor). Em seguida, a enzima foi inativada com a adição de PMSF a 1mM. As proteínas ativas foram recuperadas por centrifugação (12.000 x g por 10 minutos). A dosagem de proteína solúvel no sobrenadante foi realizada como descrito acima. A massa molecular e a integridade das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.

4.4 - Ativação das proteínas com suco gástrico

As proteínas solúveis Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram incubadas e ativadas pelas proteases do suco gástrico de lagartas de duas populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente). O procedimento para a extração das proteases foi adaptado de Silva-Werneck & Ellar (2008). As proteases foram obtidas a partir de intestinos médios de *A. gemmatalis* de quarto estágio. Aproximadamente 10 intestinos foram retirados com auxílio de pinças, lavados e incubados em 500 µL de tampão de dissecação (sacarose 250 mM e Tris-HCl 5 mM, pH 8,0). Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de homogeneização gelado (DTT 10 mM e Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,5). As soluções contendo os intestinos foram submetidas a quatro pulsos a 2250 rpm em um aparelho homogeneizador blender - polytron (Glass-Col[®] Terre Haut USA) juntamente com 1 mL de tampão de homogeneização gelado. O material insolúvel foi removido por centrifugação (11.735 x g durante 5 minutos a 4 °C). O sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi esterilizado por filtração (Ø 0,22 µm), as

proteínas foram quantificadas como descrito anteriormente, e aliqüotadas em pequenos volumes de 250 µL. As alíquotas foram armazenadas a – 80 °C até sua utilização.

4.5 - Biotinilação das proteínas

As proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante. Um miligrama das proteínas foi incubado com tampão bicarbonato (Amersham) e 40 µL de biotina durante uma hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a coluna Sephadex G25 (Amersham) foi bloqueada com 5 mL de PBS 1X (8×10^{-4} g/mL de NaCl, $0,2 \times 10^{-4}$ g/mL de KCl, $1,44 \times 10^{-4}$ g/mL de Na_2HPO_4 , $0,24 \times 10^{-4}$ g/mL de KH_2PO_4) contendo BSA 1% (m/v) e lavada com 20 mL de PBS 1X. As proteínas conjugadas com biotina foram adicionadas à coluna. As proteínas foram eluídas da coluna pela adição de 10 mL de PBS 1X. A partir disso, dez frações contendo 1 mL de solução foram coletadas e as proteínas quantificadas (como descrito anteriormente) em cada fração. Após esse processo, a fração ou as frações contendo as proteínas biotiniladas foram dialisadas em quatro litros de água destilada durante 16 h a 4 °C e quantificadas (como descrito acima). As proteínas foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. Em seguida, foi utilizado o protocolo de coloração de prata adaptado de Blum *et al.* (1987) para corar o gel. O gel foi fixado em solução de metanol 40% e ácido acético 10% por cerca de 16h, sob leve agitação. Em seguida, o gel foi incubado três vezes com uma solução de etanol 50% (v/v) durante 20 minutos. Adicionou-se 30 mL da solução tiosulfato (20 mg/mL de tiosulfato de sódio) durante um minuto. O gel foi lavado três vezes com água destilada. A partir disso, o gel foi incubado com 30 mL de solução de prata [2 mg/mL de nitrato de prata e formaldeído 0,001% (v/v)] durante 20 minutos. O gel foi lavado, novamente, três vezes com água destilada. Adicionou-se a solução reveladora [0,06 g/mL de Na_2CO_3 , formaldeído 0,001% (v/v) e solução tiosulfato 2% (v/v)]. O gel foi submetido a leve agitação até a visualização das proteínas. A reação foi interrompida com solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

4.6 - Extração das “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs)

As BBMVs foram obtidas a partir de intestinos médios de *A. gemmatalis* de quarto estágio de desenvolvimento. Os intestinos foram retirados com auxílio de pinças, lavados e conservados em solução tampão (manitol 200 mM, DTT 1 mM e Hepes-Tris 1 mM, pH 7,4) a -80 °C. Um grama dos intestinos foram submetidos a nove pulsos a 2.250 rpm em um aparelho homogeneizador “blender-polytron” (Glass-Col® Terre Haut USA) juntamente com 10 mL de tampão de homogeneização contendo 300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, 10 mM de Hepes, 2 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF. Adicionou-se 10 mL de solução gelada de MgCl₂ a 24 mM e incubou-se a mistura em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de MgCl₂ a 24 mM. Novamente a mistura foi incubada em gelo durante 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuscitado em 5mL de água bi-destilada fria. Após todas essas centrifugações, as amostras foram submetidas a três pulsos do aparelho homogeneizador a 2.250 rpm. Em seguida, as mesmas foram dialisadas durante aproximadamente 16 horas a 4 °C em dois litros de uma solução (pH 7,4) contendo 150 mM de KCl, 2 mM de EGTA, 0,5 mM de EDTA, 10 mM de Hepes. As BBMVs purificadas foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a -80 °C.

4.7 - Ensaio de ligação

O ensaio de ligação foi realizado como descrito por Aranda *et al.* (1996) e caracterizou-se pela ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa às BBMVs extraídas do intestino médio de duas diferentes populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente). As toxinas biotinizadas (10 nM) foram incubadas com 10 µg de BBMVs em 100 µL de tampão de ligação [PBS 1X (pH 7,6), BSA 0,1% (m/v), Tween 20 0,1% (v/v)] à temperatura ambiente durante 1h sob leve agitação. As proteínas não ligadas às BBMVs foram removidas no processo de centrifugação (10 min a 12.000 x g). As BBMVs foram lavadas três vezes no tampão de ligação e

ressuspendidas em 15 μ L de PBS 1X e 5 μ L de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris/HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,01% (m/v)]. Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos e aplicadas em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. Um dos géis foi visualizado como descrito anteriormente e o outro gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham). A transferência foi realizada à corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefler) por 40 min em tampão de transferência [Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM e metanol 20% (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h a 4 °C com PBS 1X para que fosse renaturada. Em seguida, a membrana contendo as ligações das toxinas marcadas com as BBMV's foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (Amersham) diluída 1:6.000 em 30 mL de PBS 1X por uma hora e revelada com o auxílio do kit SuperSignal Chemiluminescence Substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

4.8 - Ensaio de competição heteróloga

O ensaio de competição heteróloga foi realizado como descrito por Fernandez *et al.* (2006) e caracterizou-se pela ligação e competição das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores extraídos do intestino médio de duas diferentes populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente). As toxinas biotinizadas (10 nM) foram incubadas com 10 μ g de BBMV's e com 5.000 nM de proteínas não - biotinizadas em 100 μ L de tampão de ligação [PBS 1X (pH 7,6), BSA 0,1% (m/v), Tween 20 0,1% (v/v)] à temperatura ambiente durante uma hora sob leve agitação. Inicialmente, a proteína biotinizada Cry1Aa foi incubada com as outras proteínas não - biotinizadas. Em seguida, incubou-se a proteína biotinizada Cry1Ab com as proteínas não - biotinizadas Cry1Ac e Cry2Aa. No final, a proteína biotinizada Cry1Ac foi incubada com a proteína não- biotinizada Cry2Aa. As proteínas não ligadas às BBMV's foram removidas no processo de centrifugação (10 min a 12.000 x g). As BBMV's foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspendidas em 15 μ L de PBS 1X e 5 μ L de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris/HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,01% (m/v)]. Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos e utilizadas em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. Um dos géis foi visualizado como descrito

anteriormente e o outro gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham), como descrito acima. O processo de lavagem e revelação da membrana foi o mesmo descrito no ensaio de ligação.

4.9 - Ensaio para determinação do tamanho do receptor

O ensaio para a verificação do tamanho do receptor foi realizado como descrito por Fernandez *et al.* (2006) e se caracterizou pela ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores extraídos e purificados do intestino médio de duas diferentes populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente). Esse ensaio foi realizado em duas etapas. A primeira etapa caracterizou-se pela purificação dos receptores ancorados à membrana das BBMV's, enquanto a segunda etapa caracterizou-se pela ligação das proteínas a esses receptores purificados. Para a purificação dos receptores, 300 µg de BBMV's foram ressuspensos em 500 µL de PBS2 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,2). Em seguida, três unidades de fosfolipase C de *Bacillus cereus* foram adicionadas à solução. Incubou-se a solução por 16 horas a 30 °C. Os receptores foram recuperados por centrifugação (11.000 x g por 20 minutos) e quantificados pelo método de Bradford. Os receptores, que não estavam mais ancorados à membrana, foram utilizados na etapa seguinte da purificação dos receptores e no ensaio de ligação.

A matriz conjugada com estreptavidina (Sigma) foi incubada com 7 µg das proteínas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa durante 16 horas a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,2) com o objetivo de retirar as proteínas que não se ligaram à matriz. A matriz foi incubada em gelo durante quinze minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido dez vezes. Adicionou-se 42 µg dos receptores extraídos das BBMV's e a matriz foi incubada a 4 °C durante 16 horas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de PBS2 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,2) com o objetivo de retirar os receptores que não se ligaram às proteínas. A matriz foi incubada em gelo durante quinze minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido quatro vezes. Os receptores foram eluídos da matriz com a adição de 200 µL de PBS2 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e Na₂HPO₄ 10 mM, pH 9,5). A matriz foi incubada com esse tampão a 4 °C durante 30 minutos e em seguida centrifugada a 12.000 x g por 30 segundos. O sobrenadante, contendo os

receptores purificados e solúveis (receptores específicos para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa), foi quantificado pelo método de Bradford e estocado a 4 °C.

O ensaio de ligação caracterizou-se pela ligação das proteínas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (10 nM) às BBMV's não tratadas com fosfolipase C (10 µg), às BBMV's tratadas com fosfolipase C (10 µg) e aos receptores purificados (10 µg). As BBMV's e os receptores purificados foram fervidos durante três minutos juntamente com 5 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris/HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,01% (m/v)]. Essas amostras foram analisadas em um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. O gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham). A transferência foi realizada como descrito para o ensaio de ligação. A membrana foi incubada por 16 h a 4 °C com PBS 1X. Em seguida, a membrana contendo as BBMV's não tratadas com fosfolipase C, as BBMV's tratadas com fosfolipase C e os receptores purificados foi bloqueada com 50 mL de PBS 1X contendo Tween 20 0,1% (v/v) e BSA 1% (m/v) durante uma hora. Essa solução foi retirada da membrana e a mesma foi incubada com PBS 1X contendo Tween 20 0,1% (v/v) durante 15 minutos. Após descartar a solução, a membrana foi utilizada no sistema de canaletas (Hoefer). Em cada canaleta do sistema adicionou-se 500 µL de tampão de incubação [PBS 1X, BSA 2% (m/v) e Tween 20 0,1% (v/v)] durante 10 minutos. Em seguida, o tampão foi retirado e 10 nM de proteínas biotinizadas foram adicionadas. O sistema ficou sob leve agitação à temperatura ambiente durante duas horas. Ao término desse período, a membrana foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (Amersham) diluída 1:6.000 em 30 mL de PBS 1X por uma hora e revelada com o auxílio do kit SuperSignal Chemiluminescence Substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

4.10 - Bioensaios com a mistura de esporos e cristais

As estirpes recombinantes de Bt, que expressam as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa e a estirpe nativa, que expressa a proteína Cry1Ac, foram crescidas por 72 h em meio NYSM (Yousten, 1984) a 28 °C e 200 rpm. Após o cultivo, as células crescidas foram centrifugadas, congeladas "overnight" e liofilizadas como descrito por Praça (2003). Após a liofilização, prepararam-se diluições de acordo com a tabela 1. Um

miligrama do material liofilizado foi dissolvido em 1 mL de dH₂O estéril. Em seguida, a suspensão I foi diluída para uma concentração de 571,4 µg/mL (suspensão II). A partir da suspensão II foram realizadas dez diluições resultando em concentrações finais de 2.000, 1.200, 720, 432, 259, 155, 93, 56, 43, 20 ng/cm². Utilizaram-se 35 µL de cada diluição sobre a dieta artificial distribuída previamente em placas de cultivo de células contendo 24 poços. Em seguida, uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço e as placas, após serem fechadas, foram incubadas nas mesmas condições da criação de insetos. Foi feita uma placa para cada diluição e um controle negativo. A primeira leitura do bioensaio foi realizada 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copos plásticos contendo dieta sem bactéria. No quinto dia do ensaio foi realizada a última leitura. Todos os bioensaios foram realizados em triplicata. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através do programa estatístico Probit (Finney, 1971) e as concentrações letais (CL₅₀) foram determinadas.

Tabela 1. Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra *A. gemmatalis*.

	Bactéria (mg)	Água (µL)	Concentração (µg/mL)
Suspensão I (µL)	1	1000	1000
	Suspensão I (µL)	Água (µL)	Concentração (µg/mL)
Suspensão II (µL)	571,4	428,6	571,4
Dose	Suspensão II (µL)	Água (µL)	Concentração (ng/ cm²)
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2	998	20

4.11 - Bioensaio com as proteínas purificadas

As estirpes recombinantes de Bt, que expressam as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2Aa e a estirpe nativa, que expressa a proteína Cry1Ac, foram crescidas por 72 h em

meio de esporulação [8 g/L de Caldo nutriente; 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de KCl; 0,002 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,0732 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0056 % de H_2SO_4 (v/v); 0,098 g/L de CaCl_2] (Lereclus *et al.*, 1995) a 28 °C e 200 rpm. Para o bioensaio de dose, os cristais foram purificados como descrito anteriormente e dez doses seriadas foram preparadas (10^{-1} a 10^{-10}), onde a primeira dose possuía uma concentração de 200 a 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, dependendo da proteína testada. Utilizou-se 35 μL de cada diluição sobre a dieta artificial distribuída previamente em placas de cultivo de células contendo 24 poços. Em seguida, uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço e as placas, após serem fechadas, foram incubadas nas mesmas condições da criação de insetos. Foi feita uma placa para cada diluição e um controle negativo. A primeira leitura do bioensaio foi realizada 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copos plásticos contendo dieta sem bactéria. No quinto dia do ensaio foi realizada a última leitura. Os bioensaios foram realizados em triplicata. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através do programa estatístico Probit (Finney, 1971) e as concentrações letais (CL_{50}) foram determinadas.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Purificação e solubilização das proteínas.

A análise do perfil protéico dos cristais e das proteínas solúveis demonstrou bandas de 130 kDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e de 72 kDa para a proteína Cry2Aa (Figuras 9A e 9B). A visualização de rastros no gel dos cristais protéicos (Figura 9A) deve-se, provavelmente, ao excesso de proteínas ou à presença de sacarose, que foi utilizada na purificação dos cristais. Apesar da realização de diálises, não foi possível remover completamente a sacarose. Além da visualização das proteínas solúveis de 130 kDa e 72 kDa, foi observada a presença de outras proteínas de massa molecular em torno de 75 kDa e 50 kDa (Figura 9B). A presença dessas bandas deve-se, provavelmente, à degradação das proteínas por proteases após a solubilização. Apesar disso, o perfil protéico destas está de acordo com o descrito em outros trabalhos (Schnepf *et al.*, 1998; Hofte & Whiteley, 1989).

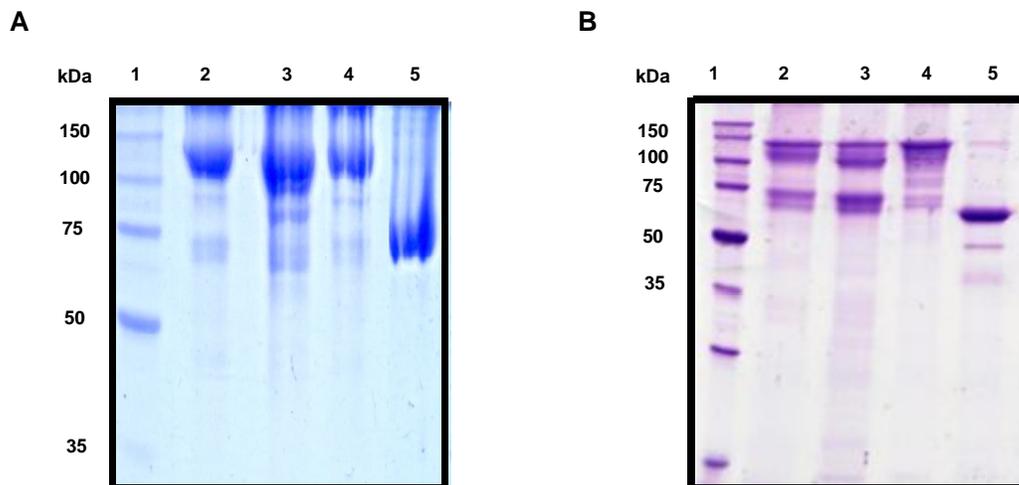


Figura 9. Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa em SDS-PAGE a 12%. A) Purificação dos cristais protéicos. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa, 3: proteína Cry1Ab, 4: proteína Cry1Ac e 5: proteína Cry2Aa. B) Solubilização dos cristais protéicos. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa solúvel, 3: proteína Cry1Ab solúvel, 4: proteína Cry1Ac solúvel e 5: proteína Cry2Aa solúvel.

5.2 - Ativação das proteínas com tripsina

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida da ativação das proteínas com tripsina (Figura 10) mostrou bandas entre 60 – 70 kDa para todas as proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa). O resultado demonstra que essas proteínas tornam-se ativas com massa molecular de 65 kDa, aproximadamente. Bravo *et al.* (2007), e Hofte & Whiteley (1989) descrevem um tamanho semelhante das proteínas ativas ao apresentado por esse resultado. As proteínas ativadas foram utilizadas nos ensaios de competição heteróloga.

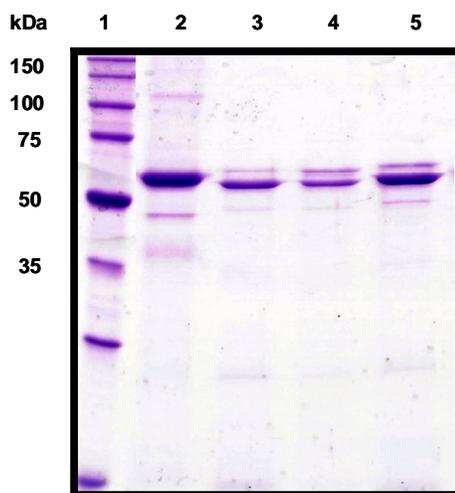


Figura 10. Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa com tripsina (SDS-PAGE a 12%). 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa ativada, 3: proteína Cry1Ab ativada, 4: proteína Cry1Ac ativada e 5: proteína Cry2Aa ativada.

5.3 - Ativação das proteínas com suco gástrico

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac ativadas pela tripsina e pelas proteases do suco gástrico das duas populações de *A. gemmatalis* (susceptível e resistente) apresentaram massa molecular em torno de 65 kDa (Figuras 11 e 12). As proteínas incubadas com tripsina produziram um polipeptídeo ligeiramente maior do que as proteínas incubadas com suco gástrico. Miranda e colaboradores (2001) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho. No referido trabalho, a proteína

Cry1Ab apresentou diferentes perfis protéicos quando ativada com tripsina e com proteases do suco intestinal de *M. sexta*. Não há diferenças significativas na ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac quando estas foram ativadas com o suco gástrico obtido das lagartas susceptíveis e resistentes.

A proteína Cry2Aa ativada com tripsina produziu dois polipeptídeos de aproximadamente 65 e 45 kDa (Figura 12B). Já, a mesma proteína ativa com suco gástrico das populações susceptíveis e resistentes apresentou pelo menos dois polipeptídeos acima e três abaixo de 50 kDa, respectivamente. Também não há diferença significativa na ativação da proteína Cry2Aa quando esta foi ativada com o suco gástrico obtido das lagartas susceptíveis e resistentes (fig. 12B). A visualização de outras bandas na ativação da proteína Cry2Aa com proteases intestinais pode estar relacionada com a degradação da proteína pela presença de outras proteases no suco intestinal das lagartas. Outros fatores que podem ser responsáveis por esse tipo de perfil protéico são o tempo de incubação da proteína com as proteases, e a proporção entre concentração da proteína Cry2Aa e concentração das proteases. Miranda *et al.* (2001) demonstrou que o perfil protéico da proteína Cry1Ab, quando ativada com proteases intestinais de *M. sexta*, varia de acordo com a concentração das proteases e com o tempo de incubação da proteína com as proteases.

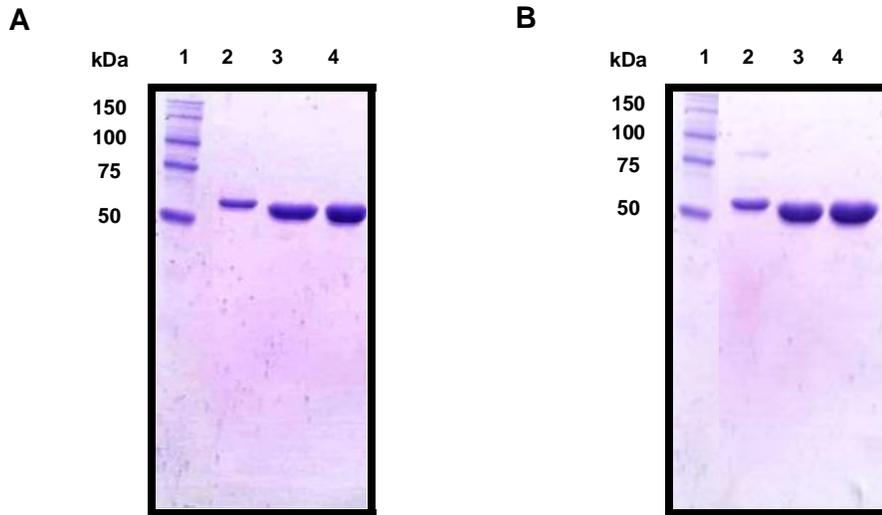


Figura 11. Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab ativadas com tripsina, proteases de *A. gemmatalis* susceptíveis e proteases de *A. gemmatalis* resistentes. A) Proteína Cry1Aa ativada. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa ativada com tripsina, 3: proteína Cry1Aa ativada com proteases de lagartas susceptíveis e 4: proteína Cry1Aa ativada com proteases de lagartas resistentes. B) Proteína Cry1Ab ativada. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Ab ativada com tripsina, 3: proteína Cry1Ab ativada com proteases de lagartas susceptíveis e 4: proteína Cry1Ab ativada com proteases de lagartas resistentes.

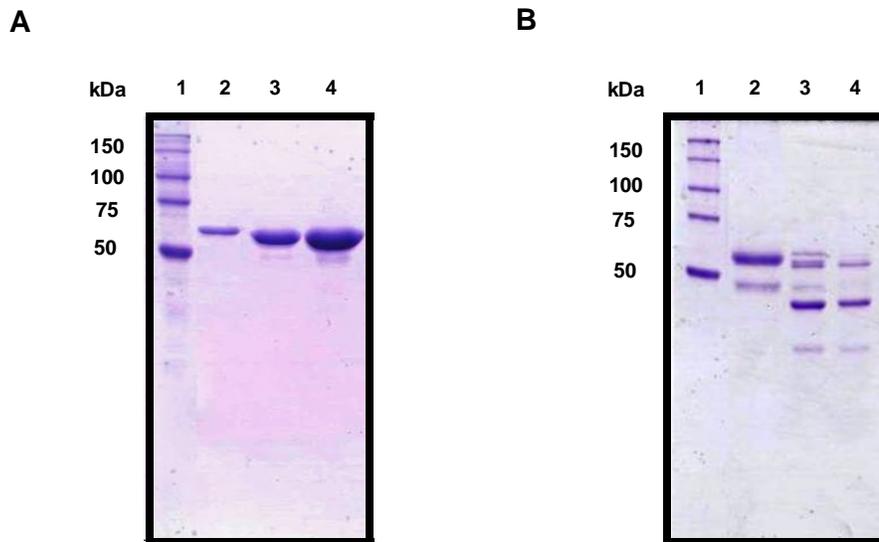


Figura 12. Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Ac e Cry2Aa ativadas com tripsina, proteases de *A. gemmatalis* susceptíveis e proteases de *A. gemmatalis* resistentes. A) Proteína Cry1Ac ativada. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Ac ativada com tripsina, 3: proteína Cry1Ac ativada com proteases de lagartas susceptíveis e 4: proteína Cry1Ac ativada com proteases de lagartas resistentes. B) Proteína Cry2Aa ativada. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry2Aa ativada com tripsina, 3: proteína Cry2Aa ativada com proteases de lagartas susceptíveis e 4: proteína Cry2Aa ativada com proteases de lagartas resistentes.

