

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**



**Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto**

**RAIMUNDO WAGNER DE SOUZA AGUIAR**

**Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro**

**Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Rose Gomes Monnerat**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, como requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

**Brasília/2007**

## RAIMUNDO WAGNER DE SOUZA AGUIAR

**Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*,  
utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto.**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, como requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

---

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Filho  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília (UNB)

---

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende  
Departamento de Biologia Molecular  
Universidade de Brasília (UNB)

---

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva  
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz  
Departamento de Entomologia

---

Prof. Dr. Daniel Brito Fragoso  
Fundação Universidade do  
Tocantins (Unitins)

---

Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília (UNB)  
Orientador

**Brasília/2007**

## Busca do conhecimento

*A ciência é todo um conjunto de atitudes e de atividades racionais, com objetivo limitado capaz de ser submetido à verificação; a verdade científica de hoje pode ser superada diante de nossas descobertas do amanhã.*

Raimundo Wagner de Souza Aguiar

*A Deus.*

*À minha amada esposa Roberta de Almeida Sarmiento S. Aguiar.*

*Aos meus filhos Matheus e Stella*

*Aos meus queridos pais Leonardo e Raimunda*

*Ao Sr e Sra. Roberto e Jacira.*

*À Escala de Canuanã (Fundação Bradesco)*

**Dedico.**

## ***AGRADECIMENTOS***

À minha família, que sempre me apoiou e me deram estrutura para seguir minha jornada, especialmente minha esposa e meus pais.

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

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

Aos funcionários do departamento de Biologia Molecular e do laboratório de Microscopia Eletrônica e os demais departamentos desta universidade, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Bergmann Morais Ribeiro pela oportunidade concedida e confiança no desenvolvimento dos trabalhos aqui realizados.

À Dra. Rose Gomes Monnerat (EMBRAPA-Cenargen) pela oportunidade concedida assim como o apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Microscopia Eletrônica e Bacteriologia EMBRAPA-CENARGEN

## ***HISTÓRICO***

**Raimundo Wagner de Souza Aguiar**, filho de Leonardo de Souza Correia e Raimunda Aguiar Correia, natural de Formoso do Araguaia, Estado do Tocantins, nascido no dia 31 de Agosto de 1972.

No período de 1996 a 2000, concluiu o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade do Tocantins – UNITINS, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2001.

No ano de 2003, obteve o título de Magister Science em Entomologia pela Universidade de Viçosa-MG.

Em março de 2003, iniciou o curso de Doutorado em Biologia Molecular, na Universidade de Brasília.

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMENTO</b>	<b>v</b>
<b>INDICE GERAL</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>INDICE DE TABELAS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>4</b>
2.2. Toxinas produzidas por <i>Bt</i>	<b>5</b>
2.3. As proteínas Cry	<b>6</b>
2.4. Número de cópias dos genes <i>cry</i>	<b>10</b>
2.5. Regulação transcricional dos genes <i>cry</i>	<b>10</b>
2.5.1. Mudanças morfológicas ocorridas durante a fase de esporulação	<b>11</b>
2.5.2. Alterações genéticas ocorridas durante a fase de esporulação	<b>13</b>
2.5.3. Genes <i>cry</i> dependente da fase de esporulação	<b>14</b>
2.5.4. Genes <i>cry</i> independente da fase de esporulação	<b>15</b>
2.6. Mecanismo de ação das proteínas Cry	<b>16</b>
2.6.1. Solubilização e processamento das toxinas	<b>16</b>
2.6.2. União ao receptor	<b>17</b>
2.6.3. Inserção na membrana, agregação e formação do poro e citólise	<b>19</b>
2.7. Principais classes de proteínas Cry	<b>21</b>
2.8. Baculovirus como vetor de expressão de proteína heteróloga	<b>24</b>

<b>3. Objetivos</b>	
3.1. Geral	<b>31</b>
3.2. Específicos	<b>31</b>
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>32</b>
4.1. Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos diferentes genes <i>cry</i>	<b>32</b>
4.2. Construção dos vetores de transferências	<b>35</b>
4.3. Células e vírus	<b>37</b>
4.4. Construção e purificação dos vírus recombinantes contendo os gene <i>cry</i>	<b>37</b>
4.5. Análise transcricional dos genes <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i> em células de insetos infectadas pelos vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa	<b>38</b>
4.6. Análise dos possíveis cristais das proteínas recombinantes obtidas de larvas de terceiro instar de <i>S. frugiperda</i> infectadas com vírus recombinantes	<b>40</b>
4.7. Produção de anti-soro policlonal contra as proteínas Cry recombinantes	<b>40</b>
4.8. Análise ultra-estrutural de OB e cristais das proteínas Cry recombinantes	<b>41</b>
4.9. Avaliação da toxicidade das proteínas Cry recombinantes	<b>42</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>44</b>
5.1. Clonagem e seqüenciamento dos genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i>	<b>44</b>
5.2. Construção e purificação dos vírus recombinantes vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa	<b>50</b>
5.3. Análise transcricional dos genes <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i> em células de insetos infectadas pelos vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa	<b>52</b>
5.4. Análise da expressão das proteínas Cry recombinantes	<b>54</b>
5.5. Análise ultra-estrutural de OB e cristais das proteínas Cry recombinantes	<b>57</b>
5.4. Avaliação da toxicidade das proteínas Cry recombinantes	<b>58</b>



<b>6. Discussão</b>	<b>60</b>
6.1. Toxicidade da proteína Cry1Ca	61
6.2. Toxicidade da proteína recombinante Cry2Ab	63
6.3. Toxicidade da proteína recombinante Cry10Aa	66
<b>7. Conclusões</b>	<b>70</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>71</b>
<b>9. Referências bibliográficas</b>	<b>72</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
Figura 1. Fotomicrografia de uma célula de <i>Bt</i>	4
Figura 2. Representação esquemática da toxina Cry3A	7
Figura 3. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry	9
Figura 4. Eventos ocorridos na fase de esporulação de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
Figura 5. Esquema representativo do mecanismo de ação das proteínas Cry de <i>Bt</i>	17
Figura 6. Esquema da infecção primária desenvolvida pelo baculovírus em insetos susceptíveis	25
Figura 7. Construção de baculovirus recombinantes usando o sistema de recombinação homóloga	28
Figura 8. Esquema de construção de baculovírus recombinates via transposição	29
Figura 9. Diagrama mostra o esquema utilizado para obtenção dos vírus recombinantes contendo os genes <i>cry1Ca</i> , <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i>	36
Figura 10. Seqüência de nucleotídeos dos genes <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i>	48
Figura 11. Clonagem dos genes <i>cry2Ab</i> , <i>cry10Aa</i> e <i>cry1Ca</i> nos vetores de clonagem	49
Figura. 12. Identificação dos vírus recombinantes por microscopia de luz	51
Figura 13. Análise da transcrição dos genes <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i> por RT-PCR	53
Figura 14. Análise da expressão das proteínas recombinantes	56
Figura 15. Análise ultra-estrutural dos poliedros e cristais purificados de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas com os vírus recombinantes	57