Os resultados demonstraram que não ocorreram diferenças significativas na ativação das proteínas quando estas foram ativadas com os sucos gástricos obtidos das lagartas susceptíveis e resistentes. A partir disso, é muito provável que a resistência adquirida pela população de *A. gemmatalis* não se deva as modificações das proteases intestinais dessas lagartas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mohan & Gujar (2003). Nesse caso, a ativação das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab por proteases intestinais de uma população resistente e outra susceptível de *P. xylostella* não apresentou qualquer diferença. Além disso, as proteases das duas populações reagiram com os mesmos substratos e não interferiram na ativação das toxinas de Bt, sugerindo assim que as duas populações possuam as mesmas proteases. Alguns trabalhos, no entanto, descrevem o surgimento de resistência devido a diferenças na produção de proteases intestinais de populações de insetos susceptíveis e resistentes (Oppert *et al.*, 1994).

A população resistente 198r de *Plodia interpunctella*, que foi selecionada em laboratório com o *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD198 e tornou-se resistente às proteínas Cry1Ab e Cry1Ac (McGaughey & Johnson, 1994), apresentou um produto de alta massa molecular quando comparado ao produto obtido da linhagem susceptível (Oppert *et al.*, 1994). Nesse trabalho, identificou-se a falta de uma protease do tipo tripsina, que está presente na linhagem susceptível, na população resistente. A ausência dessa protease resulta em níveis baixos de toxinas ativadas presentes no intestino, evitando assim a exposição dos insetos a altos níveis da toxina Cry1Ac (Oppert *et al.*, 1997). Outros estudos demonstraram resistência dessa população resistente de lagarta à proteína Cry1Ab. Nesse estudo, foram realizados bioensaios com a protoxina e a toxina Cry1Ab para duas populações susceptíveis e resistentes de *P. interpunctella* (Herrero *et al.*, 2001). Em relação às protoxinas, o resultado obtido demonstrou uma CL₅₀ maior para a linhagem resistente do que para a linhagem susceptível. Porém, quando as protoxinas foram ativadas *in vitro* com quimotripsina, a CL₅₀ da linhagem resistente foi menor do que a CL₅₀ da linhagem susceptível. Esses resultados sugerem que a resistência adquirida pelas lagartas é devido a problemas na ativação proteolítica das protoxinas (Herrero *et al.*, 2001).

5.4 - Biotinilação das proteínas

A análise do perfil protéico das proteínas ativadas com tripsina e biotiniladas (Figura 13) mostrou a presença de uma banda principal de 65 kDa, aproximadamente,

para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa. Esses resultados demonstram a integridade das proteínas e que o tamanho esperado das proteínas está de acordo com outros trabalhos (Bravo *et al.*, 2007; Hofte & Whiteley, 1989).

Além das bandas esperadas para as proteínas, o gel apresentou polipeptídeos de massa molecular em torno de 20 kDa. A presença dessas bandas pode ser explicada pela degradação das proteínas. Os procedimentos de ativação e biotilação das proteínas foram realizados à temperatura ambiente sem a presença de inibidores de proteases, facilitando dessa maneira a desnaturação das mesmas e a atuação de proteases, respectivamente.

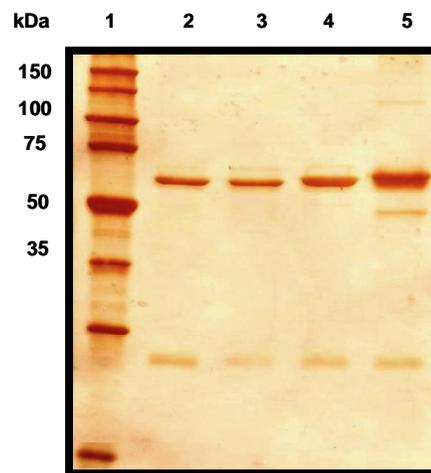


Figura 13. Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (SDS-PAGE a 12%). 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa ativada e biotiniada, 3: proteína Cry1Ab ativada e biotiniada, 4: proteína Cry1Ac ativada e biotiniada e 5: proteína Cry2Aa ativada e biotiniada.

5.5 - Ensaio de ligação

As membranas contendo as BBMV das populações de *A. gemmatilis* susceptíveis e resistentes apresentaram ligações quando submetidas à marcação com as proteínas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Todas as proteínas solúveis ligaram-se aos possíveis receptores das lagartas susceptíveis e resistentes, com exceção da proteína Cry2Aa (Figura 14). Essa proteína ligou-se somente aos possíveis

receptores das lagartas susceptíveis. As proteínas, quando não se encontram na sua conformação ativa, podem se ligar a diversas regiões dos receptores ou não conseguirem se ligar a nenhuma região, pois não ocorre um reconhecimento específico de sítios das proteínas com sítios dos seus receptores. Desse modo, a presença de ligações inespecíficas para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, e a ausência de ligação da proteína Cry2Aa aos receptores da população resistente poderiam ser explicadas por esses dois aspectos. Portanto, a interação das proteínas com seus possíveis receptores dependem da conformação em que as duas estruturas se encontram.

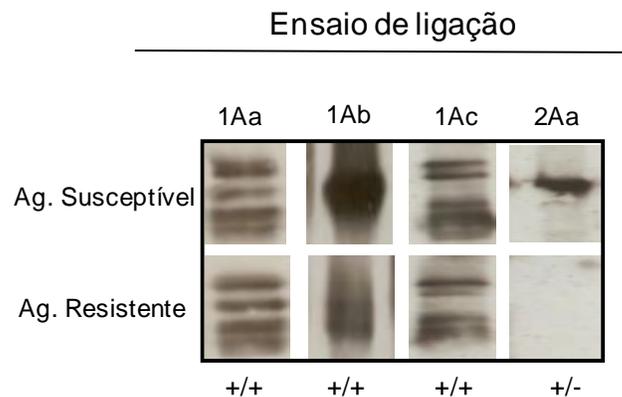


Figura 14. Ensaio de ligação das proteínas solubilizadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores intestinais das populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis*. Os sinais positivos indicam a ocorrência de ligação das proteínas aos receptores, enquanto os sinais negativos representam a ausência de ligação das proteínas aos receptores.

No caso das proteínas ativadas, todas apresentaram ligações aos receptores das duas populações de *A. gemmatalis* (Figura 15). Este resultado indica que todas as proteínas ligam-se aos possíveis receptores da membrana apical do intestino médio das lagartas testadas. Desse modo, teoricamente, essas proteínas são capazes de exercer sua atividade e conseqüentemente provocar a morte do inseto. A ligação das proteínas aos receptores não significa, necessariamente, que elas apresentam toxicidade a *A. gemmatalis*, porém se não ocorresse ligação de alguma das proteínas aos receptores, poderíamos presumir que receptores específicos para a toxina que não conseguiu se ligar sofreu algum tipo de modificação, provocando assim, o surgimento de resistência.

Xie e colaboradores (2005) demonstraram que a diminuição de ligação da proteína Cry1Ac aos receptores do tipo caderina em *H. virescens* podem provocar o surgimento de populações resistentes. Nesse trabalho foram realizadas mutações em sítios específicos dos receptores, provocando uma diminuição na ligação da proteína aos seus receptores, e conseqüentemente uma diminuição na toxicidade da toxina.

Tabashnik *et al.* (1997) demonstraram que populações de *P. xylostella* tornaram-se altamente resistentes às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac devido a aplicações de bioinseticidas à base de Bt. O surgimento de resistência nas populações de *P. xylostella* foi devido a modificações nos receptores para as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac. Os resultados descritos por Tabashnik apresentam semelhanças e diferenças com os resultados do nosso trabalho. As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac não conseguiram se ligar aos seus receptores, porém a ligação da proteína Cry1Aa aos receptores não foi alterada, apesar dessa linhagem possuir uma alta taxa de resistência a essa proteína (Tabashnik *et al.*, 1997). Estudos recentes confirmaram que a resistência desta população de insetos não está relacionada a mutações no gene da caderina (Baxter *et al.*, 2005) e nem a mutações em genes responsáveis pelos outros receptores, como aminopeptidases, fosfatase alcalinas ou glicolipídios (Baxter *et al.*, 2008). Existe a possibilidade que a população resistente tenha uma mutação nos genes de outras proteínas que possam funcionar como receptores primários das toxinas (Bravo & Soberón, 2008).

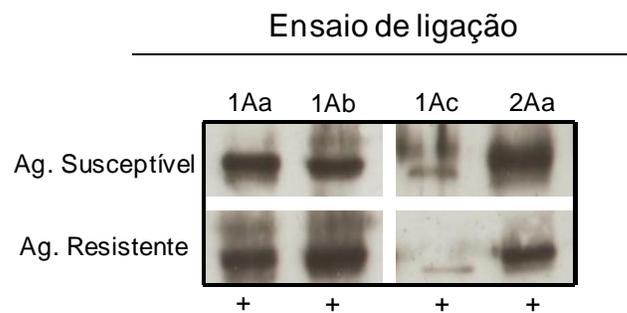
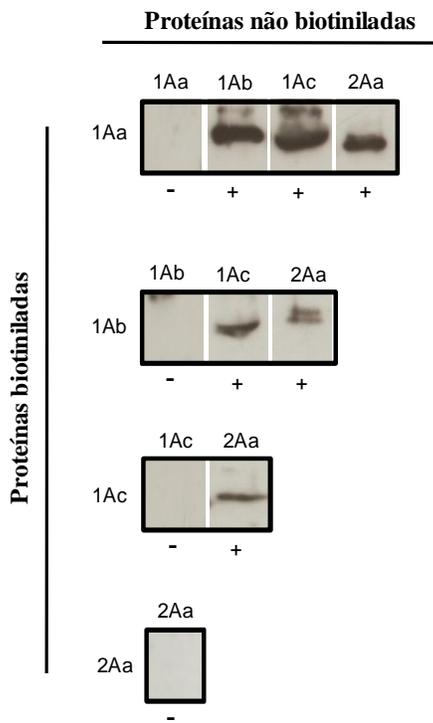


Figura 15. Ensaio de ligação das proteínas ativadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos possíveis receptores intestinais de populações suscetíveis e resistentes de *A. gemmatilis*. Os sinais positivos indicam a ocorrência de ligação das proteínas aos possíveis receptores.

5.6 - Ensaio de competição heteróloga

Os ensaios de competição heteróloga foram realizados com as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para as populações resistente e susceptível de *A. gemmatalis* (figura 16). Neste ensaio, a marcação do filme fotográfico indica que a proteína biotinilada conseguiu se ligar aos seus receptores, enquanto a falta de marcação indica que a proteína biotinilada não conseguiu se ligar, isto é, as proteínas não-biotiniladas se ligaram aos receptores, impedindo dessa maneira a ligação das proteínas biotiniladas. Os resultados demonstraram que não ocorreu marcação quando as mesmas proteínas (biotiniladas e não-biotiniladas) foram incubadas com os receptores das populações susceptível e resistente (figura 16). Isso acontece devido ao fato das proteínas não-biotiniladas possuírem uma concentração superior a concentração das proteínas biotiniladas.

População susceptível:



População resistente:

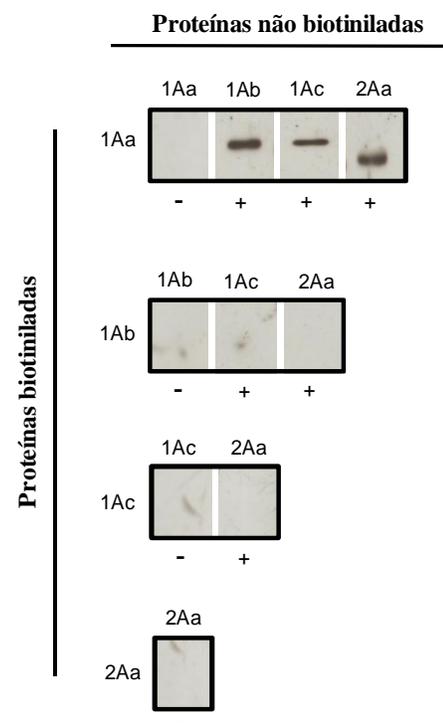


Figura 16. Ensaio de competição heteróloga das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa aos receptores intestinais de populações de *A. gemmatalis* susceptível e resistente. Os sinais positivos indicam que não ocorreu competição entre as proteínas testadas, enquanto os sinais negativos indicam ocorrência de competição entre as proteínas

Os resultados obtidos para a população susceptível não demonstraram competição entre as proteínas pelos receptores. Portanto as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa conseguem se ligar aos receptores da população susceptível quando são incubadas ao mesmo tempo (figura 16). No caso da população resistente de *A. gemmatalis*, a proteína Cry1Aa apresentou marcação quando incubada com as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (Figura 16). Portanto, a proteína Cry1Aa não compete pelos mesmos sítios de ligação das outras proteínas. O resultado apresentado para as populações resistentes é idêntico com os resultados apresentado para a população susceptível. Desse modo, é muito provável que a resistência das lagartas não foi ocasionada por alguma mutação no sítio de ligação das proteínas Cry1Aa. Entretanto, esses resultados diferem de outros trabalhos como o de Estela *et al.* (2003), onde foi demonstrado em uma população resistente de *H. armigera*, que havia competição da proteína Cry1Aa pelo mesmo sítio de ligação das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac. Ballester *et al.* (1999), também, demonstraram competição entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab por sítios de ligação em populações resistentes de *P. xylostella*. Neste caso, não foi verificado qualquer tipo de competição entre as proteínas testadas nas populações susceptíveis. A diferença encontrada entre os trabalhos pode ser explicada pelo fato das mutações poderem ocorrer em locais diferentes dos receptores ou por terem sido utilizadas espécies diferentes de lepidópteros. Algumas espécies de lepidópteros podem possuir diferentes sítios de ligação ou diferentes receptores para as proteínas Cry da mesma família (Bravo *et al.*, 2007).

Outro resultado obtido no ensaio de competição heteróloga para a população resistente foi a competição da proteína Cry1Ab com as proteínas Cry1Ac e Cry2Aa (Figura 16). Portanto, a proteína Cry1Ab liga-se a sítios semelhantes aos sítios das outras proteínas. Esse resultado não coincidiu com os resultados apresentados para a população susceptível. Assim, infere-se que pode ter ocorrido alguma modificação no sítio de ligação do receptor para essas proteínas, ocasionando o surgimento de resistência. Esses resultados são semelhantes aos resultados obtidos por Ballester *et al.* (1999) que demonstraram a ocorrência de mutações em sítios de ligação das toxinas Cry1Ab e Cry1Ac, provocando o surgimento de resistência em duas populações de *P. xylostella*. Vários trabalhos relatam que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac possuem interação com os mesmos sítios para populações de lepidópteros (Estada & Ferré, 1994; Escriche *et al.*, 1997; Ballester *et al.*, 1999). Estada & Ferré (1994) demonstraram que essas proteínas competem pelo mesmo sítio de ligação em populações susceptíveis de

Trichoplusia ni, diferentemente do que foi relatado nesse trabalho para a população de *A. gemmatalis* susceptível.

Em relação ao ensaio de competição entre as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa (Figura 16), foi demonstrado competição entre as três proteínas. Nesse caso, a proteína Cry2Aa compete tanto com a proteína Cry1Ab, quanto com a proteína Cry1Ac. A resistência de lepidópteros as proteínas Cry1A e Cry2Aa é difícil de ser encontrada, pois a proteína Cry2Aa possui baixa homologia com as proteínas Cry1A (Tabashnik *et al.*, 1996) e, geralmente, não se liga aos mesmos sítios de ligação das proteínas Cry1A para lepidópteros (Jurat-Fuentes *et al.*, 2003). Resultados semelhantes a estes já foram descritos para outras populações resistentes de lepidópteros (Jurat-Fuentes *et al.*, 2003). Nesse caso, duas linhagens de *H. virescens*, que são resistentes à proteína Cry1Ac, adquiriram resistência à proteína Cry2Aa. Entretanto, a resistência das populações foi identificada através da realização de bioensaios, pois os ensaios de competição heteróloga não identificaram competição das proteínas pelo mesmo sítio de ligação, sugerindo assim que a resistência adquirida não foi devida a modificações nos sítios de ligação dos receptores.

5.7 - Ensaio de ligação para determinação do tamanho do receptor

As proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI) possuem grande importância na interação das toxinas Cry1 em populações de lepidópteros (Bravo *et al.*, 2007). Para determinar o envolvimento desses receptores na ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa às BBMV's de *A. gemmatalis*, realizou-se a ligação dessas proteínas biotinizadas às BBMV's não tratadas com fosfolipase, às BBMV's tratadas com fosfolipase e aos receptores purificados por cromatografia de afinidade. A utilização de fosfolipases, que são enzimas capazes de clivar a ligação das proteínas ancoradas ao GPI, torna-se necessária para que seja possível a determinação exata do tamanho do receptor.

As membranas contendo as BBMV's não tratadas com fosfolipase (PIPLC), as BBMV's tratadas com fosfolipase (PIPLC) e os receptores purificados das populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* apresentaram ligações quando submetidas à marcação com as proteínas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A (Figura 17). Nas populações susceptível e resistente, todas as proteínas ligaram-se a receptores de massa molecular de 65 kDa, aproximadamente. Esse resultado indica que os receptores

das populações susceptível e resistente sejam os mesmos, porém ensaios enzimáticos devem ser realizados para que essa hipótese seja confirmada. Além disso, todas as frações testadas demonstraram ligações das proteínas a um único receptor de 65 kDa (Figura 17). Esses resultados não estão de acordo com os resultados obtidos por Fernandez *et al.* (2006). Nesse caso, as três frações avaliadas (BBMVs tratadas com fosfolipase, BBMVs não tratadas com fosfolipase e receptores purificados por cromatografia de afinidade) apresentaram perfis protéicos diferentes para a ligação da proteína Cry11A as BBMVs de *A. aegypti*.

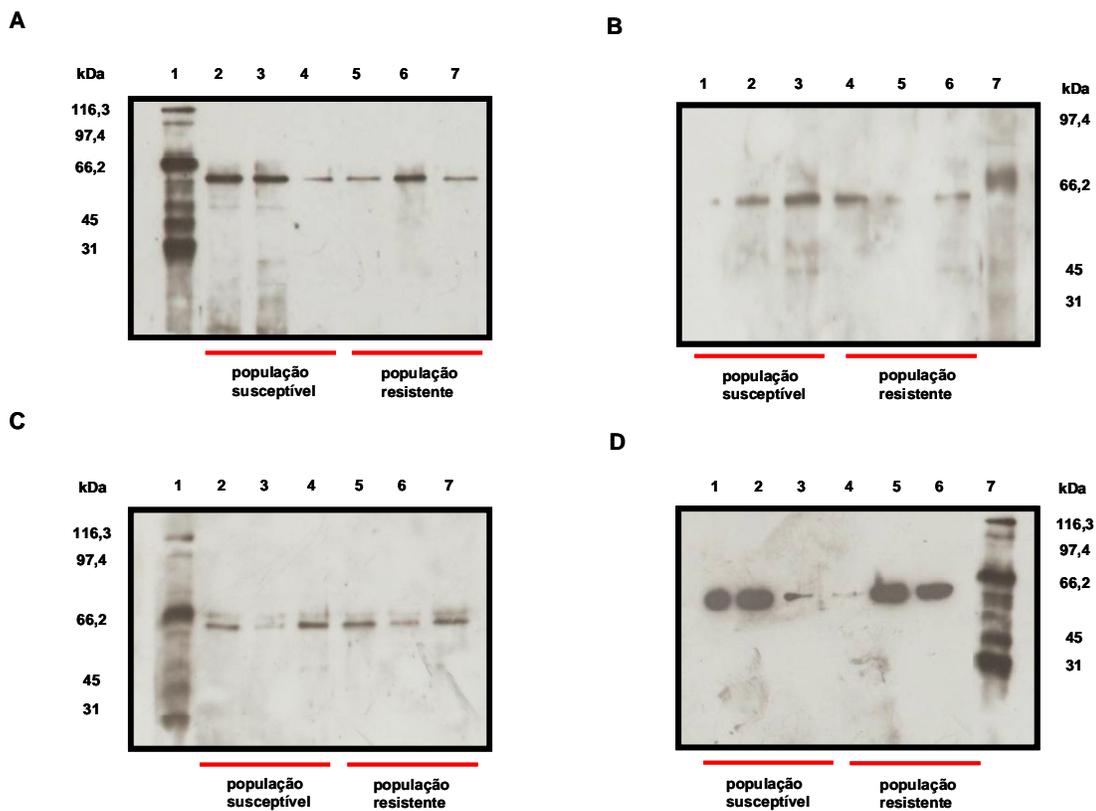


Figura 17. Ensaio de ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A aos possíveis receptores intestinais de *A. gemmatalis*. A) Ensaio de ligação da proteína Cry1Aa. 1: marcador Biotinylated High range (BioRad), 2 e 5: BBMVs não tratada com PIPLC, 3 e 6: BBMVs tratada com PIPLC, e 4 e 7: receptores purificados. B) Ensaio de ligação da proteína Cry1Ab. 1 e 4: BBMVs não tratada com PIPLC, 2 e 5: BBMVs tratada com PIPLC, e 3 e 6: receptores purificados, e 7: marcador Biotinylated High range (BioRad). C) Ensaio de ligação da proteína Cry1Ac. 1: marcador Biotinylated High range (BioRad), 2 e 5: BBMVs não tratada com PIPLC, 3 e 6: BBMVs tratada com PIPLC, e 4 e 7: receptores purificados. D) Ensaio de ligação da proteína Cry2Aa. 1 e 4: BBMVs não tratada com PIPLC, 2 e 5: BBMVs tratada com PIPLC, e 3 e 6: receptores purificados, e 7: marcador Biotinylated High range (BioRad).

Jurat-Fuentes & Adang (2004) demonstraram ocorrer ligação da proteína Cry1Ac a uma proteína de massa molecular de 68 kDa em *H. virescens*. Essa proteína, ancorada ao GPI, foi identificada como uma fosfatase alcalina. Além disso, Fernandez *et al.* (2006) identificaram a ligação da proteína Cry11Aa a uma fosfatase alcalina de massa molecular de 65 kDa em *A. aegypti*. Yaoi *et al.* (1997) comprovaram que existe ligação da proteína Cry1Aa a uma aminopeptidase N de 120 kDa em *B. mori*, enquanto Denolf *et al.* (1997) identificaram que a proteína Cry1Ab liga-se a uma aminopeptidase N de massa molecular de 120 kDa em *P. xylostella* e *M. sexta*. Desse modo, pode-se inferir que os receptores para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa são provavelmente fosfatases alcalinas, pois o tamanho identificado dos receptores para essas proteínas coincidem com o tamanho de fosfatases alcalinas descritos por outros trabalhos. Entretanto, novos testes serão realizados para que se comprove essa hipótese.

Todas essas observações sugerem que a natureza dos sítios de ligação ou os tipos de receptores para as proteínas Cry variam de acordo com a espécie dos insetos e que a interação de várias toxinas com seus sítios de ligação de uma espécie pode não ser igual à interação apresentada por outra espécie. Desse modo, deve-se tomar muito cuidado na escolha dos genes que serão utilizados em culturas transgênicas, evitando assim a seleção de populações resistentes de insetos.

5.8 - Bioensaios para *A. gemmatalis*: mistura de esporos e cristais

Os resultados dos bioensaios utilizando as estirpes liofilizadas, que são caracterizadas pela presença de esporos e cristais protéicos, mostraram haver toxicidade de todas as proteínas testadas para lagartas de segundo estágio da população susceptível de *A. gemmatalis* (Tabela 2). As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac apresentaram eficiência maior do que as proteínas Cry1Aa e Cry2Aa. Apesar da proteína Cry1Ab apresentar CL_{50} menor que a proteína Cry1Ac, ocorreu a sobreposição dos intervalos de confiança dessas duas proteínas. Portanto, seus valores não diferem estatisticamente. As CL_{50} apresentadas pelas duas proteínas foram cerca de duas vezes menor do que a CL_{50} da proteína Cry1Aa e oito vezes menor do que CL_{50} da proteína Cry2Aa. Além disso, os valores obtidos para as proteínas Cry1Aa e Cry2Aa diferem estatisticamente. Logo, a proteína Cry2Aa foi a menos ativa para a população susceptível de *A. gemmatalis*.