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
Tabela 1. Seqüência dos promotores e fatores sigmas de <i>B. subtilis</i>	<b>14</b>
Tabela 2. Classificação das classes das proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i>	<b>23</b>
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes <i>cry1Ca</i> , <i>cry2Ab</i> e <i>cry10Aa</i>	<b>34</b>
Tabela 4. Toxicidade dos cristais da proteína recobinante Cry1Ca contra larvas de segundo instar de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i>	<b>59</b>

## RESUMO

Os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* de diferentes estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* foram amplificados por PCR, clonados em um vetor de clonagem e seqüenciados. As análises das seqüências mostraram alta identidade com outros genes *cry* já descritos. Os genes foram removidos dos vetores de clonagem e introduzidos em um plasmídeo vetor de transferência (pSynXIVVI+X3) para construção de baculovírus recombinantes por recombinação homóloga. Os vírus recombinantes foram purificados por diluição seriada em placa de 96 poços e usados para infectar células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) e larvas de *Spodoptera frugiperda*. A análise transcricional dos genes *cry2Ab* e *cry10Aa* foi realizada por RT-PCR, a partir de mRNA extraído de células de inseto infectadas (72 h p.i.), para confirmação da presença de um transcrito específico para os genes. Extratos de larvas infectadas (96 h p.i.) com os vírus vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa foram usados para purificação dos cristais das proteínas recombinantes por ultracentrifugação. Em SDS-PAGE, os extratos apresentaram polipeptídeos de aproximadamente 65, 65 e 74 kDa, correspondentes, respectivamente, ao tamanho das proteínas Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa. Estes mesmos cristais foram analisados por microscopia de luz e eletrônica e mostraram-se na forma de grandes cristais cubóides. A toxicidade dos cristais das proteínas recombinantes foram verificadas para larvas de segundo instar de *S. frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis* (Cry1Ca, sendo a CL<sub>50</sub> de 114,44 e 19,49 ng/mL, respectivamente), e a proteína Cry2Ab recombinante foi tóxica para larvas de *S. Frugiperda* (CL<sub>50</sub> de 3,40 µg/mL). No entanto, a proteína Cry10Aa recombinante foi altamente tóxica para larvas neonatas de *A. grandis* com CL<sub>50</sub> de 7,12 µg /mL. Neste trabalho, foi demonstrado que proteínas Cry recombinants são similares às proteínas naturais, possuindo alta toxicidade para diferentes insetos-praga, o que confirma a utilidade do sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto para o estudo de proteínas Cry.

## ABSTRACT

The *cry1Ca*, *cry2Ab* and *cry10Aa* genes from different Brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* were amplified by PCR, cloned into a plasmid cloning vector and sequenced. Sequence analysis showed high identity to previous known *cry* genes. The genes were removed from the cloning vector and introduced into a transfer vector (pSynXIVVI+X3) for the construction of recombinant baculoviruses by homologous recombination. The recombinant viruses were purified by serial dilution in 96 well plates and used to infect *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) insect cells and *Spodoptera frugiperda* larvae. Transcriptional analysis of the *cry2Ab* and *cry10Aa* genes was carried out by RT-PCR, using mRNA extracted from infected insect cells (72 h p.i.), in order to confirm the presence of the gene specific transcript. Recombinant virus (vSynCry1Ca, vSynCry2Ab and vSynCry10Aa) infected insect extracts (96 h p.i.) were used for the purification of crystals, made of recombinant proteins, by ultracentrifugation. In SDS-PAGE, the insect extracts showed polypeptides of approximately 65, 65 and 74 kDa, corresponding, respectively to the sizes of the proteins Cry1Ca, Cry2Ab and Cry10Aa. These same crystals were analysed by light and electron microscopy and showed the shape of big cuboidal crystals. Furthermore, the crystals preparations were toxic to second instar *S. frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis* larvae, with a CL<sub>50</sub> of 114,44 and 19,49 ng/mL, respectively (from vSynCry1Ca-infected insect extracts), to second instar *S. frugiperda*, with a CL<sub>50</sub> of 3,40 µg/mL (from vSynCry2Ab-infected insect extracts) and neonate *A. grandis* larvae, with a CL<sub>50</sub> of 7,12 µg/mL (from vSynCry10Aa-infected insect extracts). This work showed that recombinant Cry proteins are similar to their natural counterpart, showing the high toxicity to different insect pests, which demonstrate the utility of the baculovirus expression system for the study of Cry proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produz proteínas tóxicas contra diversos organismos diferentes. Entre as proteínas entomopatogênicas produzidas por *Bt* se encontram as fosfolipases (Zhang *et al.*, 1993), proteases (Lovgren *et al.*, 1990), quitinases,  $\alpha$ -exotoxinas ou exotoxinas (Schnepf & Whiteley, 1985),  $\beta$ -exotoxinas (Levinson, 1990), proteínas VIP (Estruch *et al.*, 1996) e proteínas Cry e Cyt (Schnepf *et al.*, 1998).

A principal característica que define a espécie *Bt* é a presença de um cristal, responsável pela atividade tóxica contra insetos. Estes cristais são formados por uma ou várias toxinas de natureza protéica chamadas comumente de  $\delta$ -endotoxinas, ou proteínas Cry. Desta forma, o espectro de ação tóxica do *Bt* se explica tanto pelo tipo, assim como, pela proporção em que se encontram diferentes toxinas em cada estirpe isolada. Diversas proteínas Cry diferentes já foram descritas (Crickmore *et al.*, 2006) e os seus respectivos genes se encontram, em sua maioria, em plasmídeos crípticos e conjugativos de alta massa molecular (>40kb) (González *et al.*, 1981; Kronstad *et al.*, 1981). Não existe nenhuma correlação entre o perfil plasmídial de uma estirpe com o número de cópias de genes *cry*, no interior de uma mesma bactéria. Atualmente, mais de 350 genes de proteínas Cry foram clonados e seqüenciados nos últimos anos, a partir de diferentes estirpes de *Bt* (Crickmore *et al.*, 2006).

As proteínas Cry entomopatogênicas, produzidas por *Bt*, possuem especificidade para ordens de insetos tais como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera e Homoptera, assim como ácaros e outros invertebrados (nematelmintos e platelmintos) (Feitelson, 1992). No entanto, para serem tóxicas aos organismos susceptíveis, as toxinas de *Bt* precisam ser sintetizadas na forma de uma pró-toxina (toxina inativa), que é convertida à forma ativa pela ação de proteases presentes no intestino médio dos

insetos susceptíveis, sendo que o fragmento da toxina ativa pode variar, dependendo da proteína Cry, entre 60 e 70 kDa (Rukmini *et al.*, 2000). Essas toxinas ativas interagem com receptores presentes nas células do epitélio do intestino médio dos insetos susceptíveis e levam à formação de poros nas mesmas, causando um desequilíbrio no balanço osmótico destas células. Este evento causa a paralisação na alimentação e posteriormente a morte dos insetos susceptíveis (De Maagd *et al.*, 2003).

Mesmo sendo usados como biopesticidas há mais de meio século e com evidências de causar menos impacto ao meio ambiente do que os inseticidas químicos de uso convencional, por serem altamente específicos aos organismos susceptíveis, sendo inócuos a outros organismos não-alvos, como os seres humanos, os produtos a base de *Bt* nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de vendas de inseticidas, principalmente por não ser um produto sistêmico e a sua degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (Burgess & Jones, 1998). No entanto, a utilização de *Bt* como agente de controle biológico tem aumentado cada vez mais, em nível mundial, nas últimas décadas, e a busca de estirpes que produzam novas toxinas está em andamento no mundo todo com o objetivo de oferecer uma alternativa para o controle de insetos-praga em cultivos economicamente importantes, no controle de vetores de doenças humanas e de animais (Bobrowski *et al.*, 2003; Schnepf, 1998).

Com o descobrimento de proteínas de *Bt* com atividade tóxica elevada a diferentes insetos-praga, o aumento das perspectivas do uso desta bactéria e de suas proteínas inseticidas tornou-se realidade. Essas proteínas podem ser expressas em plantas, permitindo a expressão contínua das proteínas no tecido vegetal e atingindo, assim, apenas os insetos-praga susceptíveis que se alimentam dos tecidos vegetais (De Maagd *et al.*, 1999). Além disso, a expressão das proteínas Cry isoladas permite estudar sinergismos e antagonismo entre elas. Desse modo, neste trabalho, nossos objetivos foram caracterizar genes *cry* de cepas de *B. thuringiensis* codificando proteínas com alta

toxicidade para insetos alvos (lepidópteros e coleópteros) e expressar estes genes utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto. Além disso, a partir das proteínas semi-purificadas analisamos a toxicidade dessas proteínas recombinantes contra larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis*.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

*Bt* é uma bactéria de solo, aeróbia, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas durante a fase de esporulação (Fig. 1), durante a fase estacionária do ciclo de crescimento. É uma bactéria de ocorrência ubíqua (Krywunczyk & Fast, 1980), em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Miralles & Pérez, 2004).

*Bt* foi isolado, pela primeira vez, a partir de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho da seda) (Lepidoptera: Bombycidae) e descrita em 1901 pelo bacteriologista Ishiwata. Uma década depois, foi isolado um organismo similar, a partir de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) no distrito de Thuringia, Alemanha, e o denominou de *Bt*, esta bactéria pode ser sistematicamente classificada como: Classe: Firmibacteria; Ordem: Eubacteriales; Família: Bacilaceae; Gênero: *Bacillus*; Espécie: *B. thuringiensis*.

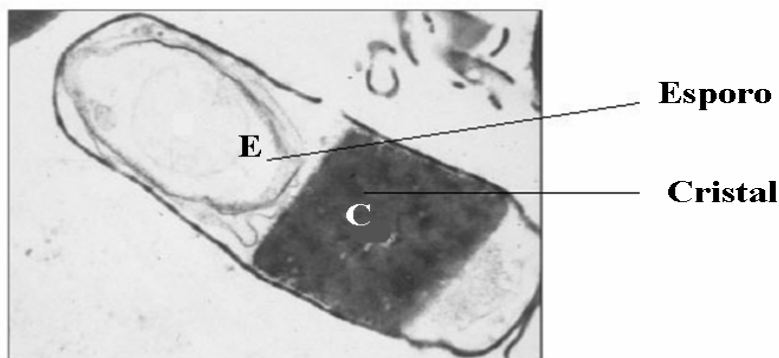


Figura 1. Fotomicrografia de uma célula de *Bt* mostrando: cristais(c) e esporos (e)

(adaptado de De Maagd *et al.*, 2001).

Embora o termo *Bacillus thuringiensis* geralmente seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pode denominar um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*). *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (Luthy & Wolfersberger, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase, embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (Lysenko, 1983). Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolípidios, comparação da sequência 16S rRNA, entre outros, mostram que estas duas espécies são, na verdade, somente uma. Esta semelhança é devida à transferência de plasmídeos que codificam as proteínas Cry de *Bt* para *B. cereus* e, por outro lado, *Bt* pode perder a capacidade de produzir estas toxinas, tornando-se *B. cereus*. Portanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Glare & O'Callaghan, 2000; Hansen & Salamitou, 2000; Schnepf *et al.*, 1998)

## **2.2. Toxinas produzidas por *Bt***

*Bt* pode produzir várias proteínas com atividade inseticida como a  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamitou, 2000). Por outro lado, estudos têm demonstrado que o esporo também pode contribuir para a patogenicidade, através da ação sinérgica com as proteínas Cry (Johnson e McGaughey, 1996).

### 2.3. As proteínas Cry ( $\delta$ -endotoxinas)

As proteínas Cry, individualmente, apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma ordem de insetos em particular (De Maagd *et al.*, 2001). A análise dos cristais protéicos por microscopia de contraste de fase e do perfil eletroforético pode dar uma idéia inicial do espectro de ação (Valadares-Ingliš *et al.*, 1998).

A estrutura determinada por difração de raios X da porção tóxica das proteínas Cry3A (Li *et al.*, 1991) e Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), revelaram que estas moléculas estão organizadas em três domínios (Fig. 2). O domínio I (Cry 3A, resíduos 58 a 290; Cry1Aa, resíduos 33 a 253) é constituído por seis  $\alpha$ -helices anfipáticas que rodeiam uma  $\alpha$ -helice hidrofóbica. Domínio II (Cry 3A, resíduos 291 a 500; Cry1Aa, resíduos 265 a 461) sendo formado por  $\alpha$ -helices curtas e três "folhas  $\beta$ "-antiparalelas e o domínio III (Cry 3A, resíduos 501 a 644; Cry1Aa, resíduos 463 a 609), que é formado de "folhas  $\beta$ "-pregueadas, dispendo-se uma sobre a outra.