Fortier *et al.* (2007) apresentaram resultados parecidos para *M. sexta*. Nesse trabalho, foram realizados bioensaios utilizando as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac para populações susceptíveis de *M. sexta*. Todas as proteínas apresentaram toxicidades semelhantes. A proteína Cry1Aa apresentou CL_{50} de 27 ng/cm², a proteína Cry1Ab apresentou CL_{50} de 39 ng/cm² e a proteína Cry1Ac apresentou CL_{50} de 34 ng/cm². Entretanto, Liao *et al.* (2002) apresentaram resultados diferentes. Nesse trabalho, foi demonstrado que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram menos eficientes do que a proteína Cry2Aa para população susceptível de *Helicoverpa punctigera*. A CL_{50} obtida para a proteína Cry2Aa foi de 52 ng/cm², enquanto para as proteínas Cry1Ac e Cry1Ab foram de 108 e 355 ng/cm², respectivamente.

Todas as proteínas são menos tóxicas do que a estirpe HD-1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), que é a estirpe utilizada como referência para o controle de lepidópteros (Tabela 2). Esse resultado pode ser explicado devido ao fato da estirpe HD-1 produzir todas as toxinas que foram testadas separadamente. Portanto, acredita-se que as toxinas ajam de forma sinérgica, apesar dessa hipótese ainda não ser confirmada para *A. gemmatalis*. A CL_{50} e o intervalo de confiança obtidos para a estirpe HD-1 (Tabela 2) foram semelhantes aos valores descritos em outros trabalhos. Monnerat *et al.* (2007) obtiveram uma CL_{50} de 13,7 ng/cm² e intervalo de confiança de 9,0 – 20,0 ng/cm² para *A. gemmatalis*.

Os resultados dos bioensaios mostraram que todas as estirpes liofilizadas apresentaram toxicidade para larvas de segundo instar da população resistente de *A. gemmatalis* (Tabela 2). Além disso, todas as proteínas testadas apresentaram toxicidades semelhantes. Nesse caso, ocorreu uma sobreposição dos intervalos de confiança de todas as proteínas, com exceção da estirpe HD-1. A CL_{50} da estirpe HD-1 difere estatisticamente dos valores das CL_{50} obtidas para todas as outras proteínas, mostrando que a estirpe é mais ativa do que as proteínas testadas individualmente.

Tabela 2. Resultado dos bioensaios para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* utilizando as estirpes liofilizadas, que produzem as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, e a estirpe HD-1 (Btk).

População susceptível de <i>A. gemmatalis</i>		
Mistura esporos/cristais protéicos	CL₅₀ (ng/cm²)	Intervalo de confiança (ng/cm²)
Cry1Aa	40,77	33,18 - 50,38
Cry1Ab	24,84	20,99 - 29,25
Cry1Ac	27,03	22,41 - 32,16
Cry2Aa	185,19	137,84 - 240,70
HD-1 (Btk)	13,73	9,09 - 20,09
População resistente de <i>A. gemmatalis</i>		
Mistura esporos/cristais protéicos	CL₅₀ (ng/cm²)	Intervalo de confiança (ng/cm²)
Cry1Aa	58,86	38,81 - 92,35
Cry1Ab	50,27	41,72 - 60,96
Cry1Ac	45,51	38,08 - 54,29
Cry2Aa	61,74	44,82 - 91,51
HD-1 (Btk)	31,49	25,21 - 38,05

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que os valores da CL₅₀ da proteína Cry1Aa não diferem estatisticamente entre a população susceptível e resistente de *A. gemmatalis*. Os valores estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de competição heteróloga (Figura 16), onde a proteína Cry1Aa não compete com nenhuma outra proteína pelos sítios de ligação dos receptores nas duas populações de *A. gemmatalis*. Portanto, a toxicidade da proteína Cry1Aa deve-se manter igual tanto para a população susceptível quanto para a população resistente. Diferentemente desses resultados, González-Cabrera *et al.* (2006) demonstraram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac possuem os mesmos sítios de ligação nos receptores de populações susceptíveis de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae).

Os valores das CL₅₀ das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram diferentes estatisticamente, quando comparados entre a população susceptível e resistente de *A. gemmatalis* (Tabela 2). As duas proteínas são cerca de duas vezes mais tóxicas para a população susceptível do que para a população resistente. Esses dados confirmam os resultados obtidos pelo ensaio de competição heteróloga (Figura 16), pois as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac competem entre si e com a proteína Cry2Aa pelos mesmos sítios de ligação dos receptores na população resistente. Deste modo, a toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac tende a diminuir para a população resistente.

Os resultados obtidos para as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac diferem dos resultados obtidos para a proteína Cry2Aa. Neste caso, a proteína Cry2Aa tornou-se três vezes mais tóxica para a população resistente (Tabela 2). As modificações dos receptores,

provavelmente, provocaram uma interação mais específica da proteína Cry2Aa, aumentando dessa maneira a toxicidade da proteína. Resultados semelhantes foram obtidos por outros trabalhos. Van Rie *et al.* (1990) relatou o surgimento de resistência de populações de *P. interpunctella* a proteína Cry1Ab. Nesse caso, as lagartas resistentes possuíam modificações nos sítios dos receptores responsáveis pela ligação da proteína Cry1Ab, causando uma redução de 50% na ligação das proteínas aos receptores. Além disso, a modificação dos sítios dos receptores provocou uma alteração na ligação da proteína Cry1Ca aos seus receptores. Desse modo, essa proteína passou a se ligar de forma mais eficiente a um sítio diferente do receptor, provocando um aumento de toxicidade dessa proteína.

A estirpe HD-1 apresentou CL_{50} de 13,73 ng/cm² e 31,49 ng/cm² para a população susceptível e resistente, respectivamente. Esses resultados são diferentes estatisticamente, pois seus intervalos de confiança não se sobrepõem. Portanto, a estirpe de referência é cerca de duas vezes e meia mais eficiente para a população susceptível do que para a população resistente. Acredita-se que a população de *A. gemmatalis* adquiriu resistência à estirpe HD-1 devido ao fato das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, que são as proteínas mais tóxicas para essa lagarta, não conseguirem se ligar aos receptores de forma eficiente, quando elas estão juntas ou na presença da proteína Cry2Aa (Figura 16). Entretanto, o grau de resistência das lagartas não foi muito elevado. Esse fato pode ser explicado por alguns motivos. A toxicidade da proteína Cry1Aa não foi alterada, portanto essa proteína manteve seu nível de toxicidade para a população resistente. As toxicidades das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac não foram muito alteradas (Tabela 2). Além disso, apesar da toxicidade da proteína Cry2Aa ter melhorado, essa proteína é a menos eficiente no combate da lagarta. Desse modo, essa proteína não contribui muito para que a CL_{50} da estirpe S1450 aumente para a população resistente.

Esses resultados evidenciam uma conexão entre ligação das toxinas aos receptores e resistência, demonstram a complexidade das interações das proteínas Cry com seus receptores, e apresentam um modelo em que duas toxinas podem funcionar de forma diferente do proposto anteriormente a partir de suas adaptações a um dos vários sítios de ligação existentes no intestino.

5.9 - Bioensaios para *A. gemmatalis*: proteínas purificadas

A tabela 3 mostra os resultados dos bioensaios realizados com as proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para lagartas de segundo ínstar da população susceptível de *A. gemmatalis*. Os valores obtidos mostram que a CL₅₀ das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac não diferem estatisticamente. A proteína Cry1Ac foi cerca de 16 e 85 vezes mais tóxica do que as proteínas Cry1Aa e Cry2Aa, respectivamente. Além disso, a proteína Cry1Ab foi cerca de 120 e 600 vezes mais tóxica do que as proteínas Cry1Aa e Cry2Aa, respectivamente. Os valores de CL₅₀ das proteínas Cry1Aa e Cry2Aa são diferentes estatisticamente. A proteína Cry1Aa foi cinco vezes mais eficiente do que a proteína Cry2Aa. Desse modo, a proteína Cry2Aa foi a menos efetiva para as lagartas da população susceptível.

Gilliland *et al.* (2002) descreveu resultados semelhantes para a proteína Cry1Ac. Nesse caso, as proteínas Cry1Ac foram administradas para lagartas de terceiro ínstar de *M. sexta* e *Pieris brassicae*, que apresentaram CL₅₀ de 1,2 µg/mL e 0,87 µg/mL. Além disso, a proteína Cry1Ac foi a mais tóxica para essas lagartas quando comparadas com outras proteínas da família Cry1. Monnerat *et al.* (1999) realizaram bioensaios utilizando as protoxinas purificadas Cry1Ab e Cry2Aa para populações susceptíveis de *P. xylostella*. A proteína Cry1Ab foi a mais tóxica para essas lagartas, enquanto a proteína Cry2Aa foi a que menos apresentou toxicidade. Nesse caso, a toxicidade da proteína Cry1Ab foi 100 vezes maior do que a toxicidade da proteína Cry2Aa.

As proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram utilizadas em bioensaios para lagartas de segundo ínstar da população resistente de *A. gemmatalis*. Os resultados obtidos desses experimentos mostraram que todas elas apresentam toxicidade para lagartas dessa espécie (Tabela 3). As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac apresentaram toxicidade semelhante, pois os valores obtidos para essas proteínas não diferem estatisticamente. As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac são cerca de duas e oito vezes mais potentes do que as proteínas Cry1Aa e Cry2Aa, respectivamente. Quando os valores de toxicidade das proteínas Cry1Aa e Cry2Aa são comparados, há diferença estatística, pois seus intervalos de confiança não se sobrepõem. A proteína Cry1Aa é cerca de quatro vezes mais tóxica do que a proteína Cry2Aa.

Tabela 3 – Resultado dos bioensaios para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* utilizando as proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa expressas em Bt.

População susceptível de <i>A. gemmatalis</i>		
Proteínas Purificadas	CL₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (µg/mL)
Cry1Aa	14,71	10,44 - 20,55
Cry1Ab	0,11	0,01 - 0,45
Cry1Ac	0,85	0,13 - 2,98
Cry2Aa	62,39	40,20 - 97,53
População resistente de <i>A. gemmatalis</i>		
Proteínas Purificadas	CL₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (µg/mL)
Cry1Aa	22,87	18,02 - 28,97
Cry1Ab	8,74	2,44 - 17,03
Cry1Ac	10,71	5,73 - 16,79
Cry2Aa	75,33	29,62 - 129,50

Os valores de CL₅₀ da proteína Cry1Aa para as populações susceptíveis e resistentes não apresentaram alterações, pois seus intervalos de confiança se sobrepõem (Tabela 3). Esses valores estão de acordo com os resultados obtidos para os bioensaios com as estirpes liofilizadas (Tabela 2). O fato de essa proteína apresentar CL₅₀ semelhante para as duas populações deve-se, provavelmente, a ausência de alterações dos seus receptores nas duas populações (Figura 16).

Os resultados da tabela 3 mostram que os valores da CL₅₀ para as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac diferem estatisticamente entre a população susceptível e resistente. As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac apresentaram toxicidade em torno de 70 e 11 vezes superior para a população susceptível. A população tornou-se resistente pelos mesmos motivos discutidos nos bioensaios realizados com as estirpes liofilizadas (esporos e cristais protéicos). Entretanto, o nível de resistência adquirido pela população resistente nos bioensaios com proteínas purificadas foi muito superior ao encontrado para os bioensaios com estirpes liofilizadas.

Assim como as proteínas Cry1Aa, as proteínas Cry2Aa não apresentaram diferenças estatísticas entre os valores de CL₅₀ para as populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis* (Tabela 3). Esse resultado difere do obtido pelos bioensaios com as estirpes liofilizadas, no qual a proteína Cry2Aa apresentou uma melhora significativa na sua atividade para a população resistente. Essa diferença pode ser explicada pela presença de outras proteínas no bioensaio das estirpes liofilizadas. Essas proteínas podem de alguma forma facilitar a interação da proteína Cry2Aa com seus receptores.

Jurat-Fuentes *et al.* (2003) testaram as proteínas Cry1Ac e Cry2Aa para populações susceptíveis e resistentes de *H. virescens*. Para a população susceptível, as CL₅₀ obtidas das proteínas Cry1Ac e Cry2Aa foram de 0,73 e 4,3 µg/mL, respectivamente. Para a população resistente, as CL₅₀ obtidas das proteínas Cry1Ac e Cry2Aa foram de 211 e 1000 µg/mL, respectivamente. Logo, a proteína Cry1Ac é cerca de 300 vezes mais tóxica para a população susceptível, enquanto a proteína Cry2Aa é cerca de 250 vezes mais tóxica para a população susceptível.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tomando como base os objetivos estabelecidos no início deste trabalho conclui-se que:

- Objetivo 1 : Determinar a toxicidade das proteínas purificadas, e da mistura esporo e cristais protéicos de *B. thuringiensis* para populações susceptíveis e resistente de *A. gemmatalis*.
 - **Conclusão:**
 - ✓ **As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa purificadas e as estirpes liofilizadas, que produzem essas proteínas, apresentaram toxicidade para as populações susceptível e resistente de *A. gemmatalis*;**
 - ✓ **As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram as mais tóxicas para a população susceptível de *A. gemmatalis*, enquanto a proteína Cry2Aa foi a menos tóxica;**
 - ✓ **A população resistente tornou-se menos susceptível à estirpe HD-1 (Btk) e às proteínas Cry1Ab e Cry1Ac.**
 - ✓ **A proteína Cry2Aa tornou-se mais tóxica para a população resistente do que para a população susceptível nos bioensaios com as estirpes liofilizadas (mistura esporos e cristais).**

- Objetivo 2: Comparar as possíveis diferenças encontradas entre as populações resistentes e susceptíveis de *A. gemmatalis*.
 - **Conclusão:**
 - ✓ **A resistência adquirida pela população resistente de *A. gemmatalis* não é devida a diferenças de ativação das proteínas e dificuldade de ligação das proteínas aos seus receptores;**

- ✓ **As proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa competem pelos mesmos sítios de ligação nos receptores das populações resistentes;**
- Identificar possíveis receptores das proteínas de *B. thuringiensis* para populações susceptíveis e resistentes de *A. gemmatalis*.
 - **Conclusão:**
 - ✓ **Os possíveis receptores para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para as populações susceptível e resistente de *A. gemmatalis* são proteínas de massa molecular de 65 kDa.**

Deste modo, visando dar continuidade ao trabalho pretende-se:

- Realizar ensaios enzimáticos para a determinação exata dos receptores de *A. gemmatalis* para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa;
- Realizar ensaios de ligação e competição heteróloga com as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa ativadas pelas proteases das populações susceptível e resistente;
- Determinar o grau de sinergismo das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa para *A. gemmatalis* a partir de novos bioensaios para a população susceptível e resistente.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA, E., SANCHEZ, J., PERFEROEN, M., GÜERECA, L., BRAVO, A. (1996) Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**: 68, p. 203-212.

ARONSON, A. I., BECKMAN, W., DUNN, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**: 50, p. 1-24.

ARONSON, A.I. & SHAI, Y., (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**: 195, p. 1–8.

BALLESTER, V., GRANERO, F., TABASHNIK, B. E., MALVAR, T., FERRÉ, J. (1999). Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**: 65, n°. 4, p. 1413–1419.

BAUM, J.A. & MALVAR, T. (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**: 18, p. 1-12.

BAXTER, S.W., ZHAO, J. Z., GAHAN, L. J., SHELTON, A. M., TABASHNIK, B. E., HECKEL, D. G. (2005). Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt in *Plutella xylostella*. **Insect Molecular Biology**: 14, p. 327–334.

BAXTER, S.W., ZHAO, J. Z., SHELTON, A. M., VOGEL, H., HECKEL, D. G. (2008). Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 38, p. 125–135.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**: 8, p. 93-99.

BIETLOT, H., P. R. CAREY, C. CHOMA, H. KAPLAN, T. LESSARD, M. POZSGAY. (1989). Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Biochemical Journal**. 260. p. 87–91.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**: 72, p. 248-254.

BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLA-LOBOS, F. J., GUADALUPE, P., NUNEZ-VALDEZ, M. E., SOBERÓN, M.,

QUINTERO, R. (1998). Characterization of Cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**: 64, p. 4965 – 4972.

BRAVO, A., GOMEZ, I., CONDE, J., MUNOZ-GARAY, C., SANCHEZ, J., ZHUANG, M., GILL, S.S., SOBERÓN, M., (2004). Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochemistry and Biophysical Acta**: 1667, p. 38–46.

BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M., (2005). *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use. **Comprehensive Molecular Insect Science**: 6, p. 175–206.

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

BRAVO, A. & SOBERÓN, M. (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**: 26, p. 573-579.

COSTILLA, M. (1988). Biología e importância de la oruga verde de la soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**: 65, p. 169-184.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**: 62, 807-813.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., BRAVO, A., DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ (acesso: abril de 2009).

DAI, S. M. & GILL, S. S. (1993). In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CRYIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 23, p. 273-283.

DE MAAGD, R. A., BRAVO, A., CRICKMORE, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**: 17, p. 193-199.

DENOLF, P., HENDRICKX, K., VAN DAMME, J., JANSSENS, S., PEFEROEN, M., DEGHEELE, D., VAN RIE, J. (1997). Cloning and characterization of *Manduca Sexta* and *Plutella Xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. **European Journal of Biochemistry**: 248, p. 748 – 761.

- DU, C. & NICKERSON, K. W. (1996). *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**: 62, p. 3722-3726.
- DULMAGE, H. T. (1970). Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**: 15, p. 232-239.
- ELLISOR, L. O. (1942). Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin**: 350, p. 17-23.
- ERS-USDA (2008). Soybeans and Oils Crops. <http://www.ers.usda.gov/Briefing/SoybeansOilCrops/> (acesso: dezembro de 2008).
- ESCRICHE, B., FERRÉ, J., SILVA, F. J. (1997). Occurrence of a common binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins CryIA from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 27, p. 651–656.
- ESTADA, U. & FERRÉ, J. (1994). Binding of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* to the Midgut Brush Border of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), and Selection for Resistance to One of the Crystal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**: 60, p. 3840-3846.
- ESTELA, A., ESCRICHE, B., FERRÉ, J. (2003). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Toxins with Larval Midgut Binding Sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**: 70, p. 1378–1384.
- ESTRUCH, J. J., WARREN, G. W., MULLINS, M. A., NYE, G. J., GRAIG, J. A., KOZIEL, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 93, p. 5389-5394.
- ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N. B., DESAI, N., DUCK, N. B., WARREN, G. W., KOZIEL, M. G. (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**: 15, p. 137-141.
- FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J. AND SORM, F. (1969). The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**: 34, p. 1118-1120.
- FAUST, R. M. & BULLA, L. A. (1982). Bacteria and their toxins as insecticides, p. 75-208. In E. Kurstak (ed.), **Microbial and viral pesticides**. New York.

- FEITELSON, J. S. PAYNE, J. AND KIM, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**: 10, p. 271-275.
- FERNANDEZ, L. E., AIMANOVA, K. G., GILL, S. S., BRAVO, A., SOBERON, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical Journal**: 394, p.77–84.
- FINNEY, D. (1971). Probit analysis. **Cambridge University Press**, Cambridge, England.
- FISCHHOFF, D.A. Insect tolerant transgenic tomato plants. (1987). **Biotechnology**: 5, p. 807-813.
- FORCADA, C., ALCACER, E., GARCERA, M. D., MARTINEZ, R. (1996). Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: 31, p. 257–272.
- FORCADA, C., ALCACER, E., GARCERA, M. D., TATO, A., MARTINEZ, R. (1999). Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: 42, p. 51–63.
- FORD, B. J., STRAYER, J. R., REID, J., BLOUNT, V. N., RIDDLE, T. C. (1975). The literature of arthropods associated with soybean, a bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Urbana: Illinois National History Survey (Biological Notes)**: 92, p. 15.
- FORTIER, M., VACHON, V., FRUTOS, R., SCHWARTZ, J., LAPRADE, R. (2007). Effect of Insect Larval Midgut Proteases on the Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**: 73, p. 6208–6213.
- FUGI, C. G. Q. (2003). Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias**, Universidade de São Paulo, 68 p.
- GAHAN, L. J., GOULD, F., HECKEL, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**: 293, p. 857–860.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., DE BAPTISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIN, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C. (2002). **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p.

GAZZONI, D. L. & YORINIORI, J. T. (1995). Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Boletim de pesquisa, Brasília: Embrapa – SPI. 128 p.

GILL, S. S., COWLES, E. A., FRANCIS, V. (1995). Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **Journal of Biological Chemistry**: 266, p. 17954-17958.

GILLILAND, A., CHAMBERS, C. E., BONE, E. J., ELLAR, D. J. (2002). Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ Endotoxin Binding in Determining Potency during Lepidopteran Larval Development. **Applied and Environmental Microbiology**: 68, p. 1509–1515.

GOLDBERG, L. J. & MARGALIT, J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**: 37, p. 355-358.

GÓMEZ, I., J. SÁNCHEZ, R. MIRANDA, A. BRAVO, SOBERÓN, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**: 513, p. 242–246.

GONZÁLEZ-CABRERA, J., FARINÓS, G. P., CACCIA, S., DÍAZ-MENDOZA, M., CASTAÑERA, P., LEONARDI, M. G. GIORDANA, B., FERRÉ, J. (2006). **Applied and Environmental Microbiology**: 72, p. 2594–2600.

GREENE, G. L., REID, J. C., BLOUNT, V. N., RIDDLE, T. C. (1973). Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology**: 2, p. 1113-1115.

GRIFFITTS, J. S. & AROIAN, R. V. (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **BioEssays**: 27, p. 614–624.

GUNNING, R. V., G. D. MOORES, AND A. L. DEVONSHIRE. (1999). Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**: 63, p. 50–62.

GUNNING, R.V., DANG, H. T., KEMP, F. C., NICHOLSON, I. C., MOORES, G. D. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crop expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**: 71, p. 2558–2563.

HERRERO, S., OPPERT, B., FERRE, J. (2001). Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**: 67, p. 1085–1089.

HOFFMANN-CAMPO, C.B., OLIVEIRA, E.B., MOSCARDI, F. (1985). Criação massal da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*. **Boletim de pesquisa**, Londrina: Embrapa-CNPSO. 23 p.

HANSEN, B. M. & SALAMITOU, S. (2000). Virulence of *Bacillus thuringiensis*. **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**, p. 41-64.

HOFTE, H. & WHITELEY, H. R. (1989). Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**: 53, p. 242-255.

IHARA, H., KURODA, E., WADANO, A., HIMENO, M. (1993). Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **BioScience, Biotechnology and Biochemistry**: 57, p. 200-204.

JANMAAT, A.F. & MYERS, J.H. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Tricoplusia ni*. **Biological Sciences**: 270, p. 2263–2270.

JOHNSON, D.E. & McGAUGHEY, W. H. (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores do toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Current Microbiology**: 33, p. 54-59.

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAND, M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**: 131, p. 1-11.

JURAT-FUENTES, J. L., GOULD, F. L., ADANG, M. J. (2003). Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. **Applied and Environmental Microbiology**: 69, p. 5898–5906.

JURAT-FUENTES, J. L. & ADANG, M.J., (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **European Journal of Biochemistry**: 271, p. 3127–3135.

JURAT-FUENTES, J. L. & ADANG, M. J. (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**: 92, p. 166-171.

KARIM, S. & D. H. DEAN. (2000). Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. **Current Microbiology**: 41, p. 276–283.

KARIM, S., RIAZUDDIN, S., GOULD, F., DEAN., D. H. (2000). Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink

bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**: 67, p. 198–216.

KIROUAC, M., VACHON, V., QUIEVY, D., SCHWARTZ, J., LAPRADE, R. (2005). Protease Inhibitors Fail To Prevent Pore Formation by the Activated *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Aa in Insect Brush Border Membrane Vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**: 72. p. 506–515.

KLETER, G.A. BHULA, R., BODNARUK, K., CARAZO, E., FELSOT A. S., HARRIS, C. A., KATAYAMA, A., KUIPER, H. A., RACKE, K. D., RUBIN, B., SHEVAH, Y., STEPHENSON, G R., TANAKA, K., UNSWORTH, J., WAUCHOPE, R. D., WONG, S. (2007). Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**: 63, p. 1107–1115.

KNIGHT, P., CRICKMORE, N., ELLAR, D. (1994). The receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**: 11, 429–436.

KNOWLES, B. H. & ELLAR, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochimica Et Biophysica Acta**: 924, p. 509-518.

KNOWLES, B.H. & DOW, J.A.T. (1993). The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays**: 15, p. 469-476.

KNOWLES, B.H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**: 24, p. 275-308.

KOLLER, C. N., BAUER, L. S., HOLLINGWORTH, R. M. (1992). Characterization of the pH mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *San Diego* native δ -endotoxin crystal. **Biochemical and Biophysical Research Communications**: 184, p. 692-699.

KRIEG, A. (1971). Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**: 18, p. 425-426.

KRIEG, A., HUGER, A. M., LANGENBRUCH, G. A., SCHNETTER, W. (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**: 96, p. 500-508.

KRYWUNCZYK, J. & FAST, P. G. (1980). Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**: 36, p. 139-140.

- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**: 227, p. 680-685.
- LECHNER, M., KUPKE, T., STEFANOVIC, S., GÖTZ, F. (1989). Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**: 3, p. 621-626.
- LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A., LECADET, M-M. (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice**, p. 37-69.
- LERECLUS, D., AGAISSE, H., GOMITED, M., CHAUF AUX, J. (1995). Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. **Bio/Technology**: 13, p. 67-71.
- LI, J., CARROLL, J., ELLAR, D.J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. **Nature**: 353, p. 815-821.
- LIANG, Y., PATEL, S. S., DEAN, D. H. (1995). Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**: 270, p. 24719-24724.
- LIAO, C., HECKEL, D. G., AKHURST, R. (2002). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**: 80, p. 55–63.
- LOGUERCIO, L. L., CARNEIRO, P. N., CARNEIRO, A. A. (2002). MILHO Bt. Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**: 24, p. 46-52.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**: 193, p. 265-275.
- MA, G. ROBERTS, H., SARJANB, M., FEATHERSTONEC, N., LAHNSTEINC, J., AKHURSTD, R., SCHMIDT, O. (2005). Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 35, p. 729–739.
- MCGAUGHEY, W. H. & JOHNSON, D. E. (1994). Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in indianmeal moths. **Journal of Economic Entomology**: 87, p. 535–540.

MCNALL, R.J. & ADANG, M.J., (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 33, p. 999–1010.

MASSON, L., LU, Y.-J., MAZZA, A., BROSSEAU, R., ADANG, M.J., (1995). The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. The **Journal of Biological Chemistry**: 270, p. 20309–20315.

MIKLOS, J. A., ALIBHAI, M. F., BLEDIG, S. A., CONNOR-WARD, D. C., AI-GUO GAO, HOLMES, B. A., KOLACZ, K. H., KABUYE, V. T., MACRAE, T. C., PARADISE, M., TOEDEBUSCH, A. S., HARRISON, L. A. (2007). Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene that confers a high degree of resistance to lepidopteran pests. **Crop Science Society of America**: 47, p. 148 – 157.

MIRANDA, R., F. Z. ZAMUDIO, BRAVO, A. (2001). Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**: 31, p. 1155–1163.

MOHAN, M. & GUJAR, G. T. (2003). Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**: 82, p. 1–11.

MONNERAT, R. G., MASSON, L., BROUSSEAU, R., PUSZTAI-CAREY, M., BORDAT, D., FRUTOS, R. (1999). Differential Activity and Activation of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins in Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**: 39, p. 159–162.

MONNERAT, R. G. & BRAVO, A. (2000). Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico**: 3, p. 163-200.

MONNERAT, R. G., BATISTA, A., MEDEIROS, P., MARTINS, E. S., MELATTI, V. M., PRAÇA, L. B., DUMAS, V. F., MORINAGA, C., DEMO, C., GOMES, A. C. M., FALCÃO, R., SIQUEIRA, C. B., SILVA-WERNECK, J. O., BERRY, C. (2007). Screening of brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**: 41, p. 291–295.

MORAES, I. O. & CAPALBO, D. M. F. (1986). Produção de bactérias entomopatogênicas. **Controle Microbiano de Insetos**: cap. 16, Sérgio B. Alves. Ed: Manole.

- MORIN, S., BIGGS, R. W., SISTERTON, M. S., SHRIVER, L., KIRK, C. E., (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 100, p. 5004–5009.
- MOSCARDI, F., BARFIELD, C. S., ALLEN, G. E. (1981a). Consumption and development of velvetbean caterpillar as influenced by soybean phenology. **Environmental Entomology**: 10, p. 880-884.
- MOSCARDI, F., BARFIELD, C. S., ALLEN, G. E. (1981b). Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**: 74, p. 167-171.
- MOSCARDI, F. (1998). Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. **Controle Microbiano de Insetos**: 2^a ed. Piracicaba, FEALQ, p. 509 – 539.
- NICHOLS, C. N., W. AHMAD, AND D. J. ELLAR. (1989). Evidence for two different types of insecticidal P2 toxins with dual specificity in *Bacillus thuringiensis* subspecies. **Journal of Bacteriology**: 171. p. 5141–5147.
- OPPERT, B., KRAMER K. J., JOHNSON, D. E., MACINTOSH, S. C., MCGAUGHEY, W. H. (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**: 198, p. 940–947.
- OPPERT, B., KRAMER, K. J., BEEMAN, R. W., JOHNSON, D., MCGAUGHEY, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **The Journal of Biological Chemistry**: 272, p. 23473–23476.
- PARDO-LOPEZ, L., GOMEZ, I., RUSEALL, C., SANCHEZ, J., SOBERON, M., BRAVO, A. (2006). Structural changes of the CryIac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**: 45, p. 10329-10336.
- PRAÇA, L. B. (2003). Prospecção de estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Coleoptera, Lepidoptera e Diptera. **Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias**, Universidade de Brasília. 117 p.
- PRAÇA, L.B., NETO, P. S., MONNERAT, R. G. (2006). *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, Amostragem e Métodos de controle. **Boletim de Pesquisa**: 196. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 17. p.
- PIGOTT, C. R. & ELLAR, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular biology**: 71, p. 255-281.

RABINOVITCH, L., SILVA, C. M. B., ALVES, R. S. de A. (2000). Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. **Controle Biológico**: 2^a ed., Embrapa Meio Ambiente, p.17-90.

RAHMAN, M. M., ROBERTS, H. L., SARJAN, M., ASGARI, S., SCHMIDT, O. (2004). Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 101, p. 2696–2699.

REID, J. C. (1975). Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory. Gainesville, University of Florida, 118 p.

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

SAYYED, A. H., CRICKMORE, N., WRIGHT, J. D. (2001). Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. **Applied and Environmental Microbiology**: 67, p. 5859–5861.

SCHMIDT, F. G. V., MONNERAT, R. G., BORGES, M., CARVALHO, R. (2001). Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos. **Circular Técnica**: 11, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 6 p.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R., DEAN, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: 62, p. 775-806.

SILVA, R. F. P. (1981). Aspectos biológicos e nutrição de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera – Noctuidae) em meio natural e artificial e influência da temperatura e fotoperíodo no seu desenvolvimento. **Dissertação de Mestrado em Ciência Agrárias**, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 130 p.

SILVA, J. F. V., LEITE, R. M. V., HOFFMANN, C. B., GAZZONI, D. L., BROWN, G. G., CARNEIRO, G. E., CORSO, I. C., FERREIRA, L. P., BASSOI, M. C., DIAS, W. P., SARAIVA, O. F. (2004) Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil, Embrapa Soja, Brasília. 239 p.

SILVA-WERNECK, J. O. & ELLAR, D. J. (2008). Characterization of a novel Cry9Bb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**: 98, p. 320 – 328.

SHIMIZU, T. & MORIKAWA, K. (1996). The β -prism: a new folding motif. **Trends in Biochemical Sciences**: 21, p. 3-6.

TABASHNIK, B.E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**: 39. p. 47–79.

TABASHNIK, B. E., MALVAR, T., LIU, Y. B., FINSON, N., BORTHAKUR, D., SHIN, D., PARK, S. H., MASSON, L., DE MAAGD, R. A., BOSCH, R. A. (1996). Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interaction with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**: 62, p. 2839–2844.

TABASHNIK, B. E., LIU, Y. B., MALVAR, T., HECKEL, D. G., MASSON, L. BALLESTER, V., GRANERO, F., MÉNSUA, J., FERRÉ, J. (1997). Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 94, p. 12780–12785.

TABASHNIK, B. E., LIU, Y. B., MALVAR, T., HECKEL, D. G., MASSON, L., FERRE, J. (1998). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? **Philosophical Transactions of The Royal Society London Biological Sciences**: 353, p.1751–1756.

TABASHNIK, B. E., GASSMANN, A. J., CROWDER, D. W., CARRIÈRE, Y. (2008). Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**: 26, p. 199–202.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**: 60, p. 181-197.

VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MELLAERT, H. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. **European Journal of Biochemistry**: 186, p. 239-247.

VAN RIE, J., MCGAUGHEY, W. H., JOHNSON, D. E., BARNETT, B. D., VAN MELLAERT, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**: 247, p. 72–74.

XIE, R., ZHUANG, M., ROSS, L. S., GOMEZ, I., OLTEAN, D. I., BRAVO, A., SOBERON, M., GILL, S. S. (2005). Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **The Journal of Biological Chemistry**: 280, p. 8416–8425.

WEISIER, J. (1986). Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M.. Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft. Berlin: Paul Parey: 233, p. 37-50.

- WHITELEY, H. R. & SCHNEPF, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**: 40, p. 549-576.
- WOLFERSBERG, M. G. (1992). ATPase-energized epithelia and biological insect control. **The Journal of Experimental Biology**: 172, p. 377-386.
- WU, D., CAO, X.L., BAI Y.Y., AROSON A.L (1991). Sequencing of an operon containing a novel δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**: 81, p.31-36.
- YANG, Y., CHEN, H., WU, Y., YANG, Y., WU, S. (2007) Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. **Applied and Environmental Microbiology**: 73, p. 6939–6944.
- YAOI, K., KADOTANI, T., KUWANA, H., SHINKAWA, A., TAKAHASHI, T., IWAHANA, H., SATO, R. (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin. **European Journal of Biochemistry**: 246, p. 652-657.
- YOUSTEN, A. A. (1984). *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**: 3, p. 315-343.
- YU, C-G., MULLINS, M. A., WARREN, G. W., KOZIEL, M. G., ESTRUCH, J. J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p. 532-536.
- ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, M. B., TAUSSIG, R., BULLA, L. A. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 103, p. 9897–9902.
- ZHANG LL, LIN J, LU OSL, GUAN CY, ZHANG QL, GUAN Y, ZHANG Y, JI JT, HUANG ZP, GUAN X. (2007) A novel *Bacillus thuringiensis* strain LLB6, isolated from bryophytes, and its new cry2Ac-type gene. **Letters in Applied Microbiology**: 44, p. 301–307.

CAPÍTULO II

CLONAGEM DO GENE *cyt1Aa* DE *Bacillus thuringiensis* NO GENOMA DO BACULOVIRUS *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) E EM UMA ESTIRPE DE *Bacillus thuringiensis* ACRISTALÍFERA

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente o dengue é a mais importante arbovirose que afeta o ser humano, constituindo-se em um sério problema de saúde pública em diversas áreas tropicais do mundo, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito transmissor da doença, o *Aedes aegypti*. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (Ministério da Saúde, 2009).

O *A. aegypti* encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis à sua rápida propagação como, por exemplo, a crescente urbanização. Um dos principais problemas para o combate deste mosquito é que sua reprodução ocorre em qualquer recipiente utilizado para armazenar água como caixas d'água, pratos, vasos de plantas, tanques, cisternas, pneus, calhas de telhados, e muitos outros onde a água da chuva é coletada ou armazenada (Consoli & Oliveira, 1994). Portanto, considerando essa facilidade de disseminação do vetor, o grau de dificuldade para um efetivo combate à doença é muito alto - o que só é possível com a quebra da cadeia de transmissão, eliminando o mosquito dos locais onde se reproduzem. Desse modo, a prevenção e as medidas de combate exigem a participação e a mobilização de toda a comunidade a partir da adoção de algumas medidas que visam à interrupção do ciclo de transmissão e

contaminação. Dentre essas medidas destacam-se o controle da reprodução do mosquito por métodos químicos e biológicos.

No Brasil, o larvicida mais utilizado para o controle do *A. aegypti* é o produto químico Temefós. Entretanto, a utilização contínua deste organofosforado tem selecionado populações de mosquitos resistentes (Marcoris *et al.*, 1999). Assim, novas alternativas que substituam a utilização dos produtos químicos são necessárias. Uma dessas alternativas é a utilização de produtos biológicos à base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). Essa bactéria é capaz de produzir cristais protéicos (δ -endotoxinas) altamente tóxicos a vários gêneros de mosquitos (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*). Esse cristal é composto pelas toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba. Uma das proteínas mais estudadas nos cristais do Bti é a proteína Cyt1Aa, que possui massa molecular de 27 kDa (Waalwijk *et al.*, 1985).

A partir do descobrimento de proteínas de Bt com atividade tóxica elevada a diferentes insetos, o aumento do uso desta bactéria e de suas proteínas inseticidas tornou-se freqüente nos programas de combate ao *A. aegypti*. Além disso, a expressão das proteínas Cry isoladas permite estudar sinergismos e antagonismos entre elas. Desse modo, os objetivos do trabalho foram caracterizar um gene *cyt* de uma estirpe de *B. thuringiensis* codificando uma proteína com alta toxicidade para insetos da ordem Diptera e expressar esse gene utilizando os sistemas de expressão heteróloga e homóloga. Os sistemas de expressão basearam-se na construção de um baculovírus recombinante e de uma estirpe de *B. thuringiensis* transformada expressando a proteína Cyt1Aa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - *Aedes aegypti*

2.1.1 - Aspectos gerais

O *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 acompanhou o homem em sua longa migração pelo mundo e permaneceu onde as alterações antrópicas proporcionaram a sua proliferação. Evidências faunísticas do *A. aegypti* na África indicam que a espécie surgiu nesse continente, na região da Etiópia, tendo sido introduzido nas Américas pelas expedições colonizadoras dos europeus. O mosquito foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (Consoli & Oliveira, 1994).

Atualmente, é considerado um mosquito cosmopolita, com ampla distribuição geográfica, predominante nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 45° ao Norte e 40° ao Sul (Forattini, 2002). Embora o *A. aegypti* possa ser encontrado longe de aglomerados humanos, em nosso país está restrito às vilas e cidades, sempre próximo ao peridomicílio e ao domicílio humano. Nas cidades brasileiras é encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres ou onde a população humana é mais restrita (Consoli & Oliveira, 1994).

No Brasil, o *A. aegypti* é um importante vetor em saúde pública devido ao seu papel como transmissor dos quatro sorotipos do vírus do dengue e da febre amarela (Halstead, 1993; Franco, 1969). A febre amarela e a dengue são causadas por *Flavivirus* (família Flaviviridae), que são arboviroses. A transmissão dessas doenças ao homem ocorre através da picada da fêmea de *A. aegypti* infectada com o vírus. Após 8 a 12 dias da infecção ocorrem a incubação, a replicação e a disseminação do vírus por todo o corpo do mosquito. A fêmea pode passar por ciclos de reprodução durante o período de incubação e replicação do vírus, dando a ele a oportunidade de entrar no ovo e de ser passado para a prole pela transmissão vertical (Monath, 1994).

O *A. aegypti* encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis à sua rápida propagação como, por exemplo, a crescente urbanização, as deficiências no fornecimento, tratamento e armazenamento de água e o uso intensivo de materiais descartáveis. Uma das conseqüências dessa situação tem sido o aumento do número de

criadouros potenciais para o mosquito vetor (Guzman & Kouri, 1996; Tauil, 2002) e o aparecimento de epidemias (Lozovei, 2001). Além de representar uma ameaça na transmissão de doenças, a presença de grandes populações de mosquitos causa incômodos, prejuízos ao turismo e limitações ao trabalho e ao lazer.

2.1.2 - Biologia do inseto

O *Aedes aegypti* é um díptero da família Culicidae, pertencente à subfamília Culicinae, que na sua forma adulta apresenta coloração preta, com listras e manchas brancas, embora possa apresentar diversas tonalidades desde o marrom claro, dependendo da região em que esteja inserido (Forattini, 2002). O ciclo de desenvolvimento do *A. aegypti*, compreende quatro estádios: ovo, larva, com 4 estádios (L1, L2, L3 e L4, pupa e adulto) (Figura 1). O ciclo de ovo a adulto, geralmente se desenvolve em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 7 a 12 dias em função da temperatura (Forattini, 2002).

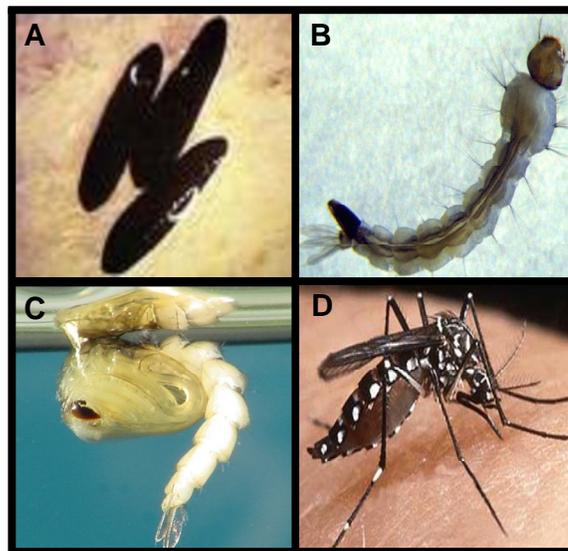


Figura 1. Estádios de desenvolvimento do *A. aegypti*. A) Ovos; B) Larvas de quarto instar; C) Pupa; D) Adulto.

Os ovos de *A. aegypti* podem sobreviver por vários meses em locais secos. Esta capacidade deve-se ao fenômeno de diapausa que é caracterizado pela suspensão de função e desenvolvimento desses ovos (Forattini, 2002). Os ovos após desenvolvimento embrionário completo, quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento larval (Forattini, 2002). O crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro (Beserra *et al.* 2006). Normalmente, as larvas desenvolvem-se em água limpa (não turva, pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais) e acumulada em locais sombreados ou em recipientes de paredes escuras (Consoli & Oliveira, 1994). Silva e colaboradores (1999) demonstraram que o *A.aegypti* também se desenvolve em água poluída. Nesse caso, a oviposição é feita nas paredes dos recipientes, imediatamente acima da superfície da água. O estágio pupal, não se alimenta e, à semelhança do larval, também é aquático e tem duração de dois dias, aproximadamente, correspondendo ao período de transição para a fase adulta, que é terrestre e tem como função a reprodução e dispersão (Forattini, 2002).

As fêmeas desse mosquito restringem seus hábitos hematófagos aos horários diurnos (Consoli & Oliveira, 1994). Seus picos de maior atividade acham-se, geralmente, situados no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, porém ataca o homem e animais domésticos a qualquer hora do dia (Consoli & Oliveira, 1994). O hábito diurno também é demonstrado pelos machos, que seguem as fêmeas em seus abrigos domiciliares para efetuarem a cópula e obter substâncias açucaradas.

Com atividade hematofágica diurna, o *A. aegypti* tem preferência por sangue humano e utiliza-se, preferencialmente de depósitos artificiais para colocar seus ovos (Tauil, 2002). Os criadouros artificiais, por sua vez, podem ser tanto aqueles abandonados pelo homem a céu aberto quanto os de uso doméstico para armazenamento de água.

2.1.3 - Controle biológico

Em razão dos problemas e ameaças que representam para a sociedade, as populações de mosquitos devem ser monitoradas, e com frequência é necessária a utilização de medidas de controle dessas populações nos ambientes urbano e rural.

No Brasil, o larvicida mais utilizado para o controle do *A. aegypti* é o produto químico Temefós. Entretanto, a utilização contínua deste organofosforado tem selecionado populações de mosquitos resistentes (Marcoris *et al.*, 1999). Desse modo, aumenta-se o risco ambiental e o custo de controle, pois se torna necessário um número maior de aplicações do produto para que haja um controle satisfatório. A partir disso, o Ministério da Saúde tem buscado novas alternativas que substituam a utilização de produtos químicos por produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (Vilarinhos & Monnerat, 2004). Essa bactéria não polui o meio ambiente e é capaz de produzir inclusões protéicas (δ -endotoxinas) altamente tóxicas a vários gêneros de mosquitos (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*), que são vetores de doenças humanas (Butko, 2003).

Atualmente, o Bti é comercializado em larga escala para o controle de mosquitos e borrachudos, e vários produtos eficientes estão disponíveis no mercado. O Bti foi usado em campanhas intensivas de controle realizadas nos EUA e Alemanha para o controle de pernilongos, e na África para o combate de simulídeos, que são vetores da Oncocercose (Glare & O'Callaghan, 2000).

2.2 - *Bacillus thuringiensis*

2.2.1 - Aspectos gerais das proteínas Cyt

Em contraste com as proteínas Cry, que são muito mais específicas contra as ordens Lepidoptera e Coleoptera, as proteínas Cyt são tóxicas para larvas de insetos da ordem Diptera (Butko, 2003). Essas proteínas não possuem homologia em sua sequência de aminoácidos com os membros da família das proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998).

O *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) é altamente tóxico a vários gêneros de mosquitos (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*) que são vetores de doenças humanas (Marglith & Ben-Dov, 2000). O cristal dessa bactéria é composto pelas toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba e os genes responsáveis pela produção dessas proteínas estão localizados em um grande plasmídeo de 128 kDa denominado “pBtoxis” (Berry *et al.*, 2002). Além disso, o plasmídeo contém sequências de genes responsáveis por codificarem duas importantes proteínas (P19 e P20), que podem

auxiliar a formação do cristal protéico devido à sua função de chaperonas (Wu & Federeci, 1993; Manasherob *et al.*, 2001).

Uma das proteínas mais estudadas dos polipeptídios encontrados nos cristais de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* é a proteína Cyt1Aa1 de 27 kDa, conhecida antigamente como CytA (Waalwijk *et al.*, 1985). A proteína Cyt1Aa foi a primeira toxina citolítica a ser isolada e caracterizada (Bourgouin *et al.*, 1986). Apesar do espectro de atividade da Cyt1A *in vivo* ser restrito, *in vitro* a proteína exibe uma atividade citolítica para uma variedade de células de insetos e mamíferos, incluindo eritrócitos, linfócitos e fibroblastos (Knowles & Ellar, 1987; Thomas & Ellar, 1983a).

Outras proteínas citolíticas foram sendo descobertas em diferentes estirpes de *B. thuringiensis*, onde algumas proteínas estavam relacionadas à Cyt1Aa, enquanto outras foram classificadas em grupos diferentes devido às suas diferentes propriedades e homologias de seqüência de aminoácidos (Guerchicoff *et al.*, 2001). A partir disso, algumas proteínas Cyt2, que são tóxicas para várias larvas de mosquitos, foram identificadas e caracterizadas: Cyt2Aa do *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* e *kyushuensis* (Promdonkoy *et al.*, 2003; Promdonkoy & Ellar, 2003), Cyt2Ba, Cyt2Bb e Cyt2Bc do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Guerchicoff *et al.*, 1997), *jegathesan* (Cheong & Gill, 1997) e *medellín* (Juarez-Perez *et al.*, 2002), respectivamente. A presença dos genes *cyt2* em várias subespécies de *B. thuringiensis* foi correlacionada com a atividade dessas estirpes contra dípteros (Guerchicoff *et al.*, 2001).

2.2.2 - Estrutura tridimensional das proteínas Cyt

A primeira tentativa de propor um modelo para a estrutura tridimensional das proteínas Cyt1A foi realizada por Ward e colaboradores em 1988. Apesar desse trabalho não conseguir propor um modelo, os autores identificaram algumas características da estrutura da toxina, como a presença de duas α -hélices antiparalelas e abundância de folhas- β . O modelo da estrutura da proteína Cyt1A (Butko, 2003) (Figura 2) foi sugerido a partir do modelo da proteína Cyt2Aa1, que foi proposto, através técnicas de cristalografia de raios-X, por Li e colaboradores em 1996.