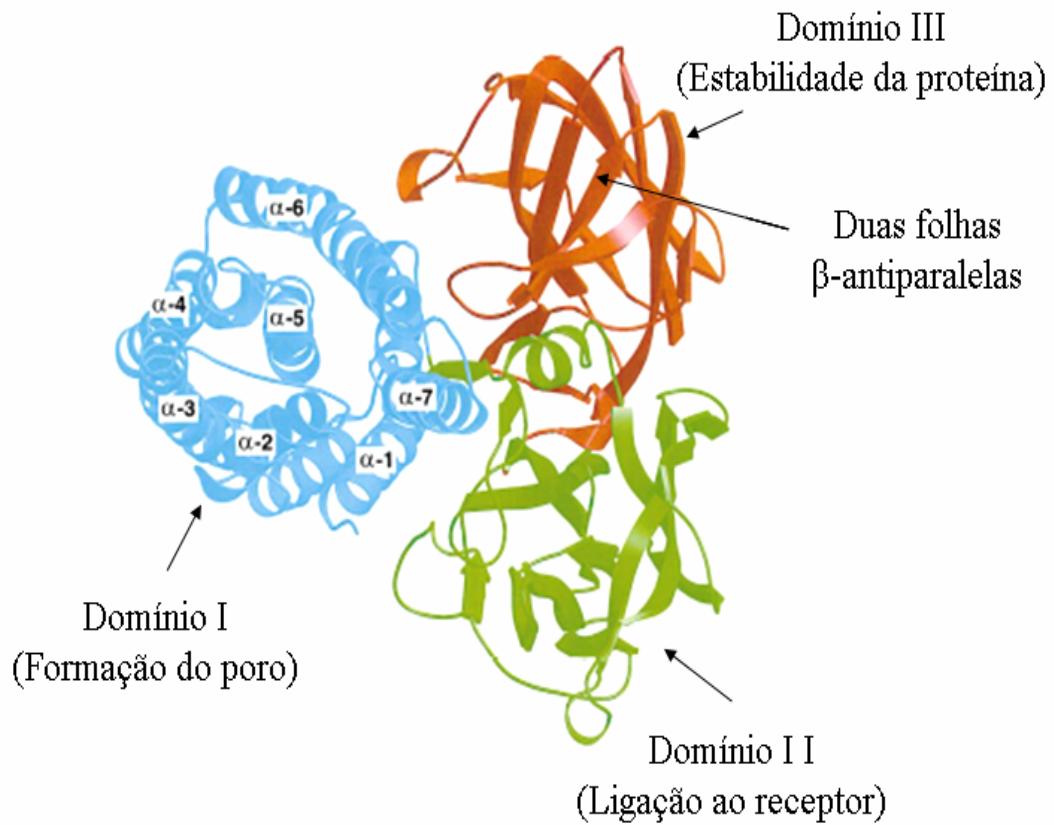


Figura 2. Representação esquemática da toxina Cry3A (baseada na estrutura de Li *et al.*, 1991). Os três domínios estão indicados em cores diferentes. O domínio I (azul) compreende sete  $\alpha$ -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II (verde) está relacionado com a ligação a receptores de membrana. Este domínio é formado por três folhas  $\beta$ -antiparalelas terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III (vermelho) corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas  $\beta$ -antiparalelas, formando um  $\beta$ -sanduíche e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural. (Adaptado de Aronson & Shai, 2001)

As toxinas Cry apresentam cinco blocos de seqüências conservadas, 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, o que também permite dizer que as proteínas Cry formam uma família com blocos similares e mecanismos de ação destas são muito semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000). Na Figura 3, são apresentados os grupos da família dessas toxinas, organizados de acordo com a identidade e homologia das seqüências. 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). O terceiro grupo é formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, constituído pelo bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2, mas existindo significativa homologia com os outros blocos conservados (Lereclus *et al.*, 1989).

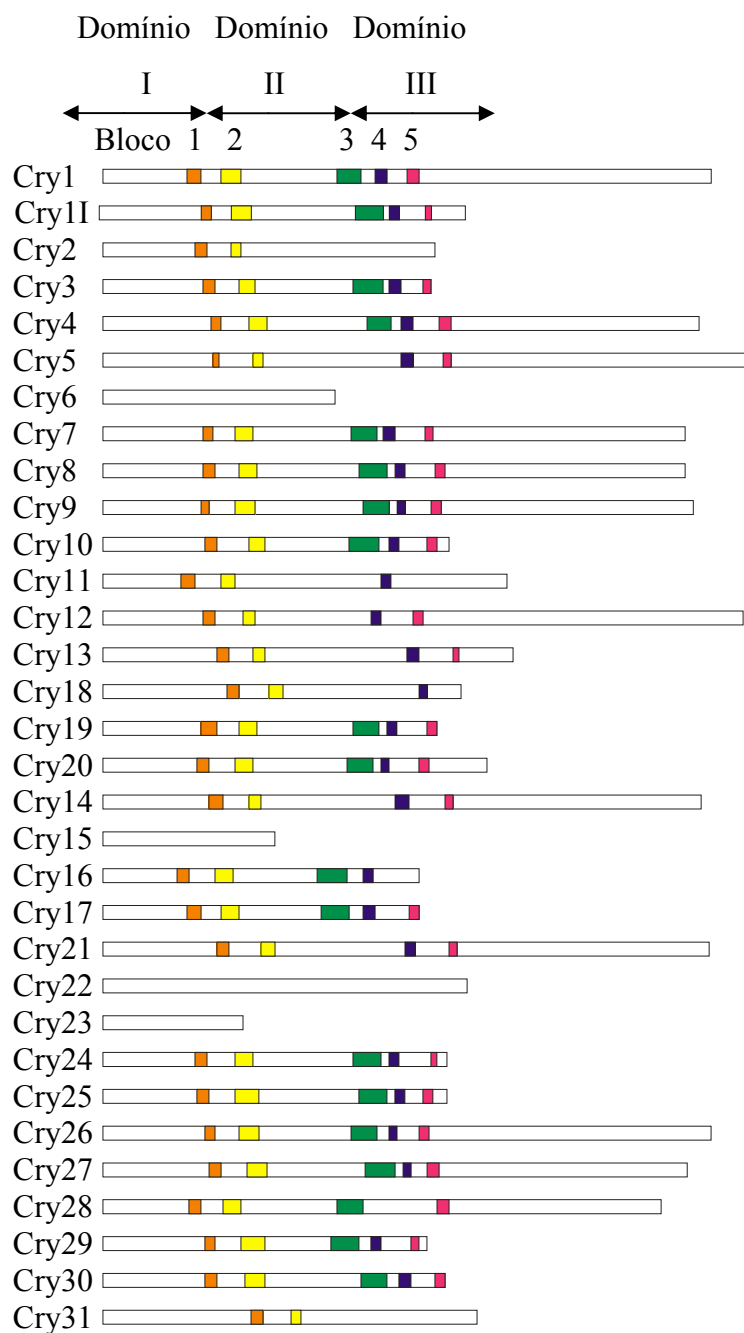


Figura 3. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Os retângulos coloridos correspondem às seqüências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa (adaptada de De Maagd *et al.*, 2001).

#### **2.4. Número de cópias de genes *cry* ocorridas no DNA plasmidial de *Bt***

O número de cópias dos genes *cry* presente em uma determinada cepa de *Bt* pode influenciar de maneira significativa na quantidade final da proteína produzida pela bactéria. Os genes que codificam as proteínas se encontram localizados em plasmídeos de alta massa molecular com um alto nível de replicação, que possuem uma ou várias cópias do mesmo gene *cry* (Sanchis *et al.*, 1998). O número de cópias de um mesmo gene, que pode co-existir em uma linhagem de *Bt* sem que se altere a fisiologia da bactéria pode ser de 5 a 15 (Arantes & Lereclus, 1991). Com isto, a bactéria assegura uma alta taxa de produção da toxina. Este efeito pode ser explicado devido à presença dos fatores sigma que estão envolvidos na seleção do sítio dos promotores para a transcrição dos genes *cry* (Aronson, 1993).