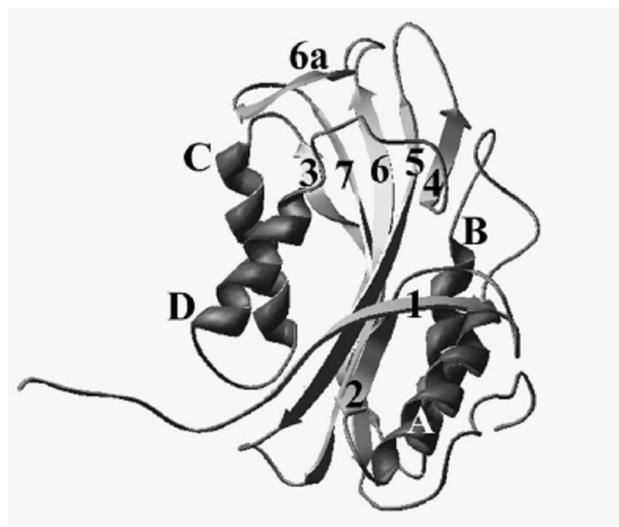


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da toxina Cyt1Aa (Butko, 2003). A proteína Cyt1Aa consiste de um único domínio α - β constituído de quatro α -hélices que flanqueiam um conjunto de folhas- β . Acredita-se que as folhas- β inserem-se na membrana plasmática, promovendo a formação do poro.

A proteína Cyt1A consiste de um único domínio α - β constituído de quatro α -hélices que flanqueiam um conjunto de folhas- β (Li *et al.*, 1996; Butko, 2003). Quando as seqüências de aminoácidos de seis proteínas Cyt de diferentes subespécies de *B. thuringiensis* são comparadas, quatro regiões apresentam alta similaridade (Butko, 2003). Mutações induzidas em algumas dessas regiões indicam que elas possuem importante papel na toxicidade das proteínas e na ligação destas aos lipídios (Ward *et al.*, 1988).

2.2.3 - Modo de ação das proteínas Cyt

As toxinas Cyt são sintetizadas como protoxinas e pequenas porções da porção N-terminal e C-terminal são removidas para a ativação da toxina (Li *et al.*, 1996). A toxicidade da Cyt1Aa é devida à sua solubilização alcalina e processamento proteolítico nas porções C-terminal e N-terminal, convertendo a protoxina de 27 kDa em uma toxina ativa de 22-25 kDa (Al-yahyaee & Ellar, 1995). No caso da Cyt2Aa, 32 resíduos de aminoácidos são removidos pela proteinase K produzindo uma proteína monomérica com atividade citolítica (Koni & Ellar, 1994).

Em 1983, Thomas & Ellar demonstraram que as proteínas Cyt perdiam sua atividade quando incubadas com lipídios. Além disso, foi demonstrado que as toxinas se ligavam aos lipídios devido à presença de grupos polares e de cadeias de ácidos graxos insaturados dessas moléculas. Desse modo, em contraste às proteínas Cry, que se ligam a receptores específicos presentes nas microvilosidades intestinais, as proteínas Cyt interagem diretamente com os lipídios presentes nas membranas celulares. Ao se ligar aos lipídios, essas proteínas podem se inserir na membrana e formar poros, provocando disfunção osmótica (Li *et al.*, 1996; Promdonkoy & Ellar, 2003) ou destruir a membrana a partir de uma ação parecida com a dos detergentes (Butko, 2003) (Figura 3).

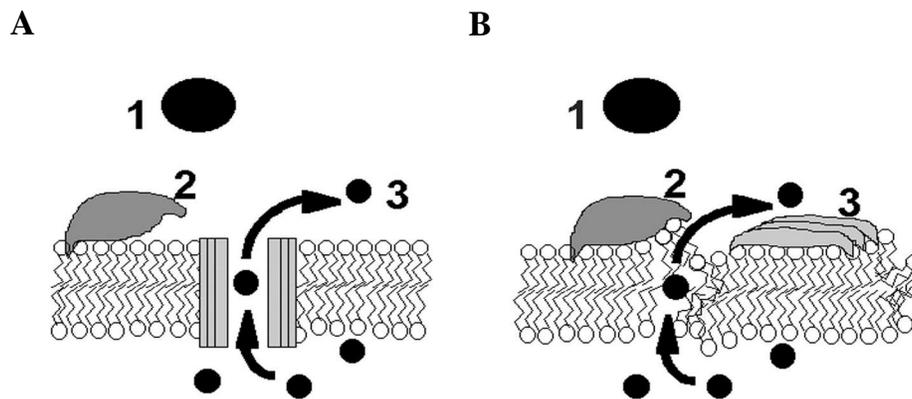


Figura 3. Representação esquemática das hipóteses do modo de ação das proteínas Cyt1A. A) Modelo de formação dos poros. 1) Solubilização da proteína. 2) Ligação e inserção da proteína na membrana plasmática. 3) Formação do poro e disfunção osmótica. B) Modelo do funcionamento da proteína como detergente.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

No caso da hipótese de formação do poro, as proteínas Cyt provocam a formação de canais de cátions. Consequentemente, o desequilíbrio de cátions entre a membrana e o meio extracelular provoca a entrada de água (por osmose) na membrana ocasionando a ruptura da célula. Acredita-se que os poros são formados pela inserção da porção N-terminal da toxina na membrana plasmática (Gazit & Shai, 1993), e que as estruturas formadas pelas folhas- β da toxina são responsáveis pela sua inserção e formação do poro (Li *et al.*, 1996). Desse modo, ocorre a inserção da proteína na

membrana com formação de poros definidos. Entretanto, os poros formados não desorganizam os lipídios da membrana plasmática (Butko, 2003).

No caso do outro modelo, as proteínas Cyt se ligam aos lipídios da membrana plasmática formando uma espécie de agregado (Butko, 2003). A formação do agregado toxina-lipídio provoca o rompimento da membrana plasmática e conseqüentemente, a morte celular. Assim sendo, ocorre uma desordem na organização dos lipídios e uma ruptura da membrana plasmática (Butko, 2003).

2.2.4) Sinergismo das proteínas Cyt com as proteínas Cry

As proteínas Cyt podem aumentar a atividade de outras toxinas, agindo de forma sinérgica com outras toxinas e funcionando como receptores para outras proteínas Cry (Pérez *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2007) (Figura 4). Desse modo, o Bti torna-se uma alternativa natural e eficiente de combate ao surgimento de populações resistentes às proteínas Cry, pois pode ser considerada uma bactéria que carrega consigo suas toxinas e seus receptores ativos (Bravo & Soberón, 2008).

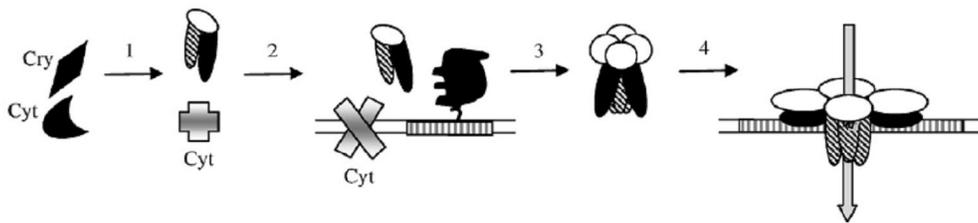


Figura 4. Interação das toxinas Cyt e Cry em larvas de dípteros. (1) Solubilização e ativação das proteínas. (2) Inserção das toxinas Cyt na membrana e ligação das proteínas Cry aos receptores (ALP ou toxinas Cyt). (3) Indução da oligomerização das proteínas Cry. (4) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (Bravo *et al.*, 2007).

Atualmente, nenhuma população de mosquito encontrada no campo adquiriu resistência aos produtos à base de Bti, que é a subespécie utilizada como referência para dípteros (Bravo & Soberón, 2008). Isso deve acontecer devido à presença da proteína Cyt no cristal protéico produzido por essa estirpe (Georghiou & Wirth, 1997). Desse modo, populações de *Culex quinquefasciatus*, selecionadas em laboratório,

apresentaram resistência às proteínas Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa, porém nenhuma resistência foi adquirida quando estas proteínas foram testadas juntamente com a proteína Cyt1Aa (Wirth *et al.*, 1997). Além disso, as toxinas do Bti, quando testadas separadamente, apresentam baixa toxicidade, no entanto quando estas são testadas juntamente com as proteínas Cyt, apresentam alta atividade. O sinergismo entre as proteínas Cry e as proteínas Cyt também tem sido observado em outros trabalhos (Georghiou & Wirth, 1997; Wirth *et al.*, 2000)

Em 2005, Pérez e colaboradores demonstraram haver sinergismo da proteína Cry11Aa com a proteína Cyt1Aa. A ligação e a toxicidade da proteína Cry11Aa aumentavam com a presença da proteína Cyt1Aa. Além disso, foram identificadas as regiões específicas para a ligação dessas duas proteínas. Posteriormente, comprovou-se que a ligação das duas toxinas auxiliava na oligomerização e na formação do poro da proteína Cry11Aa (Pérez *et al.*, 2007).

A positiva correlação existente entre a produção de proteínas Cyt pelas estirpes com alta atividade contra mosquitos é um ponto muito importante a ser discutido e estudado com o objetivo de descobrir o papel dessas proteínas na ação tóxica dos cristais. Desse modo, a clonagem de genes *cyt* e a expressão dessas proteínas tornam-se instrumentos necessários deste estudo.

2.2.5 - Expressão homóloga e heteróloga de proteínas de Bt

Diferentes sistemas de expressão são utilizados para o isolamento de proteínas Cry recombinantes com o objetivo de se estudar separadamente a atividade de cada uma. Os diferentes sistemas de expressão possuem vantagens e desvantagens que estão associadas a diversos fatores como custo de manutenção, quantidade de proteínas produzidas, modo de purificação das proteínas, entre outros.

Os sistemas procarióticos apresentam como principal vantagem, a relativa facilidade de manutenção de culturas bacterianas além da grande quantidade de proteína recombinante que pode ser produzida em pouco tempo. Assim, a expressão em *B. thuringiensis* apresenta diversas vantagens: expressão homóloga de proteínas Cry, facilidade de cultivo em larga escala e capacidade de formação de cristais, facilitando os processos de purificação da proteína expressa. Diversas proteínas Cry e Cyt já foram expressas neste sistema. Dentre elas encontram-se as proteínas Cyt1Ab (Thiery *et al.*,

1997), Cyt2Bb (Cheong & Gill, 1997), Cyt2Aa (Koni & Ellar, 1993), Cry2A e Cry11A (Ge *et al.*, 1998), Cry2Ab (Dankocsik *et al.*, 1990), entre outros.

Atualmente, o sistema de expressão heteróloga de proteínas tem sido empregado extensivamente. Dentre eles destacam-se a expressão de proteínas em células de insetos, em células de mamíferos, em fungos, entre outros. Os baculovírus, além de seu potencial de aplicação como agentes de controle de pragas agrícolas, são utilizados como vetores de expressão gênica com a finalidade de produzir grandes quantidades de proteínas eucarióticas e procarióticas em células de insetos (Luckow & Summer, 1988). A maioria desses estudos utilizam o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) devido à sua fácil propagação em cultura de células e a seu amplo espectro de hospedeiros.

A utilização de baculovírus como vetor de expressão apresenta várias vantagens: potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis; diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares; capacidade para clonagem de grandes inserções; eficiência na expressão de genes contínuos (sem íntrons) e cDNAs; simplicidade de manipulação. Outra vantagem desse sistema de expressão é que os baculovírus não são infecciosos a vertebrados, portanto são considerados suficientemente seguros para manipulação e produção industrial de proteínas para aplicações biotecnológicas.

O sistema de expressão de baculovírus baseia-se na introdução de genes de outros organismos no genoma de um baculovírus. Os genes são inseridos no lugar de um gene não-essencial para replicação, sob o comando de um promotor forte. Esses promotores são derivados dos genes da poliedrina e da P10, que estão envolvidos na formação do corpo de oclusão na fase final da infecção. As proteínas recombinantes quando expressas no sistema de expressão de baculovírus e células de insetos, sob o comando desses promotores são, normalmente, expressas em grande quantidade e biologicamente similares às espécies nativas. Dessa forma, o modelo mais simples de vetores para o sistema de expressão em baculovírus foi 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). Além do gene da poliedrina, outros genes podem ser substituídos para a expressão heteróloga de proteínas. Nesse caso, o gene *p10* é substituído, pois esse gene codifica a proteína P10 que não constitui um elemento essencial para a replicação viral. Além disso, o promotor do gene *p10* também permite a

produção de altos níveis de proteína. Os níveis de expressão dos genes exógenos em células de inseto, usando o sistema de expressão em baculovírus, são variáveis. Alguns estudos relataram a obtenção de 1 a 600 mg de proteína/litro de cultura (Maiorela *et al.*, 1988; Luckow & Summers, 1988).

Um organismo candidato como doador de genes para incorporação destes no genoma de baculovírus é o *B. thuringiensis*, que produz proteínas Cry de ação entomopatogênicas. Estudos de expressão da protoxina Cry1A em baculovírus, em cultura de células de *S. frugiperda*, mostraram a ação tóxica deste baculovírus contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera (Martens *et al.*, 1995; Merryweather *et al.*, 1990). Além desses estudos, vários baculovírus recombinantes, expressando toxinas Cry, já foram descritos (Ribeiro & Crook, 1993; Ribeiro & Crook, 1998; Chang *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008).

Aguiar *et al.* (2006) demonstraram que a proteína Cry1Ca truncada, expressa em baculovírus, possui alta atividade para lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. O trabalho realizado por Lima e colaboradores (2008), também, demonstrou toxicidade das proteínas de Bt a essas espécies de lagartas. Nesse caso, as proteínas expressas foram Cry2Aa e Cry2Ab. Martins *et al.* (2008) demonstraram a expressão da proteína Cry1Ia utilizando o baculovírus como vetor de expressão. Essa proteína apresentou toxicidade contra *Anthonomus grandis* e *S. frugiperda*.

2.3 - Baculovírus

2.3.1 - Histórico e características gerais

Os baculovírus têm sido utilizados como agentes de grande potencial para uso em controle biológico por mais de meio século. Esses vírus são considerados excelentes candidatos por apresentar alta especificidade, infectando uma única espécie de inseto ou algumas poucas espécies de um mesmo gênero.

O conhecimento da biologia e da aplicação dos baculovírus progrediu rapidamente desde a década de 1970. A partir de 1990, o avanço e a utilização da biologia molecular com a utilização de técnicas de engenharia genética, ampliaram a quantidade de hospedeiros e diminuíram o tempo de morte dos insetos, constituindo,

assim, uma nova era no desenvolvimento de inseticidas mais eficazes à base de baculovírus recombinantes.

Os baculovírus constituem o maior grupo de vírus que atacam insetos e a maioria destes tem sido isolada, predominantemente, a partir da ordem Lepidoptera (Federici, 1997). Entretanto, os baculovírus podem infectar insetos de outras ordens, tais como, Hymenoptera (vespas), Diptera (moscas e mosquitos) e Coleoptera (besouros). Além disso, alguns vírus morfologicamente classificados como baculovírus foram encontrados nas ordens Tricoptera, Tisanura e Homoptera, podendo ocorrer em crustáceos e aracnídeos (Federici, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998).

Vários baculovírus têm sido utilizados e comercializados para o controle de diversas pragas: *Lymantria dispar* (LdMNPV), *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (ambos por HzSNPV) nos Estados Unidos; *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) e *Cydia pomonella* (CpGV) na Europa e pragas de florestas tais como *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV), *Choristoneura fumiferana* e *Neodiprion sertifer* (NeseNPV) em vários países, incluindo Canadá, EUA e Reino Unido (Moscardi, 1998). No Brasil, destaca-se o uso do *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Moscardi, 1999).

O vírus consiste de um ácido nucléico circundado por um complexo protéico denominado capsídeo. O conjunto de ácido nucléico e capsídeo formam o nucleocapsídeo. O genoma dos baculovírus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80-200 Kb (Arif, 1986), podendo codificar de 100 a 200 proteínas (Smith & Summers, 1978). Esses vírus são formados por nucleocapsídeos em forma de bastonete de 30-35 nm de diâmetro e 250-300 nm de comprimento e envoltos por um envelope composto por uma bicamada lipídica, formando uma estrutura denominada de vírions. Os vírions são protegidos por uma matriz protéica chamada de corpo de oclusão, formando os poliedros ou grânulos, dependendo do gênero, e que possuem como principal proteína a poliedrina ou a granulina, respectivamente. Dois gêneros são conhecidos: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV).

2.3.2 - Replicação viral

Os baculovírus utilizam a maquinaria celular dos insetos para se multiplicar. Os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas durante a replicação viral: os “budded virus” (BV) ou “extracelular virus” (ECV), que brotam da membrana

citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular de forma polarizada, sendo envelopados individualmente e os “polyhedra-derived virus” (PDV), ou ainda chamados de “occlusion derived vírus” (ODV), que adquirem a nova membrana sintetizada no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrado mais de um nucleocapsídeo por vírion e são oclusos em cristais protéicos denominados corpos de oclusão (“occlusion bodies” – OB) (Granados & Williams, 1986). Embora os genótipos das duas estruturas sejam idênticos, eles diferem quanto à morfologia, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira e infectividade (Castro *et al.*, 1997).

Nos PDVs ou ODVs, os vírions contém um único nucleocapsídeo (SNPV) ou vários nucleocapsídeos (MNPV). A forma oclusa, que é a mais utilizada para propagação horizontal da doença, é altamente estável no meio ambiente, permitindo persistência do vírus e subseqüentes infecções nas populações de insetos (Funk *et al.*, 1997). A capacidade de persistir fora do hospedeiro é uma das características marcantes dos NPVs e GVs. Essas partículas podem permanecer no solo, em fendas de plantas ou em outros refúgios por vários anos.

2.3.3 - Modo de ação

A infecção se inicia quando as lagartas se alimentam de folhas contaminadas com baculovírus. Os vírus, ao infectar o inseto, replicam em vários tecidos e podem interferir em componentes envolvidos em sua fisiologia como na alimentação, na ovoposição e na movimentação do inseto. No terceiro/quarto dia de infecção, as larvas param de se alimentar pela perda de apetite e no final do ciclo de infecção apresentam geotropismo negativo, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células da epiderme e do tecido adiposo, e morte por infecção sistêmica (Ribeiro *et al.*, 1998). Os NPVs e os GVs causam liquefação do inseto e fácil rompimento das cutículas liberando inúmeras partículas virais infecciosas no ambiente.

A principal rota de infecção dos baculovírus é por ingestão de alimentos contaminados com vírus na forma viral oclusa (OB). No ambiente alcalino do intestino médio da larva do inseto, os OBs são rapidamente dissolvidos, devido ao alto pH e à ação de proteases, e os ODVs são liberados, atravessam a membrana peritrófica dando início à infecção das células colunares do epitélio (Granados & Lawler, 1981; Ribeiro *et al.*, 1998; Federici, 1997). Os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo, onde seu DNA é liberado, no período de até uma hora após a infecção. Alternativamente, os vírus

oriundos da dissolução dos poliedros entram na célula epitelial e são transportados para a parte basolateral, onde infectam células do sistema traqueal e hemolinfa (Barrett *et al.*, 1998).

O vírus sofre uma primeira replicação, apresentando uma progênie de nucleocapsídeos em 8 h. Doze horas após a infecção, os nucleocapsídeos são produzidos no núcleo da célula e liberados para o citoplasma formando os BVs, que são produzidos por brotamento na membrana plasmática da célula infectada (Volkman & Keddie, 1990). Os vírus alcançam a hemolinfa dando origem à infecção sistêmica na larva hospedeira. Essas partículas são, portanto, responsáveis pela transmissão do vírus de célula para célula dentro do inseto, bem como usados para infecção de células de insetos em cultura (Engelhard *et al.*, 1994).

Em outra etapa, os nucleocapsídeos são envoltos no núcleo por uma membrana, recém sintetizada. Esse processo forma os novos corpos de oclusão que serão liberados, novamente, para o ambiente. Essas estruturas são altamente estáveis no meio ambiente, permitindo sua persistência e disseminação em populações de insetos susceptíveis no campo (Funk *et al.*, 1997). O modo de ação dos baculovírus é descrito resumidamente na figura 5.

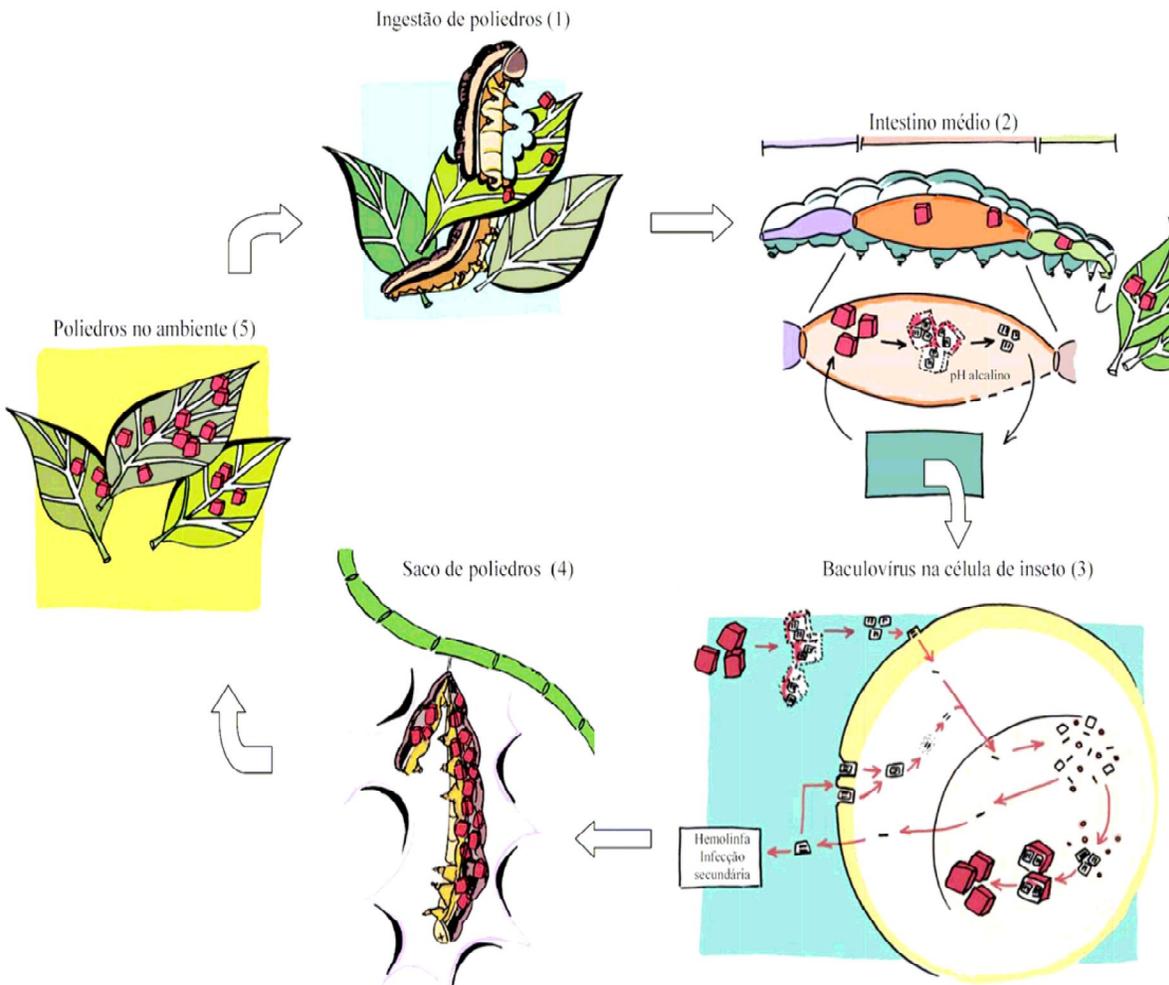


Figura 5. Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. (1) Ingestão dos poliedros pela larva do inseto. (2) Dissolução dos poliedros pelo alto pH e liberação das partículas virais. (3) Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (infecção primária) e, em seguida, infectar outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (infecção secundária). (4) A infecção se espalha, causando a morte da larva e a formação do “saco” de poliedros. (5) Liberação dos vírus no ambiente, tornando-se fonte de infecção para outras lagartas. (Barros, 2007).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi estudar uma proteína Cyt recombinante de *B. thuringiensis* utilizando sistemas de expressão distintos.

3.2 - Objetivos Específicos

- Isolar, clonar e sequenciar o gene *cyt1Aa* de *B. thuringiensis*;
- Expressar a proteína Cyt1Aa em células de insetos utilizando o baculovírus como vetor de expressão;
- Expressar a proteína Cyt1Aa em células de Bt utilizando uma linhagem acristalífera de *B. thuringiensis*;
- Comparar a expressão da proteína Cyt1Aa de *B. thuringiensis* nos sistemas de expressão heteróloga (baculovírus) e homóloga (Bt).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Células e vírus

Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) em cultura (Granados *et al.*, 1994) foram utilizadas para a construção do AcMNPV recombinante contendo o gene *cyt1Aa* (deste trabalho) e para a propagação do baculovírus selvagem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). As células foram mantidas a 27 °C em meio TC-100 (GIBCO-BRL) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen). As células de *Escherichia coli* DH5- α e DH10-Bac (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho.

4.2 - Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene *cyt1Aa*

As técnicas de clonagem molecular usadas foram as descritas por Sambrook *et al.* (2001) e todos os oligonucleotídeos usados no trabalho foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies – EUA). O gene *cyt1Aa* da estirpe S1806 pertencente ao Banco de *Bacillus* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Monnerat *et al.*, 2001) foi amplificado por uma reação de PCR. Para a reação foram utilizados 50 ng de DNA, purificado com o Kit de purificação de DNA Wizard®Plus SV Minipreps (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante, 2,5 μ L do tampão 10 X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,5 μ L da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mM), 1,0 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 μ M), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1,2 μ L de MgCl₂ (2mM), e água “milli-Q” para um volume final de 25 μ L. Os oligonucleotídeos utilizados foram os Cyt1Aa F e Cyt1Aa R (Tabela 1) e em suas seqüências foram adicionados sítios para a enzima *SalI*. O programa de PCR utilizado para a amplificação foi: 94 °C / 5 min seguido por 35 ciclos de 95 °C / 1 min e 30 s, 45 °C / 1 min e 30 s, 72 °C / 1 min e uma extensão final de 72 °C / 5 min.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *cyt1Aa*.

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' – 3')	Utilidade
Cyt1Aa F	ggtcgacatggaaaattta	PCR
Cyt1Aa R	gtcgacttaatgatgtgatgatggagggttc	PCR
Universal (SP6)	gtaaacgacggccagt	Seqüenciamento
Reverso (T7)	ggaaacagctatgaccatg	Seqüenciamento
M13 R	caggaaacagctatgac	Confirmação da posição do inserto no bacmídeo

O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 6) e amplificado em *E. coli* DH5- α (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Os clones positivos foram confirmados por análise de PCR utilizando os oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R e o programa descrito acima. O DNA do plasmídeo recombinante (denominado pGEMcyt1Aa) foi purificado utilizando o Kit de purificação de DNA Wizard®Plus SV Minipreps (Promega) e seqüenciado pela Plataforma de Seqüenciamento Automático da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em seqüenciador ABI 377 da Applied BioSystem com os oligonucleotídeos Universal (SP6) e Reverso (T7), que se anelam em regiões flanqueadoras do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega). Depois de confirmadas, as seqüências foram alinhadas e submetidas à análise por BLAST, disponível na página do National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

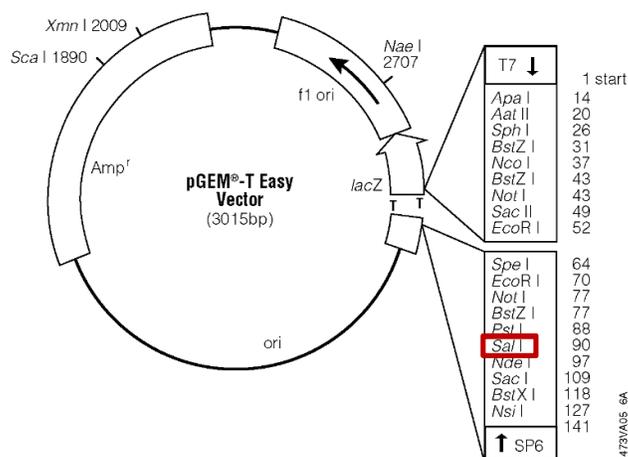


Figura 6. Mapa físico do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega). Sítio de multiclonagem à direita; em vermelho o sítio de restrição da enzima *SalI*, escolhido para a inserção do gene *cyt1Aa*.

4.3 - Construção do plasmídeo pFastcyt1Aa

O DNA do plasmídeo pGEMcyt1Aa (3.789 pb) foi digerido com a enzima de restrição *SalI* e o fragmento contendo o gene *cyt1Aa* foi separado do vetor de clonagem por eletroforese em gel de agarose 0,8%, seguindo instruções descritas em Sambrook *et al.* (2001). O fragmento contendo o gene *cyt1Aa* foi purificado do gel usando o kit GFX Kit (Amersham) e adicionado a uma reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e o plasmídeo pFastBacTM1 (Invitrogen) (Figura 7), previamente digerido com a enzima de restrição *SalI*.

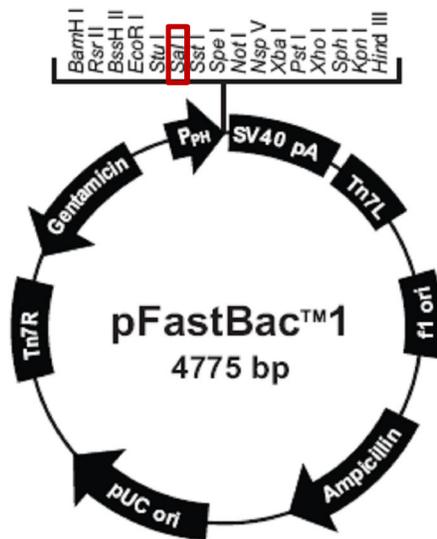


Figura 7. Mapa físico do plasmídeo pFastBacTM1 (Invitrogen). Sítio de multiclonagem localizado na parte superior da figura; em vermelho, sítio de restrição da enzima *SalI*, escolhido para a clonagem do gene *cyt1Aa*.

As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e aquelas que adquiriram resistência à ampicilina foram utilizadas na obtenção do plasmídeo pFastcyt1Aa. O plasmídeo pFastBacTM1 é um vetor que permite que o inserto de interesse seja posteriormente transferido para o genoma de um baculovírus presente na forma plasmidial (bacmídeo) dentro de uma *E. coli* (DH10-Bac, Invitrogen) por um mecanismo de transposição. Os genes de interesse são inseridos em um dos sítios presentes na região de multiclonagem e devem estar posicionados entre os sítios de transposição, logo após o promotor do gene da poliedrina.

A clonagem pôde ser confirmada por reações de PCR e digestão com a enzima de restrição *Sa*II. Além disso, foi realizada a digestão com outra enzima de restrição, a *Bgl*II com o objetivo de verificar a orientação do inserto no vetor de transferência. Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R (Tabela 1), o programa e a quantidade de reagentes como descrito acima. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%.

4.4 - Purificação do vírus recombinante vFastCyt1Aa

Na construção do bacmídeo recombinante de interesse foi utilizada uma linhagem de bactéria *E. coli* denominada DH10-Bac, que possui dentre as suas características especiais o genoma completo de um baculovírus (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) na forma de um plasmídeo. O bacmídeo contém um sítio de inserção de um transposon no locus da poliedrina e ainda um plasmídeo ajudante ("helper"), que codifica transposases responsáveis pelo evento de transposição entre o plasmídeo doador (pFastBacTM1 com o inserto) e o genoma do baculovírus inserido no bacmídeo.

O plasmídeo pFastcyt1Aa foi utilizado na transformação de bactérias DH10-Bac seguindo a orientação do fabricante (Invitrogen). As colônias de *E. coli* DH10-Bac nas quais ocorreu o processo de transposição (Figura 8) foram selecionadas pela observação de resistência à tetraciclina, kanamicina (genes de resistência presentes em todas as bactérias DH10-Bac) e gentamicina (gene de resistência presente apenas nas bactérias na qual o evento de transposição obteve sucesso) e, além disso, foram identificadas pela cor branca mesmo na presença do substrato X-gal e indutor IPTG. A ausência de cor (cor branca) ocorre apenas se o gene da enzima β -galactosidase, presente no bacmídeo, for interrompido pelo evento de transposição. Caso isso não ocorra, o gene estando íntegro permitirá que essa enzima seja produzida e atue sobre o seu substrato (X-gal) provocando a produção da cor azul. Essas colônias foram amplificadas em larga escala e seu material genético foi extraído seguindo orientações do fabricante (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). A confirmação de transposição foi realizada por reações de PCR. Para uma das reações, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene (como relatado anteriormente), enquanto para a outra reação foi utilizado um oligonucleotídeo específico para o gene (cyt1Aa F) e outro específico para uma região flaqueadora, presente no genoma viral (M13 R).

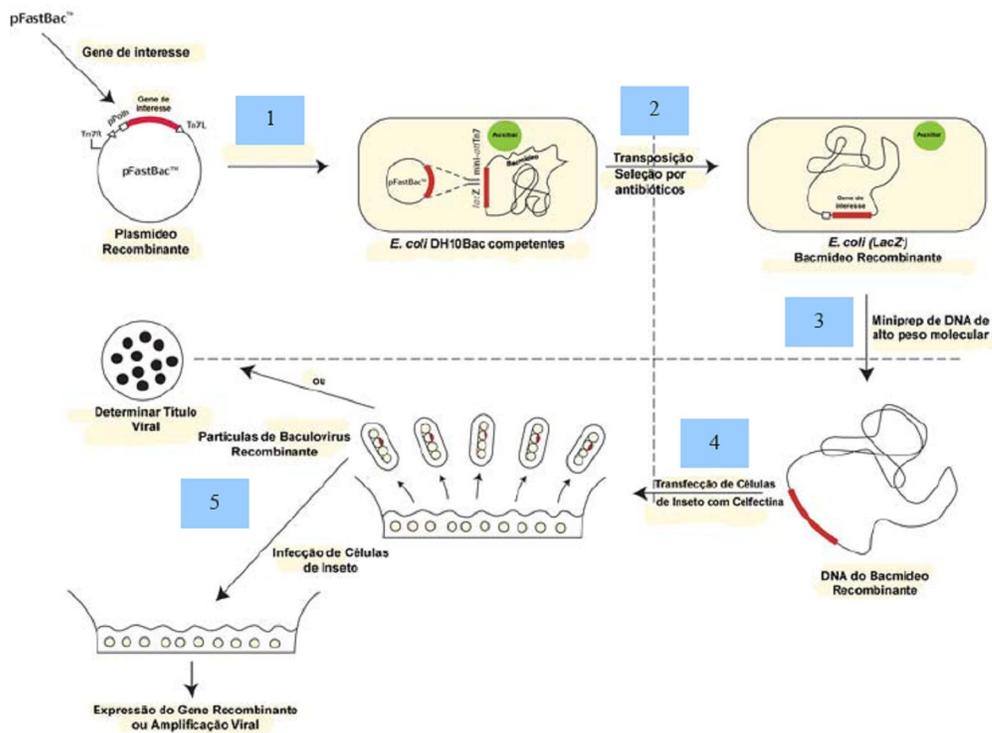


Figura 8. Esquema de construção de baculovírus recombinantes via transposição (sistema Bac-to-Bac, Invitrogen). A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac com o inserto de interesse em vermelho (1). Logo a seguir é mostrado o evento de transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização deste na transfecção de células de inseto (4). Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen).

A construção do vírus recombinante vFastCyt1Aa foi feita da seguinte maneira: cerca de $0,5 \times 10^6$ células de *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4 ou TN5B) foram transferidas para uma placa de poliestireno de 35 mm de diâmetro (TPP) por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. Um micrograma (μg) de DNA total das bactérias contendo os bacmídeos recombinantes foi diluído em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm de diâmetro. Em outra placa, 10 μL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen) (lipossomo) foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura

de DNA/lipossomos sem que isso perturbe a monocamada formada e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 h.

Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 27 °C, por sete dias. A grande vantagem da utilização desse sistema é que o mecanismo de transposição não necessita de uma série de purificações que seriam fundamentais para o isolamento do vírus recombinante quando da utilização do mecanismo de recombinação homóloga. Como o DNA do bacmídeo é infectivo e não ocorre a produção de vírus selvagem, uma vez que só o recombinante é selecionado previamente, ocorre a replicação do vírus recombinante em células de inseto em cultura e a produção de suas proteínas, inclusive dos insertos de interesse.

Em seguida, o DNA do vírus foi extraído e utilizado na reação de PCR para confirmação da presença do gene no genoma viral. A purificação do DNA viral foi realizada de acordo com O'Reilly *et al.* (1992). O sobrenadante da cultura de células (1,5 mL) foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso cuidadosamente em 100 µL de tampão de lise (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 10mM EDTA; 0,25% SDS). Em seguida, foi adicionada proteinase K na concentração final de 500 µg/mL e a reação incubada a 37 °C durante 16 h sob leve agitação. Na etapa seguinte, foi adicionado 500 µL a 1 mL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi centrifugada a 12.000 x g por 5 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um tubo de polietileno novo. Em seguida, adicionou-se 2,5X o volume recuperado da fase aquosa de etanol absoluto e 5 µL de acetato de potássio 3M. A reação foi incubada durante duas horas a - 20 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Ao sedimento, adicionou-se 500 µL de etanol 70% (v/v) e a solução foi centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos. Esse procedimento foi repetido duas vezes. O material foi seco a temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol e ressuspenso em 30 – 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0). Para a reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) para o gene como descrito anteriormente.

4.5 - Construção do plasmídeo pSVPcyt1Aa

O DNA do plasmídeo pGEMcyt1Aa (3789 pb) foi digerido com a enzima de restrição *SalI* e o fragmento contendo o gene *cyt1Aa* foi separado do vetor de clonagem por eletroforese em gel de agarose 0,8%, seguindo instruções descritas em Sambrook *et al.* (2001). O fragmento contendo o gene *cyt1Aa* foi purificado do gel usando o kit GFX Kit (Amersham) e adicionado a uma reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e o plasmídeo pSVP27A (gentilmente cedido pelo professor David Ellar da Universidade de Cambridge, Inglaterra) (Crickmore & Ellar, 1992), previamente digerido com a enzima de restrição *SalI*. O mapa deste plasmídeo é demonstrado na figura 9.

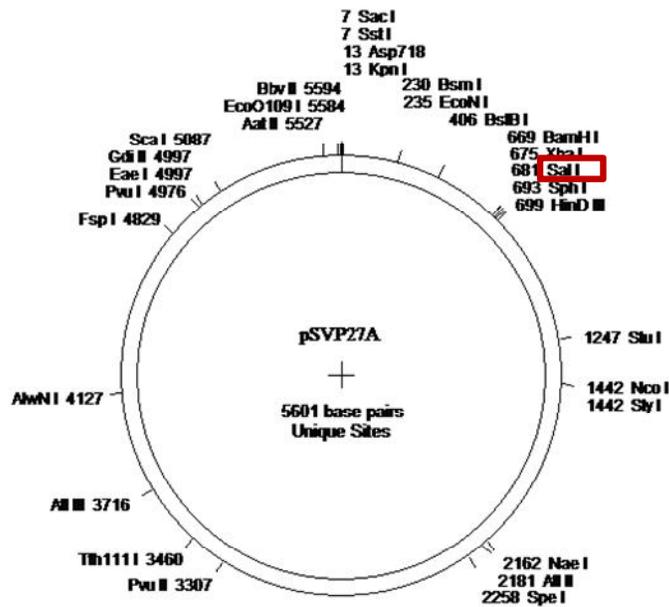


Figura 9. Mapa físico do plasmídeo pSVP27A. Sítio de multiclonagem localizado na parte superior da figura; em vermelho, sítio de restrição da enzima *SalI*, escolhido para a clonagem do gene *cyt1Aa*.

As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e aquelas que adquiriram resistência à ampicilina foram utilizadas na obtenção do plasmídeo pSVPcyt1Aa. O plasmídeo pSVP27A é um vetor binário que permite que o inserto de interesse seja expresso em linhagens de *B. thuringiensis*

acristalífera (IPS78/11) (Ward & Ellar, 1983). Essa linhagem de Bt, doada gentilmente pelo professor David Ellar da Universidade de Cambridge - Inglaterra, não produz nenhum tipo de cristal, por isto, é utilizada para a clonagem de genes *cry* e *cyt*.

A clonagem foi confirmada por reação de PCR e digestão com a enzima de restrição *SaII*. Uma outra digestão foi realizada usando a enzima de restrição *BgIII* com o objetivo de verificar a orientação do inserto no vetor de expressão. Para o PCR foram utilizados os oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R (Tabela 1), as condições de PCR foram as mesmas descritas no procedimento de clonagem no vetor pGEM® - T easy. Os produtos da reação de PCR e da digestão foram analisados em gel de agarose a 0,8%.

4.6 - Transformação do Bt acristalífero

Um micrograma do plasmídeo pSVPcyt1Aa foi usado para transformação do *B. thuringiensis* acristalífero IPS78/11 (Ward & Ellar, 1983) por eletroporação (1,8 kV, 400Ω e 25μF). Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas a 30 °C (± 2 °C) por uma hora com agitação constante de 180 rpm (Lab Line® modelo 3526). Em seguida, as bactérias foram recuperadas por centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos e plaqueadas em meio seletivo (10 μg/mL cloranfenicol). A presença do gene *cyt1Aa* foi confirmada por PCR usando os oligonucleotídeos descritos na tabela 1.

4.7 - Análises da expressão da proteína Cyt1Aa

A estirpe recombinante Bt Cyt1Aa contendo o gene *cyt1Aa* foi crescida por 72 h em meio de esporulação [8 g/L de Caldo nutriente; 0,25 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1 g/L de KCl; 0,002 g/L de MnCl₂.4H₂O; 0,0732 g/L de Fe₂(SO₄).7H₂O; 0,0056 % de H₂SO₄ (v/v); 0,098 g/L de CaCl₂] (Lereclus *et al.*, 1995) suplementado com cloranfenicol (10μg/mL) sob rotação de 200 rpm (Lab Line® modelo 3526) a 30 °C (± 2 °C) até completa esporulação.

A extração de proteínas foi realizada a partir do protocolo adaptado de Lecadett *et al.* (1991). A cultura de bactéria crescida (1,5 mL) foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Logo em seguida, descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento foi realizado três vezes com o objetivo de aumentar a quantidade de proteínas. Ao sedimento, obtido das três centrifugações, adicionou-se 1,5 mL de NaCl a 5M. O

material foi ressuspense e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material restante seco à temperatura ambiente. Em seguida, ressuspenseu-se o sedimento em 1,5 mL de solução de extração (1mM de PMSF, 10 mM de EGTA e 100 mM de EDTA). O material foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se esse procedimento mais uma vez. Após a segunda centrifugação e o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspense em 500 µL de solução de extração de proteínas. A amostra foi estocada a – 20 °C até sua utilização.

Em uma alíquota de 10 µL das proteínas extraídas foi adicionado 10 µL de tampão de amostra de proteína com 5% de β-mercaptoetanol e esse material foi incubado a 95 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliácridamida (SDS-PAGE) a 12% na cuba Mini Trans Blot® Cells (BioRad), conforme Laemmli (1970). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e Coomassie blue 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação. O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL - Life Technologies), para o experimento de imunodeteção de proteínas (“Western-blot”) descrito abaixo.

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se os aparatos de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris Base; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). A membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado adicionado de azida sódica (para evitar contaminação) por 16 horas a 4 °C, sendo em seguida processada para a imuno-marcação. O primeiro passo foi lavar a membrana por 3 vezes com PBS Tween (0,05 %) para retirar toda a solução de bloqueio e em seguida colocar a membrana em uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % adicionada do anticorpo primário policlonal anti-His (Rabbit anti-His – Invitrogen) por 1 hora. Essa solução foi descartada e a membrana foi lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A seguir, a membrana foi colocada em uma solução de PBS/BSA 0,5 % contendo o anti-IgG de coelho (anticorpos que reconhecem IgGs de coelho) conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais uma 1 hora sob agitação suave. Esta solução então foi retirada e a membrana foi lavada novamente com PBS Tween (0,05%) por 3 vezes e com o tampão da enzima fosfatase

alcalina por 5 minutos sob leve agitação. Logo em seguida, a solução reveladora foi adicionada. O revelador trata-se de uma solução de NBT/BCIP (Roche) que é o substrato para a ação da fosfatase alcalina. Essa enzima, que está conjugada ao anticorpo secundário, promove a metabolização desse substrato em uma cor azul arroxeadada que se destaca na membrana. A reação precisa ser interrompida com sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorra marcação inespecífica ou dano à qualidade do resultado obtido.

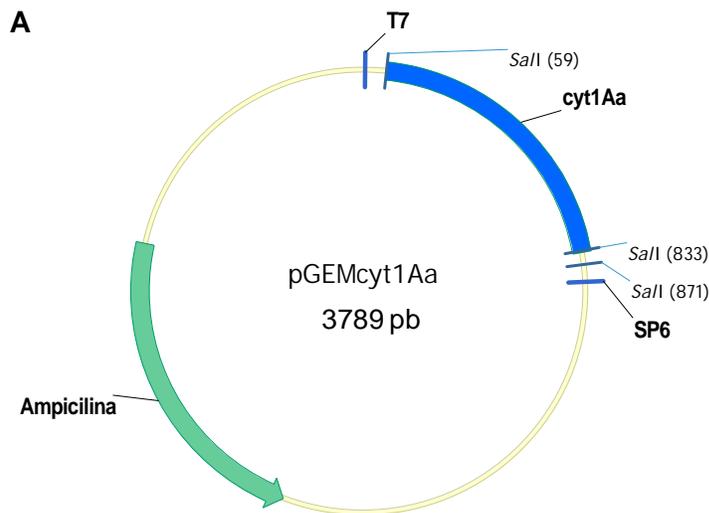
4.8 – Análise da toxicidade da proteína Cyt1Aa para larvas de *A.aegypti*

A análise da toxicidade da proteína Cyt1Aa produzida pela bactéria transformada Bt Cyt1Aa foi verificada pela realização de bioensaios seletivos para larvas de segundo ínstar de *A. aegypti*. Nos bioensaios foram utilizadas duas estirpes recombinantes que produzem a proteína Cyt1Aa isoladamente: a estirpe obtida nesse trabalho (Bt Cyt1Aa) e uma estirpe cedida gentilmente pelo Dr. Colin Berry da Universidade de Cardiff - País de Gales, que foi utilizada como controle positivo. Essas estirpes foram crescidas por 72 h em meio NYSM (Yousten *et al.*, 1984), com a presença de cloranfenicol (10µg/mL) para a estirpe Bt Cyt1Aa e de eritromicina (25µg/mL) para a estirpe controle, sob rotação de 200 rpm (Lab Line® modelo 3526) a 30 °C (± 2 °C) até completa esporulação. Em seguida, adicionou-se 25 larvas de segundo ínstar de *A. aegypti* em seis copos plásticos contendo 100 mL de água destilada. Dois copos foram utilizados para cada tratamento: Bt Cyt1Aa, controle positivo e controle negativo. Em seguida, adicionou-se 1 mL das bactérias crescidas, exceto no controle negativo. O bioensaio foi armazenado em condições iguais às da criação de insetos e sua leitura foi realizada 24h após o início do ensaio. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados e a porcentagem de mortalidade determinada.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Amplificação e clonagem do gene *cyt1Aa* no vetor pGEM®-T Easy (Promega)

O fragmento de 768 pb correspondente ao gene *cyt1Aa* foi clonado no vetor pGEM®-T Easy gerando o plasmídeo pGEMcyt1Aa (3.789 pb) (Figura 10A). O gene *cyt1Aa* da estirpe S1806 foi amplificado por reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Figura 10B). A clonagem foi confirmada por reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt1Aa* (Tabela 1) e por digestão com a enzima de restrição *SalI* (Figuras 10C e 10D, respectivamente). A digestão liberou um fragmento de 3.015 pb, correspondente ao vetor, e um fragmento de 768 pb, correspondente ao gene.