#### **2.5. Regulação transcricional dos genes *cry* e esporulação em *Bt***

Existe, na maioria das proteínas de *Bt*, uma relação estreita entre a fase de esporulação e o início da formação dos cristais no espaço parasporal. Sendo assim, mecanismos genéticos que estão envolvidos no ciclo de vida da bactéria e o processo de produção destas proteínas são descritos a seguir.

A esporulação é um mecanismo de reposta das células de *Bt* a condições de vida desfavoráveis, cuja finalidade é produzir uma forma de resistência ao ambiente adverso ao seu desenvolvimento. Os diferentes mecanismos que regulam a esporulação têm sido estudados principalmente em *B. subtilis*, uma espécie semelhante à *Bt*. De modo que, os estudos morfológicos e genéticos têm alta similaridade entre ao mecanismo de esporulação entre estas duas espécies (Driks, 2002).

O processo de esporulação quando é induzido, tem uma duração em média de 6 a 8 h e conduz uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas (Errington, 1993), que determinam a produção de dois compartimentos bem definidos na célula. O esporângio, onde ocorre a formação do esporo bacteriano e no segundo compartimento, ocorre a formação dos cristais das proteínas Cry. Neste processo participam mais de 125 genes diferentes, cuja transcrição tem regulação espacial e temporal por sucessivas substituições dos fatores sigmas, que são responsáveis por responder às alterações ambientais, junto com a RNA-polimerase para reconhecimento de novas classes de genes (Stratiger & Losick, 1996).

### **2.5.1. Mudanças morfológicas ocorridas durante a fase de esporulação**

No início da esporulação, oito etapas bem definidas na morfologia da célula de *Bt* e outros membros do gênero de *Bacillus* são reconhecidas (Fig. 4). Durante a primeira etapa (Estádio I), a célula deixa de crescer devido à falta de nutrientes do meio e ocorre a replicação do DNA. A segunda etapa (Estádio II) se distingue pela formação do septo, gerando dois compartimentos independentes: a célula-mãe e o pré-esporo (Péres, 2004). À medida que o processo de esporulação avança, ocorre a formação de pré-esporo livre com membrana interna e externa dentro da célula mãe. O início da visualização da formação do cristal das proteínas Cry só ocorre a partir do estágio III. Durante o estágio IV surge a parede primodial da célula, onde se forma um córtex entre a membrana interna e externa. É possível visualizar a refractabilidade da célula em microscópio de contraste de fase. Na fase seguinte (Estádio V), se forma uma capa de cobertura do esporo, a qual é rodeada completamente por exósporo. No estágio VI, a formação do esporo termina e o cristal atinge o tamanho máximo. A etapa final permite



a liberação dos esporos graças à lise da célula-mãe (Estádio VII) (Errington, 1992; Errington, 2003; Stratiger & Losick, 1996).

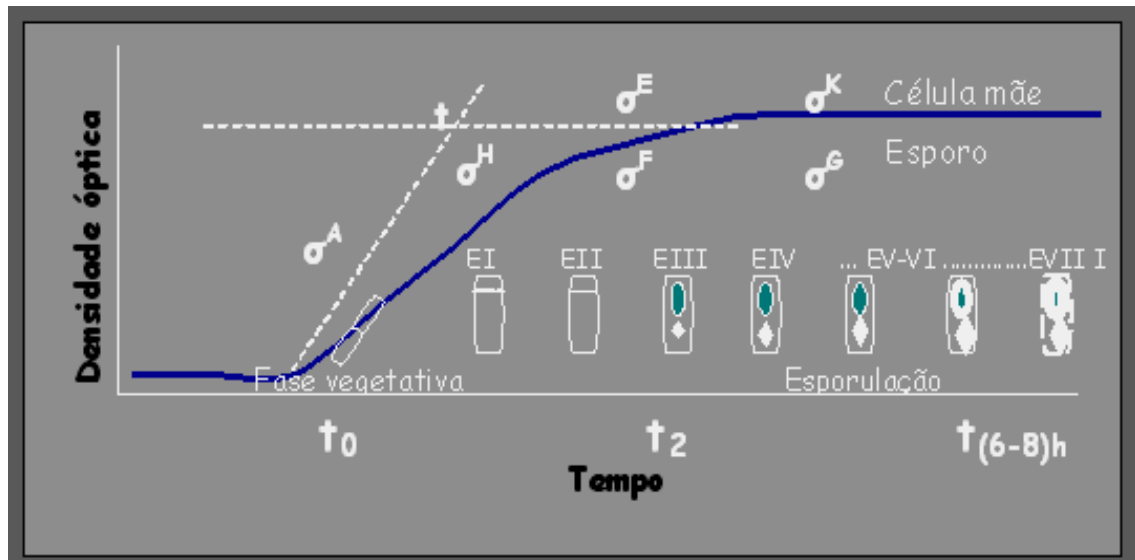


Figura 4. Esquema de eventos morfológicos e genéticos ocorridos durante a fase de esporulação de *B.t.* Os diferentes fatores sigma ( $\sigma^A, \sigma^H, \sigma^E, \sigma^F, \sigma^K, \sigma^G$ ) na célula mãe estão correlacionados com a curva de crescimento da bactéria. Os diferentes estádios da fase de esporulação de *Bt* são: estágio I (EI), II (EII), III (EIII), IV (EIV), V (EV), VI (EVI) e os VII e VIII (EVII e EVIII), e ocorrem em função do tempo  $T_0, T_2$  e  $T(6-8)$  horas (Pérez, 2004).

### 2.5.2. Alterações genéticas ocorridas durante a fase de esporulação

As modificações genéticas ocorridas no momento da esporulação são mais complexas do que as mudanças morfológicas, sendo muitas etapas ainda desconhecidas. Atualmente, são conhecidos mais de cem genes envolvidos no processo de esporulação, que devem ser ativados em momentos precisos e no compartimento subcelular correto. Esta regulação genética é devida, principalmente, à ativação seqüencial dos fatores sigma e menos relacionada com ativadores de repressores protéicos. Existem em *Bt*, seis fatores sigma principais (Fig. 4). Sendo que o fator sigma  $\sigma^A$  está presente somente na fase vegetativa, enquanto outros fatores  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^G$  e  $\sigma^K$ , estão presentes durante a fase de esporulação, que são responsáveis pelo reconhecimento dos promotores dos genes *cry*. Outro fator sigma menos importante é o fator sigma  $\sigma^H$ , o qual foi identificado entre a fase de transição da bactéria, no momento que inicia a fase de esporulação (Fig. 4). Desta maneira, todos os genes expressos antes da fase II da esporulação são reconhecidos pelos fatores sigmas  $\sigma^A$  e  $\sigma^H$ . Sendo os fatores sigmas  $\sigma^E$  e  $\sigma^F$ , os responsáveis pela transcrição a partir da fase de esporulação II até a fase de esporulação V, aproximadamente cinco horas após o início da esporulação. Em seguida, os fatores sigma  $\sigma^G$  e  $\sigma^K$  são responsáveis pela formação do esporângio e pré-esporos, respectivamente e vai até a fase final da esporulação. Sendo que cada um dos fatores sigma da esporulação são responsáveis pela regulação da expressão de um grupo de genes durante uma fase de desenvolvimento da bactéria (Errington, 1992; 1993; Stratiger & Losick, 1996; Pérez, 2004). A análise da seqüência dos promotores dos genes regulados pelos fatores sigmas tem permitido a determinação das seqüências para cada um deles (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência dos promotores estabelecida para diferentes fatores sigmas de *B. subtilis* (segundo Pérez, 2004).

<b>Fator sigma</b>	<b>Região -35</b>	<b>Separação</b>	<b>Região -10</b>
$\sigma^A$	TTGACA	17-18 pb	TATAAT
$\sigma^E$	GTNATA	16-17 pb	ATACAAT
$\sigma^F$	TGCATN	17-18 pb	NANANT
$\sigma^G$	TGAATA	17-18 pb	CATACTA
$\sigma^K$	GTCACA	15-16 pb	CATAANATA

Região -35 e Região -10 correspondem à região promotora de *Bt* que são reconhecidas pelos respectivos fatores sigmas, onde começa o início da transcrição.

### 2.5.3. Genes de *Bt* dependentes da fase de esporulação

As primeiras observações efetuadas em microscopia eletrônica com a finalidade de observar a fase de esporulação em *Bt* permitiram demonstrar que a produção dos cristais se inicia a partir da fase III da esporulação. No entanto, estudos das seqüências dos genes que contêm os promotores fusionados com genes *lac-Z* de *Escherichia coli*, assim como, mutantes de *Bt* defectivos na esporulação, têm permitido o reconhecimento dos fatores sigmas envolvidos na transcrição de vários genes desta bactéria. Desta forma, foi possível comprovar que a maioria dos genes *cry* estudados são regulados pelo fator sigma  $\sigma^E$ . Existem outros genes *cry* que são transcritos na fase II da esporulação, tais como: *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cryIIA*, sendo reconhecidos pelos fatores sigma  $\sigma^E$  e  $\sigma^H$ . (Bravo *et al.*, 1996; Pérez, 2004).

#### 2.5.4. Genes *cry* de *Bt* independentes da fase de esporulação

Os genes *cry* independentes da fase de esporulação são, em função de seus promotores, reconhecidos por diferentes fatores sigma ativos na fase vegetativa e de esporulação. O gene *cry3A* representa um exemplo típico de genes *cry* não dependente da esporulação. Este gene é expresso durante a fase vegetativa da célula, porém de uma maneira menos intensa que na fase estacionária (De-Souza *et al.*, 1993; Pérez, 2004). Embora o promotor do gene *cry3A* seja fraco, este é significativamente ativo durante a fase vegetativa, diferentemente do promotor *cryIAa* que é ativo no final de crescimento exponencial, sendo expresso de  $t_0$  a  $t_{10}$ , durante a fase estacionária (Lereclus *et al.*, 2000). Ao contrário dos promotores BTI (reconhecido pelo fator sigma do tipo  $\sigma^E$ ) e BTII (reconhecido pelo fator sigma do tipo  $\sigma^K$ ) todos da fase de esporulação de *Bt*, o promotor de *cry3A* assemelha-se aos promotores reconhecidos pelo fator sigma  $\sigma^A$  da fase vegetativa da bactéria. Análise gênica de *Bt* (Salamitou *et al.*, 1996; Pérez, 2004) e *B. subtilis* (Agaisse & Lereclus, 1994), mostra que a transcrição do gene *cry3A* é dependente dos fatores sigma  $\sigma^A$  na fase vegetativa, e continua sendo transcrito pelo fator sigma  $\sigma^H$  durante a fase de esporulação, além de ter sua transcrição aumentada em um mutante incapaz de iniciar a esporulação (Lereclus *et al.*, 1995). A ativação da transcrição de *cry3A*, na fase estacionária, deve-se a um mecanismo independente da esporulação ainda não caracterizado (Lereclus *et al.*, 2000).

## **2.6. Mecanismo de ação das proteínas Cry produzidas por *Bt***

Os sintomas observados quando as larvas dos insetos susceptíveis consomem os cristais e esporos de *Bt* são: paralisia do intestino, regurgitação e finalmente a morte (Aronson *et al.*, 2001). Estudos histopatológicos têm mostrado que as células colunares do intestino médio são afetadas inicialmente e suas microvilosidades apicais, são praticamente destruídas (Bravo *et al.*, 1992). Os mecanismos de ação das proteínas Cry, no intestino de insetos susceptíveis, serão descritos abaixo.

### **2.6.1. Solubilização e processamento das toxinas**

Os cristais produzidos por *Bt*, ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas Cry. O intestino médio da maioria das larvas dos insetos-alvo apresenta um pH em torno de 9,5 (Knowles, 1994). Para serem ativadas, as pro-toxinas precisam ser processadas pelas proteases intestinais das larvas dos insetos, liberando os polipeptídios tóxicos. Portanto, ao serem ativadas por proteases intestinais, as pro-toxinas perdem a extremidade C-terminal, restando-lhes a porção N-terminal como parte ativa (fragmento tóxico) (Monnerat e Bravo, 2000). Parte da extremidade N-terminal pode ser clivada pela ação de metaloproteases sintetizadas pela própria bactéria durante a esporulação (Rukmini *et al.*, 2000). A combinação de toxinas proteoliticamente ativadas possui um papel importante na determinação na especificidade aos insetos. Pode-se citar, por exemplo, o caso da toxina Cry1Ab da subsp. *aizawai* de *Bt*, que é tóxica para lepidópteros, como *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pyralidae), e quando processada com tripsina, e tóxica para dípteros, como por exemplo, *Aedes aegypti*, quando tratada com suco gástrico desse mosquito (Haider & Ellar, 1989).