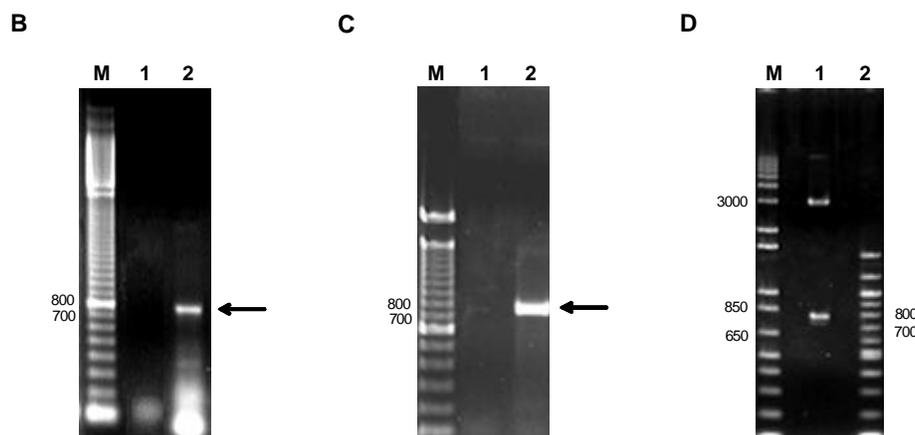


Figura 10. Clonagem do gene *cyt1Aa* no pGEM®-T Easy. A) Mapa do plasmídeo pGEMcyt1Aa. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt1Aa* da estirpe S1806 por PCR (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), e 1: controle negativo (reação sem DNA). C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR, a partir do DNA plasmidial do pGEMcyt1Aa (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen) e 1: controle negativo (reação sem DNA). D) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando DNA plasmidial do pGEMcyt1Aa digerido com *SalI* (poço 1). M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), e 2: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen). As setas indicam a amplificação do gene *cyt1Aa*.

5.2 - Seqüenciamento do gene *cyt1Aa*

O gene *cyt1Aa* foi seqüenciado e sua seqüência analisada. O gene contendo os oligonucleotídeos da enzima de restrição *SalI* apresenta 781 pb, em que 750 pb são do gene e 18 pb são da cauda de histidina (Figura 11). O gene possui uma fase aberta de leitura (ORF) contendo 768 nucleotídeos, que potencialmente codificam uma proteína de 256 resíduos de aminoácidos e com 28.17 kDa. A análise de BLAST da seqüência obtida mostrou que o gene *cyt1Aa* da estirpe S1806 tem 100 % de identidade com o gene *cyt1Aa* descrito por Waalwijk *et al.* (1985) (número de acesso no GenBank: X03182).

```

1  ggtcgacatggaaaatttaaatcattgtccattagaaatataaaggtaaatccatggaaaacc
   M E N L N H C P L E D I K V N P W K T
58  cctcaatcaacagcaagggttattacattacgtggtgaggatccaaatgaaatcaataatcct
   P Q S T A R V I T L R V E D P N E I N N L
121 ctttctattaacgaaattgataatccgaattatatattgcaagcaattatgtagcaaatgca
   L S I N E I D N P N Y I L Q A I M L A N A
184 tttcaaatgcattagttcccacttctacagattttgggtgatgccctacgcttagtatgcc
   F Q N A L V P T S T D F G D A L R F S M P
247 aaaggttagaaatcgcaaacacaattacaccgatgggtgctgtagtgagttatggtgatcaa
   K G L E I A N T I T P M G A V V S Y V D Q
310 aatgtaactcaaacgaataaccaagtaagtgtatgattaataaagtcttagaagtgttaaaa
   N V T Q T N N Q V S V M I N K V L E V L K
373 actgtattaggagttgcattaagtggatctgtaatagatcaattaactgcagcagttacaat
   T V L G V A L S G S V I D Q L T A A V T N
436 acgtttacaaatttaataactcaaaaaaatgaagcatggattttctggggcaaggaaactgct
   T F T N L N T Q K N E A W I F W G K E T A
499 aatcaaacaaattacacatacaatgtcctgtttgcaatccaaaatgccaaaactgggtggcggt
   N Q T N Y T Y N V L F A I Q N A Q T G G V
562 atgtattgtgtaccagttgggttttgaattaaagtatcagcagtaaaaggaacaagttttattt
   M Y C V P V G F E I K V S A V K E Q V L F
625 ttcacaattcaagattctgcgagctacaatgtaacatccaatctttgaaatttgcacaacca
   F T I Q D S A S Y N V N I Q S L K F A Q P
688 ttagttagctcaagtcagtatccaattgcagatcttactagcgctattaatggaaccctccat
   L V S S S Q Y P I A D L T S A I N G T L H
751 catcatcatcatcattaagtcgac
   H H H H H *

```

Figura 11. Sequência completa do gene *cyt1Aa* clonado da estirpe S1806. A região sublinhada demarca a sequência correspondente aos oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R que se anelam nas posições -7 a +12 e +739 a +774, respectivamente. Em azul estão marcados os nucleotídeos do sítio de restrição da enzima *SalI* e a região em amarelo caracteriza-se pelos oligonucleotídeos da cauda de histidina. Em vermelho estão os códons ATG e TAA, que correspondem aos códons de iniciação e terminação do gene *cyt1Aa*, respectivamente. A ORF deste gene é formada por 768 nucleotídeos (750 nucleotídeos do gene + 18 nucleotídeos da cauda de histidina), que potencialmente codifica uma proteína de 256 aminoácidos e 28,17 kDa.

5.3 - Clonagem do gene *cyt1Aa* no vetor pFastBacTM1 (Invitrogen)

O fragmento de 768 pb correspondente ao gene *cyt1Aa* contendo a cauda de histidina foi digerido com a enzima *SalI* e clonado no vetor pFastBacTM1 (Figura 12). Esse procedimento gerou o plasmídeo pFastcyt1Aa (5.550 pb) (Figura 12A). A clonagem foi confirmada por reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt1Aa* (Tabela 1) e por digestão com a enzima *SalI* (Figuras 12B e 12C, respectivamente). A digestão liberou um fragmento de 4.776 pb, correspondente ao vetor, e um fragmento de 768 pb, correspondente ao gene. Além disso, o plasmídeo pFastcyt1Aa foi digerido com a enzima de restrição *BglII* para confirmação da inserção

na orientação correta do gene no vetor. A digestão liberou três fragmentos: 470 pb, 1.775 pb e 3.305 pb (Figura 12D), confirmando a inserção do gene na orientação correta. Se o gene estivesse na orientação incorreta, a digestão, também, provocaria a liberação de três fragmentos, porém com tamanhos diferentes. Nesse caso, seriam liberados fragmentos de 470 pb, 1.106 pb e 3.974 pb, o que não foi verificado na figura 12D.

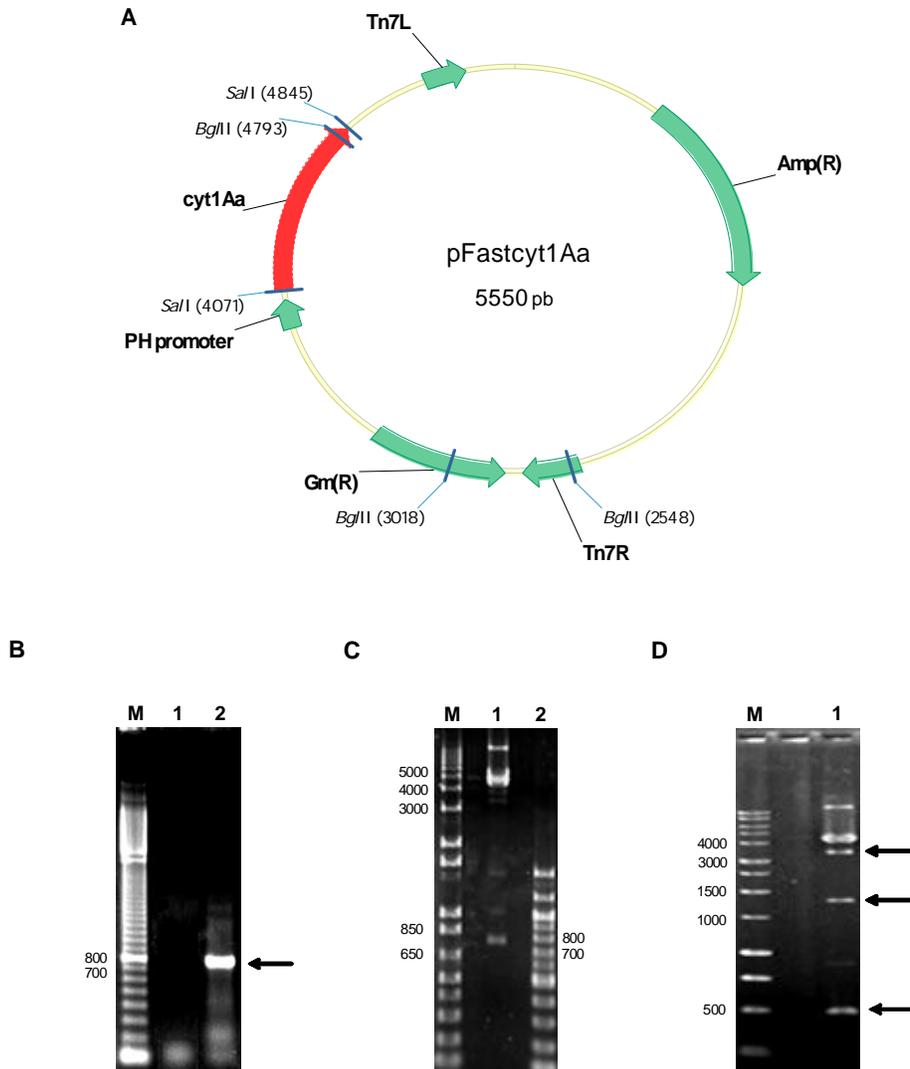


Figura 12. Clonagem do gene *cyt1Aa* no pFastBac™1. A) Mapa do plasmídeo pFastcyt1Aa. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o fragmento de 768 pb resultado da amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), e 1: controle negativo (reação sem DNA). C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o DNA do plasmídeo pFastcyt1Aa digerido com *SalI* (poço 1). M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), e 2: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen). D) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o DNA do plasmídeo pFastcyt1Aa digerido com *BglII* (poço 1). M: marcador 1Kb DNA ladder (Promega). As setas indicam a amplificação do gene *cyt1Aa* e os fragmentos liberados pela digestão do plasmídeo pFastcyt1Aa com a enzima de restrição *BglII*.

5.4 - Construção do bacmídeo recombinante

O plasmídeo pFastcyt1Aa foi utilizado na transformação de bactérias da linhagem DH10-Bac. A confirmação da construção do bacmídeo recombinante foi verificada por reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt1Aa*, e com o oligonucleotídeo Cyt1Aa F, específico para o gene *cyt1Aa*, e com o oligonucleotídeo M13 reverso, que é específico para o genoma viral (Figuras 13A e 13B, respectivamente). Neste caso, a PCR foi realizada para a confirmação da inserção na orientação correta do gene no vetor. A amplificação de um fragmento de DNA de 1.395 pb confirma a inserção do gene na orientação correta. Após a extração do DNA viral, foi realizada uma reação de PCR com os oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R para a verificação da presença do gene no vírus recombinante (Figura 13C).

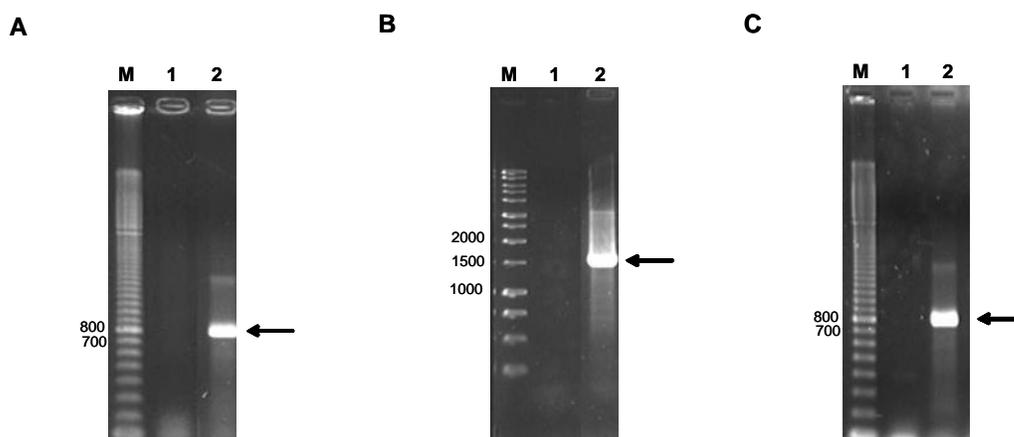


Figura 13. Confirmação da transposição do gene *cyt1Aa* por PCR. A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR, a partir do DNA do bacmídeo recombinante com os oligonucleotídeos *cyt1Aa F* e *cyt1Aa R* (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), 1: controle negativo (reação sem DNA). B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR, a partir do DNA do bacmídeo recombinante com os oligonucleotídeos *cyt1Aa F* e M13 R (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen), 1: controle negativo (reação sem DNA). C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR, a partir do DNA do vírus recombinante vFastCyt1Aa (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), 1: controle negativo (reação sem DNA). As setas indicam as amplificações do gene *cyt1Aa*.

A expressão da proteína Cyt1Aa do baculovírus recombinante vFastCyt1Aa não foi confirmada. Entretanto, outros trabalhos confirmam que os baculovírus são excelentes vetores de expressão de proteínas Cry (Aguiar *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008). A quantidade de proteína produzida nesse sistema é suficiente para o estudo da toxicidade das proteínas Cry, pois, normalmente, os bioensaios são realizados com pequenas quantidades de proteínas (ng ou µg). Esta quantidade de proteína Cry é suficiente para provocar uma mortalidade de 100 % dos insetos susceptíveis.

Estes estudos têm demonstrado que as proteínas Cry recombinantes expressas em células de inseto são biologicamente similares ao seu estado nativo, apresentando toxicidade a várias espécies de insetos. Aguiar *et al.* (2006) demonstraram que a proteína Cry1Ca truncada, expressa em baculovírus, possui alta atividade para lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. A proteína recombinante apresentou CL₅₀ de 114,4 e 14,9 ng/mL para lagartas susceptíveis de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, respectivamente. Além disso, foi relatado no trabalho que o baculovírus recombinante produziu grande quantidade da proteína recombinante na forma de cristais cubóides e que o tamanho desses cristais foram maiores quando comparadas aos cristais produzidos pelo Bt, sugerindo que os tamanhos dos cristais são limitados pelo tamanho da bactéria (Ribeiro & Crook, 1993).

O trabalho realizado por Lima e colaboradores (2008), demonstrou toxicidade das proteínas Cry2Aa e Cry2Ab de Bt para lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. As proteínas expressas apresentaram uma CL₅₀ de 1,031 µg/ml para *A. gemmatalis* (Cry2Aa) e de 3,45 µg/ml para *S. frugiperda* (Cry2Ab). Entretanto, essas proteínas não apresentaram atividade para larvas de segundo ínstar de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Apesar dos cristais dessas proteínas recombinantes possuírem o mesmo formato dos cristais das proteínas expressas em Bt, elas possuíam tamanhos diferentes quando comparadas com as proteínas expressas em Bt. Esses resultados foram semelhantes aos descritos por Aguiar *et al.* (2006).

Martins *et al.* (2008) demonstraram a expressão da proteína Cry1Ia utilizando o baculovírus como vetor de expressão. Esta proteína apresentou toxicidade contra *Anthonomus grandis* e *S. frugiperda*. As CL₅₀ apresentadas nos resultados deste trabalho foram de 21,5 µg/ml e 0,28 µg/ml para *A. grandis* e *S. frugiperda*, respectivamente. Esses dados comprovam, mais uma vez, que os baculovírus podem ser

utilizados para a expressão de proteínas Cry sem que essas proteínas percam suas atividades.

Apesar desses trabalhos não comprovarem o aumento da toxicidade dos baculovírus recombinantes, existem outros estudos que introduziram os genes *cry* no genoma do baculovírus e estes se tornaram mais tóxicos do que os baculovírus selvagens (Chang *et al.*, 2003). Nesse trabalho, foi demonstrado que a proteína Cry1Ac quando fusionada com a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV, melhorou significativamente a patogenicidade do vírus recombinante para *P. xylostella*. Portanto, os baculovírus podem ser melhorados geneticamente, produzindo bioinseticidas mais eficientes no combate das pragas agrícolas.

Outra utilidade de inserir genes das proteínas Cry no genoma do baculovírus é a expressão das proteínas Cry isoladamente em células de insetos para estudos funcionais e do modo de ação dessas proteínas. Assim, as proteínas podem ser analisadas isoladamente sem a presença de outras proteínas Cry ou outras proteínas como quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamiou, 2000), que podem ser produzidas por algumas estirpes de Bt. Além disso, estudos sobre o sinergismo entre as proteínas Cry podem ser facilitados com a expressão concomitante de duas ou mais proteínas usando diferentes baculovírus recombinantes. Trabalhos anteriores têm demonstrado que as proteínas Cry podem agir sinergicamente aumentando a toxicidade destas contra insetos susceptíveis (Xue *et al.*, 2005).

O sistema de expressão utilizando baculovírus e células de insetos possui outras vantagens em relação aos outros sistemas. Por exemplo, as células de insetos são facilmente manipuláveis, pois ao contrário das células de mamíferos, não necessitam de CO₂ e suportam flutuações de temperatura. Além disso, essas células podem ser cultivadas em meio sem soro, o que facilita a purificação de proteínas recombinantes. Outra vantagem na utilização dessas células é a pequena chance de contaminação com vírus humanos, pois vírus humanos não replicam em células de insetos.

5.5 - Construção do plasmídeo pSVPcyt1Aa

O fragmento de 768 pb correspondente ao gene *cyt1Aa* foi digerido com a enzima *Sal* I e clonado no vetor de expressão pSVP27A (Figura 14). Esse procedimento gerou o plasmídeo pSVPcyt1Aa (6.375 pb) (Figura 14A). A clonagem foi confirmada por reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *cyt1Aa* (Tabela 1)

e por digestão com a enzima *SalI* (Figuras 14B e 14C, respectivamente). A digestão liberou um fragmento de 5.601 pb, correspondente ao vetor, e um fragmento de 768 pb, correspondente ao gene. Além disso, o plasmídeo pSVPcyt1Aa foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* para confirmação da inserção na orientação correta do gene no vetor. A digestão liberou dois fragmentos: um de 1.486 pb e outro 4.889 pb (Figura 14D), confirmando a orientação correta do gene no vetor. Se o gene estivesse na orientação incorreta, seriam liberados, também, dois fragmentos: um de 5.560 pb e outro de 815 pb.

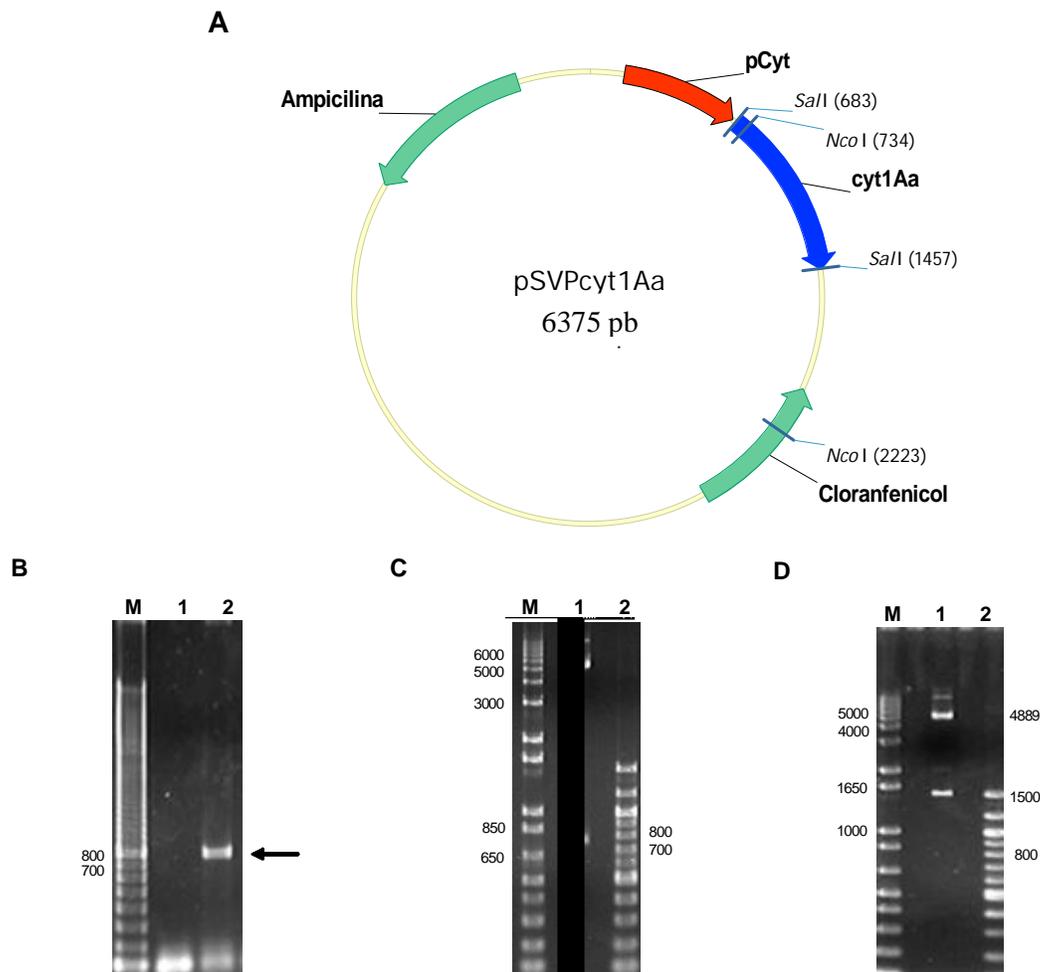


Figura 14. Clonagem do gene *cyt1Aa* no vetor pSVP27A. A) Mapa do plasmídeo pGEMcyt1Aa. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o fragmento de 768 pb resultante da amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), e 1: controle negativo (reação sem DNA). C) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o DNA do plasmídeo pSVPcyt1Aa digerido com *SalI* (poço 1). M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), e 2: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen). D) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando o DNA do plasmídeo pSVPcyt1Aa digerido com *NcoI* (poço 1). M: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen) e 2: marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen). As setas indicam a amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR.

5.6 - Transformação do Bt acristalífero

A confirmação da construção do Bt Cyt1Aa, estirpe transformada com o gene *cyt1Aa* de *B. thuringiensis*, foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Cyt1Aa F e Cyt1Aa R (Tabela 1). A reação de PCR resultou em um produto de 768 pb (Figura 15), que corresponde ao tamanho do gene *cyt1Aa*.

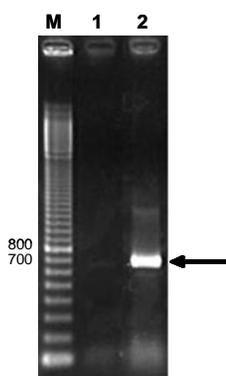


Figura 15. Confirmação da transformação de Bt acristalífero com o plasmídeo pSVpcyt1Aa. Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação, por PCR, do gene *cyt1Aa* a partir de DNA total da estirpe de Bt transformada (poço 2). M: marcador 100 pb DNA ladder (Promega), 1: controle negativo (reação sem DNA). A seta indica a amplificação do gene *cyt1Aa* por PCR.

5.7 – Análise da expressão da proteína Cyt1Aa

A expressão da proteína Cyt1Aa pela bactéria transformada Bt Cyt1Aa foi verificada pela realização de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e por Western-blot. No processo de imuno-deteção foi utilizado o anticorpo anti-His, que se conjuga à cauda de histidina presente na proteína. O gel desnaturante, contendo o extrato total de proteínas da bactéria, confirmou a presença de algumas proteínas de massas moleculares diferentes das proteínas produzidas pelo *B. thuringiensis* acristalífero (Figura 16A), porém a presença da proteína Cyt1Aa não pode ser confirmada. A imunomarcação com o anticorpo anti-His foi capaz de detectar uma banda de 27 kDa na amostra correspondente ao extrato de proteínas totais da estirpe Bt Cyt1Aa e uma banda de 30 kDa na amostra correspondente ao controle positivo. (Figura 16B). O controle positivo caracteriza-se pela proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV de 30 kDa, que contém cauda de histidina, produzida por um baculovírus recombinante (Costa, 2008). Além disso, não ocorreu marcação na amostra correspondente ao extrato de proteínas totais da estirpe *B. thuringiensis* acristalífero.