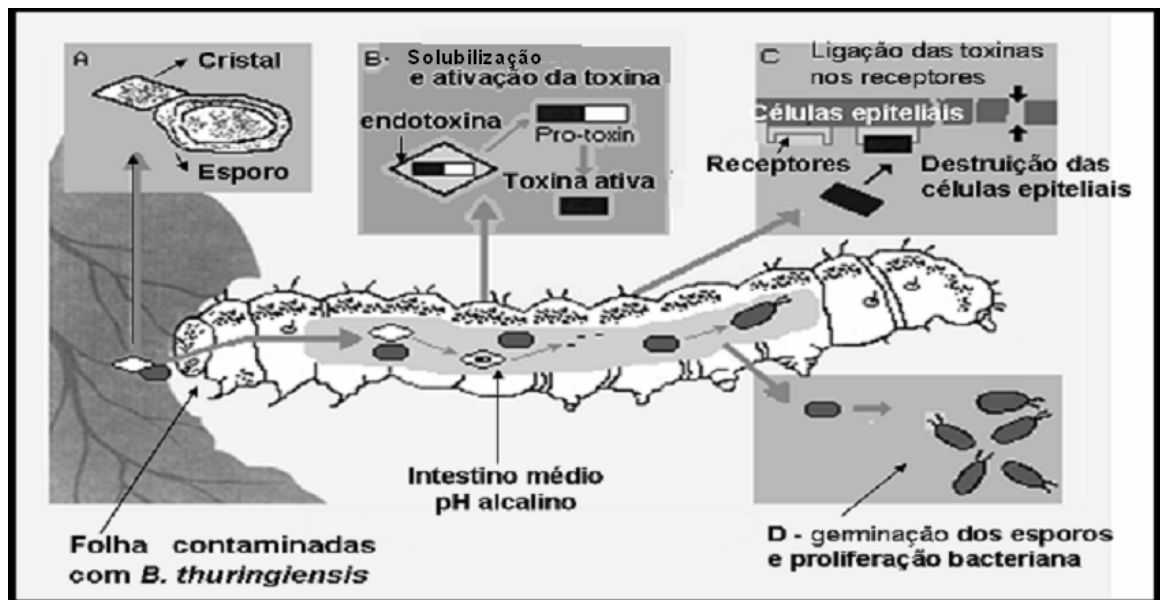


Figura 5. Esquema representativo do modo de ação das proteínas Cry de *Bt*. **A** – Ingestão de cristais toxinas Cry e esporos de *Bt* por uma larva susceptível **B** - Cristais são dissolvidos no intestino médio em pH alcalino, ocorrendo a liberação da pro-toxina e posteriormente a ativação da toxina pelas proteases presente no intestino médio. **C** – Ligação da toxina aos receptores e destruição das células epiteliais do intestino médio e **D** – Germinação dos esporos e proliferação da bactéria. Esquema adaptado a partir do site [www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm)

### 2.6.2. União ao receptor

Foi demonstrado que as proteínas Cry, após serem ativadas por proteases do intestino médio, ligam-se a receptores específicos e localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino dos insetos suscetíveis das ordens Lepidoptera (Hoffmann *et al*, 1988), Coleoptera (Bravo *et al*, 1992) e Diptera (Höfte & Whiteley, 1989; Ravoahangimalala *et al*, 1993).

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). A maior parte dos estudos tem sido conduzidos com larvas de lepidópteros e com as toxinas do tipo Cry1 (Pietrantonio & Gill, 1996), mas existem alguns estudos, também, com a toxina Cry3A e larvas do coleóptero *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Belfiore *et al*, 1994).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana das microvilosidades apicais dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hoffman *et al*, 1988; Van Rie *et al*, 1989). O primeiro passo envolve a ligação específica entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schenepf *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).

As regiões da toxina Cry3A que interagem com o receptor se localizam nos domínios II e III. Estas regiões foram identificadas por meio de análises de mutantes sítios dirigidos. Foi determinado que as quatro regiões proeminentes nesta interação sejam as alças 8 e 1 (entre  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ), 2 (entre  $\beta 6$  e  $\beta 7$ ) e 3 (entre  $\beta 10$  e  $\beta 11$ ) (Li *et al.*, 1991; Monnerat & Bravo, 2000).

De acordo com Monnerat & Bravo (2000), a mutagênese do domínio II pode gerar proteínas com maior afinidade para o receptor que, por sua vez, pode apresentar maior toxicidade. Um exemplo disto é o caso da toxina mutante Cry1Ab N372A-A282G-L283S. Este mutante apresentou uma afinidade dezoito vezes maior e passou a ser 36 vezes mais tóxica do que a toxina selvagem para *Lymantria dispar* (Rajamohan *et al*, 1996; 1998). Este dado demonstra que é possível haver toxinas mais efetivas, que possibilitam um aumento do espectro de ação das toxinas Cry através de mutagênese, o qual tem um grande impacto biotecnológico para a

produção de melhores bioinseticidas (Scheneopf *et al.*, 1998).

O domínio III também participa da determinação da especificidade (Caramori *et al.*, 1991). A construção de proteínas quiméricas entre Cry1C e Cry1Ea mostrou que o domínio III da primeira é determinante para a especificidade a *S. exigua* e *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) (Bosch *et al.*, 1994; De Maagd *et al.*, 2001).

Os receptores para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1C nas células colunares do intestino de insetos susceptíveis são membros da família das aminopeptidases do tipo N, com massa molecular em torno de 120 kDa. Para a toxina Cry1Ab em *Manduca sexta*, foi demonstrado que esta toxina além de se unir a um membro da família das caderinas com massa molecular de 210 kDa, une-se também a uma aminopeptidase N com massa molecular entre 120 e 106 kDa (Vadlamudi *et al.*, 1995; Denolf *et al.*, 1997). Em outros trabalhos verificou-se que essas proteínas podem interagir com GPI (Glycosylphosphatidyl –inositol) ancorado com a fosfatase alcalina (PAL), sendo também verificado a interação com glycoconjugado de aproximadamente 270 KDa (Bravo *et al.*, 2007).

### **2.6.3. Inserção na membrana, agregação e formação do poro e citólise**

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 susceptíveis (Van Rie *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Scheneopf *et al.*, 1998). Foi demonstrado que doses micromolares das proteínas Cry são capazes de interagir com membranas lipídicas artificiais e de inserir-se nas



mesmas, formando canais permeáveis principalmente a cátions (Scheneopf *et al*, 1998) e também a ânions e solutos neutros (Scheneopf *et al*, 1998; Haider & Ellar, 1989), com diâmetro em torno de 1 a 2 nm (Knowles & Ellar, 1987).

As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho, isto por sua vez causa alteração da permeabilidade da membrana e tem como consequência final, a destruição do epitélio intestinal (Wolfersberg, 1996,1995). Uma vez que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *Bt* têm acesso à hemolinfa (Du & Nickerson, 1996), meio 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 (Monnerat & Bravo, 2000).

Estudos recentes demonstraram que a toxina Cry1Ab para se ligar e formar poros nas células colunares do intestino médio de *M. sexta* (linhagem Bt-R<sub>1</sub>), ela sofre uma clivagem proteolítica adicional na porção N- terminal, assim como, para  $\alpha$ -helice1 do domínio I. desse modo, facilita a formação de uma estrutura oligomérica pré- poro que facilita a inserção dentro da membrana das célula colunares, sendo importante para a para a toxicidade da toxina. A formação de estrutura oligomérica tem sido demonstrada para outras toxinas proteínas tais como: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa e Cry3. A formação da estrutura oligomérica das toxinas está correlacionada com a formação do poro. Desta forma, a formação de oligômeros é um passo necessário no mecanismo de ação das toxinas Cry (Bravo et al., 2007).