Desse modo, esse experimento confirmou a expressão da proteína pela estirpe transformada.

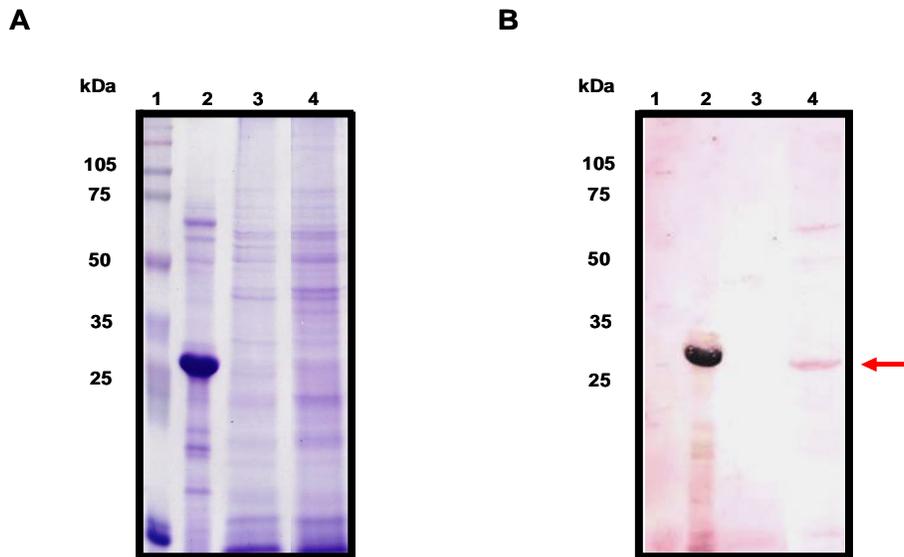


Figura 16. SDS PAGE e Imuno-marcção de extrato de proteínas totais da estirpe de Bt transformada com o gene *cyt1Aa*. A) Gel de poliacrilamida desnaturante a 12%. 1: marcador protein ladder (Bio-Rad), 2: proteína de 30 kDa referente a um baculovírus recombinante (controle positivo), 3: extrato de proteínas totais do *B. thuringiensis* acristalífero e 4: extrato de proteínas totais da estirpe Bt Cyt1Aa (estirpe transformada). B) Western-blot. 1: marcador protein ladder (Bio-Rad), 2: proteína de 30 kDa referente a um baculovírus recombinante (controle positivo), 3: extrato de proteínas totais do *B. thuringiensis* acristalífero e 4: extrato de proteínas totais da estirpe Bt Cyt1Aa (estirpe transformada). A seta vermelha indica a presença de uma proteína de 27 kDa, correspondente a proteína Cyt1Aa.

A expressão homóloga das proteínas de Bt tem sido uma estratégia muito utilizada nos estudos de ação sinérgica dessas proteínas e nos trabalhos de interação dessas proteínas com seus receptores (Pérez *et al.*, 2005). Dessa maneira, esses estudos facilitam a compreensão do modo de ação das proteínas Cry e Cyt e explicam os fatores que provocam o surgimento de populações resistentes a essas proteínas. Além disso, estudos com as proteínas Cyt utilizando a expressão dessa proteína em *B. thuringiensis* acristalífero auxiliam na criação de estratégias que são responsáveis por combater o surgimento dessas populações resistentes (Pérez *et al.*, 2005).

Esse tipo de sistema apresenta uma série de vantagens sobre os outros sistemas. Dentre essas vantagens, destaca-se a metodologia de purificação das proteínas. Geralmente, os cristais protéicos são facilmente purificados por gradiente de sacarose. Entretanto, para algumas proteínas essa metodologia se torna ineficiente devido ao fato das proteínas não conseguirem cristalizar, como por exemplo, a proteína CryIIa (Kostichka *et al.*, 1996). Ao trabalhar-se com esses tipos de proteínas, o sistema de expressão em baculovírus pode se tornar uma vantagem em relação ao sistema de expressão em Bt. Martins *et al.* (2008) clonaram e expressaram a proteína CryIIa em baculovírus, que foi facilmente purificada devido ao fato dessa proteína possuir a capacidade de cristalização em células de insetos infectadas com baculovírus recombinante.

Os resultados obtidos no nosso trabalho coincidem com o trabalho realizado por Kostichka e colaboradores (1996), pois não foi verificada qualquer tipo de cristalização para a proteína Cyt1Aa no gel desnaturante de poliacrilamida (Figura 16). Portanto, a purificação da proteína Cyt1Aa não pode ser realizada por gradiente de sacarose. No entanto, a proteína Cyt1Aa expressa pelo Bt Cyt1Aa possui cauda de histidina. Desse modo, a proteína pode ser purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel. Porém, o experimento de purificação não foi realizado.

Uma alternativa utilizada para a cristalização das proteínas Cyt1Aa em células de Bt ou de *E. coli* é a clonagem, juntamente com os genes de interesse, de genes de proteínas que funcionam como chaperonas, auxiliando a formação dos cristais protéicos como, por exemplo, as proteínas P20 e P19. A presença da proteína P20 em células de *E. coli* e de Bt acristalífero demonstra haver estabilidade da proteína Cyt1A e aumento da produção de cristais (Adams *et al.*, 1989; Visick & Whiteley, 1991). Além disso, nos seus hospedeiros naturais, como o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, a proteína P20 pode funcionar como chaperona por iniciar, facilitar ou estabilizar a formação dos cristais protéicos. Essa proteína pode proteger seus hospedeiros contra a ação da própria proteína Cyt1Aa (Manasherob *et al.*, 2001). Entretanto, o fato da proteína Cyt1Aa não ser tóxica a linhagem acristalífera 4Q7 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* demonstra que deve existir alguma outra proteína nessa linhagem que funcione de forma similar à proteína P20 (Manasherob *et al.*, 2001).

A ausência de produção de cristais pela bactéria transformada Bt Cyt1Aa pode ser ocasionada devido à linhagem acristalífera de *B. thuringiensis* utilizada nesse trabalho. Wu & Federici (1993) demonstraram que em algumas linhagens acristalíferas

de Bt a proteína Cyt1Aa não cristalizava e possuía ação citotóxica aos seus próprios hospedeiros. Nesse trabalho, as linhagens acristalíferas 4Q7 e cryB de Bt foram transformadas com dois plasmídeos: um contendo os genes da proteína P20 e da proteína Cyt1Aa, e outro contendo o gene da proteína Cyt1Aa. Os resultados demonstraram que a linhagem 4Q7 transformada somente com o plasmídeo do gene *cyt1Aa* não foi afetada pela ação das proteínas Cyt1Aa e conseguia produzir poucos cristais protéicos. No entanto, quando esta linhagem foi transformada com o plasmídeo contendo os dois genes, ocorreu grande produção de cristais protéicos. A linhagem cryB, quando transformada com o plasmídeo com os dois genes, promoveu a cristalização da proteína Cyt1Aa. Porém, quando essa linhagem foi transformada com somente com o gene da proteína Cyt1Aa, não ocorreu produção de cristais protéicos e as células bacterianas sofreram com a ação das proteínas Cyt1Aa. Acredita-se que essa proteína possa estar interagindo com a própria membrana das células bacterianas (Wu & Federici, 1993)

5.8 – Toxicidade da proteína Cyt1Aa

A análise da toxicidade da proteína Cyt1Aa produzida pela bactéria transformada Bt Cyt1Aa foi verificada pela realização de bioensaios seletivos para larvas de segundo ínstar de *A. aegypti*. Os resultados obtidos no bioensaios seletivo mostraram que a estirpe Bt Cyt1Aa causou mortalidade de 20% das larvas, enquanto a estirpe utilizada como controle positivo causou mortalidade de 100% das larvas (Tabela 2). Além disso, verificou-se que não ocorreu nenhuma mortalidade no controle negativo. Bioensaios de dose com a estirpe Bt Cyt1Aa não foram realizados devido à baixa mortalidade provocada por essa estirpe a larvas de segundo ínstar de *A. aegypti*.

Tabela 2. Bioensaio seletivo para larvas de segundo instar de *A. aegypti* utilizando estirpes de Bt transformadas, que produzem a proteína Cyt1Aa isoladamente.

Amostras testadas	Mortalidade (%)
Bt Cyt1Aa	20
Controle positivo	100
Controle negativo	0

A proteína Cyt1Aa produzida pela estirpe Bt Cyt1Aa apresentou baixa toxicidade devido, provavelmente, à baixa expressão e/ou degradação das proteínas Cyt1Aa por proteases ou pela interação dessas proteínas com outras estruturas das células bacterianas, dificultando dessa maneira a atuação dessas toxinas. Como descrito anteriormente, essa estirpe não possui o gene da proteína P20, portanto não ocorre cristalização das proteínas Cyt1Aa. Wu & Federeci (1993) demonstraram que as proteínas Cyt1Aa que não cristalizam podem interagir com a membrana das células bacterianas.

Os resultados apresentados para o controle positivo (estirpe que possui P20 e produz somente os cristais protéicos Cyt1Aa) são semelhantes aos obtidos na literatura. Thiery *et al.* (1997) demonstraram que a linhagem 4Q7 de Bt, que possui a proteína P20 e produz somente as proteínas Cyt1Aa, apresentam CL_{50} de 0,88 $\mu\text{g/mL}$ para larvas de quarto ínstar de *A. aegypti*. Além disso, a proteína Cyt1Aa apresentou toxicidade para outras duas espécies de mosquitos. Outro trabalho também demonstrou a atividade da proteína Cyt1Aa para *A. aegypti* (Margaret *et al.*, 2000). Nesse caso, a CL_{50} obtida para larvas de quarto ínstar de *A. aegypti* foi de 5,9 $\mu\text{g/mL}$.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tomando como base os objetivos estabelecidos no início deste trabalho conclui-se que:

- Objetivo 1 : Isolar, clonar e sequenciar o gene *cyt1Aa* de *B. thuringiensis*;
 - **Conclusão:**
 - ✓ **O gene *cyt1Aa* de *B. thuringiensis* foi amplificado por PCR, e clonado nos vetores pGEM®-T Easy, pFastBac™1 e pSVP27A;**
 - ✓ **O gene amplificado da estirpe 1806 possui 100 % de identidade com o gene *cyt1Aa* do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.**

- Objetivo 2: Expressar a proteína Cyt1Aa em células de insetos utilizando o baculovírus como vetor de expressão;
 - **Conclusão:**
 - ✓ **A expressão da proteína Cyt1Aa não foi confirmada.**

- Objetivo 3: Expressar a proteína Cyt1Aa em células de Bt utilizando uma linhagem acristalífera de *B. thuringiensis*;
 - **Conclusão:**
 - ✓ **A expressão da proteína Cyt1Aa foi confirmada por Western-blot;**
 - ✓ **A massa molecular da proteína foi do tamanho esperado de 27 kDa.**

- Objetivo 4: Comparar a expressão da proteína Cyt1Aa de *B. thuringiensis* nos sistemas de expressão heteróloga (baculovírus) e homóloga (Bt).
 - **Conclusão:**
 - ✓ **Não foi possível a comparação entre os dois sistemas, pois não foram realizados bioensaios com a proteína expressa no sistema de baculovírus;**

✓ A proteína Cyt1Aa, expressa em Bt, não apresentou toxicidade para larvas de segundo instar de *A. aegypti*.

Deste modo, visando dar continuidade ao trabalho pretende-se:

- Confirmar a expressão da proteína Cyt1Aa no baculovírus recombinante;
- Realizar bioensaios com a proteína Cyt1Aa, expressa em insetos usando baculovírus recombinante;
- Clonar o gene *cyt1Aa* em outras linhagens de *B. thuringiensis* acristalífero;
- Realizar bioensaios com a proteína Cyt1Aa, expressa em Bt.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, L. F., VISICK, J. E., WHITELEY, H. R. (1989). A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**: 171, p. 521–530.

AGUIAR, R. W. S., MARTINS, E. S., VALICENTE, F. H., CARNEIRO, N. P., BATISTA, C. A., MELATTI, V. M., MONERRAT, R. G., RIBEIRO, B. M. (2006). A recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Current Microbiology**: 53, p. 287–292.

AL-YAHYAEE, S. A. S. & ELLAR, D. J. (1995). Maximal toxicity of cloned CytA delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-terminal, **Microbiology**: 141, p. 3141–3148.

ARIF, B. M. (1986). The structure of the viral genome. **Current Topics in Microbiology and Immunology**: 131, p. 21-29.

BARRETT, J. W., BROWNRIGHT, A. J., PRIMAVERA, M. J., RETNAKARAN, A., PALLI, S. R. (1998). Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Tissue Cell**: 30, p. 602-616.

BARROS, M. C. E. S. (2007). Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 108 p.

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. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, **Applied and Environmental Microbiology**: 68, p. 5082–5095.

BESERRA, E. B., CASTRO-JÚNIOR, F. P., SANTOS, W. dos, SANTOS, T. da S., FERNANDES, C. R. M. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**: 35, p. 853-860.

BOURGOUIN, C., KLIER, A., RAPOPORT, G. (1986). Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*, **Molecular and General Genetics**: 205, p. 390–397.

- BRAVO, A., GILL, S. S., SOBERÓN, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**: 49, p. 423-435.
- BRAVO, A. & SOBERÓN, M. (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**: 26, p. 573-579.
- BUTKO, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**: 69, p. 2415-2422.
- CASTRO, M. E. B. de, SOUZA, M. L., ARAÚJO, S. BILIMORIA S. L. (1997). Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**: 69, p. 40-45.
- CHANG, J. H., CHOI, J. Y., JIN, B. R., ROH, J. Y., OLSZEWSKI, A., SEO, S. J., O'REILLY, D. R., JE, Y.H. (2003). An improved Baculovirus insecticida producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**: 84, p. 30-37.
- CHEONG, H. & GILL, S.S. (1997). Cloning and characterization of a cytolytic and mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p. 3254-3260.
- CONSOLI, R. A.G. B & OLIVEIRA, R. L. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 228 p.
- COSTA, M. H. O. (2008). Construção de vetor baculoviral modificado para produção de poliedros contendo proteína capsidial de vírus do complexo viral de alho visando produção de anti-soros. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas** (Biologia Molecular), Universidade de Brasília. 110 p.
- CRICKMORE, N & ELLAR, D. J. (1992). Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**: 6, p. 1533-1537.
- DANKOCSIK, C., DONOVAN, W. P., JANY, C. S. (1990). Activation of cryptic protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**: 4, p. 2087-2094.
- DONOVAN, W. P., DANKOSCISK, C. C., GILBERT, M. P., GAWRON-BURKE, M. C., GROAT, R. G., CARLTON, B. C. (1988). Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. **Journal of Biological Chemistry**: 263, p. 561-567.

- ENGELHARD, E. K., KAM-MORGAN, L. N., WASHBURN, J. O., VOLKMAN, L. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 91, p. 3224-3227.
- FEDERICI, B. A. (1997). Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.) **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 33-58.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002, p. 453-492.
- FRANCO O. (1969). História da febre amarela no Brasil. **DNERu**, Rio de Janeiro, RJ.
- FUNK, C. J., BRAUNAGEL, S. C., ROHRMANN, G. F. (1997). Baculovirus structure. In: MILLER, L.K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, p. 7-32.
- GAZIT, E. & SHAI, Y. (1993). Structural characterization, membrane interaction, and specific assembly within phospholipid membranes of hydrophobic segments from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cytolytic toxin. **Biochemistry**: 32, p.12363–12371.
- GE, B., BIDESHI, D., MOAR, J. W., FEDERICI, B. A. (1998). Differential effects of helper proteins encoded by *cry2a* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**: 165, p. 35-41.
- GEORGHIOU, G. P. & WIRTH, M. C. (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p.1095–1101.
- GLARE, T. R. & O'CALLAGHAM, M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley and Sons**, 350 p.
- GRANADOS, R. R. & LAWLER, K. A. (1981). *In vitro* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**: 108, p. 297-308.
- GRANADOS, R. R. & WILLIAMS, K. (1986). In vivo infection and replication of baculovirus. In: **The Biology of Baculovirus** CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 89-108.
- GRANADOS, R. R., GUOXUN, L., DERKSEN, C. G., MCKENNA, K. A. A. (1994). An insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**: 64, p.260-266.

- GUERCHICOFF, A., UGALDE, R. A., RUBINSTEIN, C. P. (1997). Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p. 2716–2721.
- GUERCHICOFF, A., DELECLUSE, R. A. RUBINSTEIN, C. P. (2001). The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**: 67, p. 1090–1096.
- GUZMAN, M. G. & KOURI, G. (1996). Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**: 3, p. 621-627.
- HALSTEAD, S. B. (1993). Global epidemiology of dengue: health systems in disarray. **Tropical Medicine**: 35, p. 137-146.
- JUAREZ-PEREZ, V., GUERCHICOFF, A., RUBINSTEIN, C., DELECLUSE, A. (2002). Characterization of Cyt2Bc toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. **Applied and Environmental Microbiology**: 68, p. 1228–1231.
- KONI, P. A., & ELLAR., D. J. (1993). Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **Journal of Molecular Biology**: 229, p. 319–327.
- KONI, P.A. & ELLAR, D.J. (1994). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. **Microbiology**: 140, p. 1869–1880.
- KOSTICHKA, K., WARREN, G. W., MULLINS, M., MULLINS, A. D., CRAIG, J. A., KOZIEL, M. G., ESTRUCH, J. (1996). Cloning of a cryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**: 178, p. 2141 – 2144.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**: 227, p. 680-685.
- LECADETT, M.M., CHAUF AUX, J., RIBIER, J.E., LERECLUS, D. (1991). Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**: 58, p. 840-849.
- LERECLUS, D., AGAÏSSE, H., GOMITED, M., CHAUF AUX, J. (1995). Overproduction encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. **Bio/Technology**: 13, p. 67-71.

- LEVINSON, B. L., KASYAN, K. J., CHIU, S. S., CURRIER, S., GONZÁLEZ JR., J. M. (1990). Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**: 172, p. 3172-3179.
- LI, J., PANDELAKIS, A. K., ELLAR, D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology**: 257, p. 129–152.
- LIMA, G. M. S., AGUIAR, R. W. S., CORRÊA, R. F. T., MARTINS, E. S., GOMES, A. C. M., NAGATA, T., DE-SOUZA, M. T., MONNERAT, R. G., RIBEIRO, B. M. (2008). Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**: 24, p. 2941–2948.
- LOZOVEI, A. L. (2001). Culicídeos (mosquitos), p. 59-104. In C.B. Marcondes (org.), **Entomologia médica e veterinária**. 1ª ed. São Paulo, 432 p.
- LUCKOW, V. L. & SUMMERS, M. D. (1988). Trends in the development of a baculovirus expression vectors. **Biotechnology**: 6, p. 47-55.
- MAIORELA, B., INLOW, D., SHAUGER, A., HARANO, D. (1988). Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. **Biotechnology**: 6, p. 1406-1410.
- MANASHEROB, R., ZARITSKY, A., BEN-DOV, E., SAXENA, D., BARAK, Z., EINAV, M. (2001). Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**: 43, p. 355–364.
- MARCORIS, M. L. G., ANDRIGHETTI, M. T. M., TAKAKU, L., GLASSER, C. M., GARBELOTTO, V. C., CIRINO, V. C. B., (1999). Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**: 33, p. 521-522.
- MARGLITH, Y. & BEN-DOV, E. (2000). Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, in: J.E. Rechcigl, N.A. Rechcigl (Eds.), **Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 243–301.
- MARTENS, J. W. M., KNOESTER, M., WEIJTS, F., GROFFEN, S. J. A., HU, Z., BOSCH, D., VLAK, J. M. (1995). Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* Cru1A(b) crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**: 66, p. 249-267.

MARTINS, E. S., AGUIAR, R. W. D. S., MARTINS, N. F., MELATTI, V. M., FALCÃO, R., GOMES, A. C. M. M., RIBEIRO, B. M., MONNERAT, R. G. (2008) Recombinant CryIIa protein is highly toxic to cotton bollweevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**: 104, p. 1363-1371.

MERRYWEATHER, A. T., WEYER, U., HARRIS, M. P. G., HIRST, M., BOOTH, T. e POSSEE, D. (1990). Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. **Journal of General Virology**: 71, p. 1535-1544.

MILLER, L. K., MILLER, D., ADANG, M. (1983). An insect virus for genetic engineering: developing baculovirus polyhedron substitution vectors. In P. Lurquin e A. Kleinhofs (eds), **Genetic engineering in eukaryotes**. New York, Plenum Press. p. 89-97.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=920 (Acesso em 06 de março de 2009).

MONATH, T. P. (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 91, p. 2395-2400.

MONNERAT, R. G., SILVA, S. F., SILVA-WERNECK, J. O. (2001). Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. **Boletim de Pesquisa**: 88, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 65 p.

MOSCARDI, F. (1998). Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. **Controle Microbiano de Insetos**: 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, p. 509 – 539.

MOSCARDI, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidóptera. **Annual Review of Entomology**: 44, p. 257-289.

O'REILLY, D.R., MILLER, L.K., LUCKOW, V.A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York. W.H. Freeman and Company.

PÉREZ, C., FERNANDEZ, L. E., SUN, J., FOLCH, J. L., GILL, S. S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes CryIIAa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 102, p. 18303–18308.

PÉREZ, C., MUÑOZ-GARAY, C., PORTUGAL, L. C., SÁNCHEZ, J., GILL, S. S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of CryIIAa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. **Cellular Microbiology** 9, p. 2931–2937.

- PROMDONKOY, B., CHEWAWIWAT, N., TANAPONGPIPAT, S., LUXANANIL, P., PANYIM, S. (2003). Cloning and characterization of a cytolytic and mosquito larvicidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. **Current Microbiology**: 46, p. 94–98.
- PROMDONKOY, B. & ELLAR, D.J. (2003). Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**: 374, p. 255–259.
- RIBEIRO, B. M. & CROOK, N. E. (1993). Expression of full-length and truncate formas of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**: 62, p. 121-130.
- RIBEIRO, B. M. & CROOK, N. E. (1998). Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cryIAb* and *cryIAc* genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**: 31, p. 763-769.
- RIBEIRO, B. M., SOUZA, M. L., KITAJIMA, E. W. (1998). Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: **Controle Microbiano de Insetos**. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 481-507.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, NewYork.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN REIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: 62, p. 775-806.
- SILVA, H. H. G., SILVA, I. G., OLIVEIRA, C. L. N. S., ELIAS, C. N. (1999). Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. **Entomology Vectors**: 6, p. 383-391.
- SMITH, G. E. & SUMMERS, M. D. (1978). Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. **Virology**: 89, p. 517 – 527.
- SMITH, G. E., VLAK, J. M., SUMMERS, M. D. (1983). Physical analysis of *Autografa caliornica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyedrin and a 10,000-molecular-weight protein *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Virology**: 45, p. 215-225.
- TAUIL, P. L. (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**: 18, p. 867-871.

- THIERY, I., DELÉCLUSE, A., TAMAYO, M. C., ORDUZ, S. (1997). Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**: 63, p. 468–473.
- THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. (1983a). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**: 60, p. 181-197.
- THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. (1983b). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**: 154, p. 362–368.
- VILARINHOS, P. T. R. & MONNERAT, R. G. (2004). Larvicidal persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations to control *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**: 20, p. 311-314.
- VISICK, J. E. & WHITELEY, H. R. (1991). Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**: 173, p. 1748–1756.
- VOLKMAN, L. E. & KEDDIE, B. A. (1990). Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**: 1, p. 249-256.
- XUE, J. L., CAI, Q. X., ZHENG, D. S., YUAN, Z. M. (2005). The synergistic between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**: 40, p. 460 - 465.
- WAALWIJK, C., DULLEMANS, A. M., VAN WORKUM, M. E., VISSER, B. (1985). Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28,000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Nucleic Acids Research**: 13, p.8207–8217.
- WARD, E. S. & ELLAR, D. J. (1983). Assignment of the delta -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Letters**: 158, p. 45-49.
- WARD, E. S., ELLAR, D. J., CHILCOTT., C. N. (1988). Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. **Journal of Molecular Biology**: 202, p. 527–535.
- WIRTH, M. C., GEORGHIOU, G. P., FEDERICI, B. A. (1997). CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**: 94, p. 10536–10540.

WIRTH, C. M., FEDERICI, B. A., WALTON, W. E. (2000). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**: 66, p. 1093 – 1097.

WU, D. & FEDERICI, B. A. (1993). A 20-Kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**: 175, p. 5276-5280.

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