## 2.7. Principais classes de proteínas Cry produzidas por *Bt*

A primeira classificação para *Bt* foi proposta por De Barjac & Bonnefoi (1962). Esta era baseada em propriedades bioquímicas e na aglutinação de antígenos flagelares (antígenos H) das células vegetativas. Essa classificação proporcionou uma considerável ordenação aos isolados de *Bt*, que passaram a serem agrupados em subespécies.

A primeira classificação das proteínas Cry foi proposta por Hofte e Whiteley (1989), sendo baseada nas seqüências dos aminoácidos e no espectro de ação das toxinas contra os insetos das principais ordens (CryI – Lepidoptera, CryII – Lepidoptera e Diptera, CryIII – Coleoptera e CryIV – Diptera). Posteriormente, Feitelson et al (1992) propôs mais dois grupos CryV e CryVI, que apresentavam atividade para nematóides. No entanto, com a descoberta de novas proteínas e a alta homologia com grupos já existente e com especificidade diferentes, ou mesmo com atividade tóxica dupla contra insetos de duas ordens diferentes, foi necessário estabelecer uma nova nomenclatura para as proteínas Cry.

Em 1994, um comitê internacional, propôs uma nova nomenclatura baseada apenas nas seqüências de aminoácidos, sendo estabelecida em 1998 por Crickmore et al (1998), disponível no site [www.biols.sysx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.biols.sysx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt). Nesta nova nomenclatura, os números romanos foram substituídos por números arábicos e os parênteses removidos. Desse modo, atualmente, mais de 350 genes *cry* foram seqüenciados e as proteínas Cry classificadas em 51 grupos e em diferentes subgrupos (Tabela -2).

Tabela 2 – Classificação das classes e subgrupos das proteínas Cry de *B. thuringiensis* proposta pelo comitê internacional de 1994, baseado nas seqüências dos aminoácidos.

Classe da toxina	Subgrupos	Forma do Cristal	Massa Molecular	Organismos Susceptíveis (Ordem)	Referências
Cry1	38	Bipiramidais	130 -134 kDa	Lepidoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry1Ab		Bipiramidais	130 kDa	Diptero/Lepidoptera	Smith <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ca		Bipiramidais	130 kDa	Diptero/Lepidoptera	Bradley <i>et al.</i> , 1995
Cry1B		Bipiramidais	130 kDa	Lepidoptera/ Coleoptera	Bradley <i>et al.</i> , 1995
Cry2Aa	5	Cubóide	70 - 71 kDa	Diptera/Lepidoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry2Ab		Cubóide	70 - 71 kDa	Lepidoptera	Lereclus <i>et al.</i> , 1989
Cry2Ac		Cubóide	70 - 71 kDa	Lepidoptera	Lereclus <i>et al.</i> , 1989
Cry3	4	Romboides	73 a 75 kDa	Coleoptera	Lambert <i>et al.</i> , 1992
Cry4	2	Ovoídes	128-135 kDa	Diptera	Lereclus <i>et al.</i> , 1989
Cry5	4	-	135 – 152 kDa	Himenoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry6	2	-	44 - 54kDa	Nematóides/ Acari	Monnerat & Bravo, 2000
Cry7	2	-	129 - 130 kDa	Coleoptera	Monnerat & Bravo, 2000
Cry8	9	-	131-134 kDa	Coleoptera/ Hemiptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry9	8	-	130 -132 kDa	Lepidoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry10	1	ovóides	78 kDa	Diptera	Thorne <i>et al.</i> , 1986
Cry11	3	ovóides	72 kDa	Diptera	Delecluse <i>et al.</i> , 1995
Cry12	1	-	142 kDa	Nematóides	Monnerat & Bravo, 2000
Cry13	1	-	88kDa	Nematóides	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry14	1	-	132 kDa	Diptera/ Coleoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry15	1	-	34 kDa	Lepidoptera	Brown & Whiteley, 1992
Cry16/Cry17	1	-	71 e 72 kDa	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry18	3	-	79 kDa	Coleoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry19	2	-	75 kDa	Diptera	Rosso & Delecluse, 1997

Continuação na próxima pagina...

Continuação da tabela 2...

Tabela 2. Classificação das classes e subgrupos das proteínas Cry de *B. thuringiensis* proposta pelo comitê internacional de 1994, baseado nas seqüências dos aminoácidos.

Cry20	1	-	86 kDa	Diptera	Lee <i>et al.</i> , 1997
Cry21	2	-	79kDa	Nematóides/ Himenoptero	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry22	3	-	79kDa	Himenoptero	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry23/Cry24	3	-	-	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry25	1	-	76 kDa	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry27A	1	-	94 kDa	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry26Aa e Cry28Aa	1	-	-	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry29	1	-	84 kDa	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry30	1	-	88 kDa	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry31	1	-	-	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2002
Cry34	1	-	14 kDa	Coleoptera	Ellis <i>et al.</i> , 2002
Cry35	1	-	44 kDa	Coleoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry36	1	-	44 kDa	Coleoptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry37	1	-	-	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry39/Cry40	2	-	-	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry41	2	-	88 kDa	Sem atividade conhecida	Yamashita <i>et al.</i> , 2005
Cry42	1	-	70 kDa	Sem atividade conhecida	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry43	4	-	30 kDa	Sem atividade conhecida	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004
Cry44	1	-	-	Sem atividade conhecida	Ito <i>et al.</i> , 2006
Cry45	1	-	-	Sem atividade conhecida	Okumura <i>et al.</i> , 2006
Cry46	2	-	30 kDa	Sem atividade conhecida	Ito <i>et al.</i> , 2004
Cry47		-	-	Diptera	Kongsuwan <i>et al.</i> , 2005
Cry48		-	-	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry49		-	-	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry50	1	-	-	Diptera	Crickmore <i>et al.</i> , 2006
Cry51	1	-	-		Crickmore <i>et al.</i> , 2006

## 2. 8. Baculovírus como vetor de expressão de proteínas heterólogas

Baculovírus são vírus que infectam insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Os baculovírus possuem como principais características um vírion com envelope em forma de bastão e um DNA circular, dupla-fita, "supercoiled" contendo entre 90 e 200 kilobases (kb) (Arif, 1986, Maruniak *et al.*, 2004). Os baculovírus pertencem à família Baculoviridae que é dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Os dois são constituídos de vírus envoltos por uma oclusão cristalina de natureza protéica (corpo de oclusão, OB). Vale ressaltar que, a oclusão do vírus em uma proteína cristal ocorre somente em invertebrados infectados com vírus das seguintes famílias: Baculoviridae, Poxviridae (*Entomopoxvirinae*) e Reoviridae (*Cypovirus*) (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

A infecção pelo baculovírus se dá através da ingestão de alimento contendo o vírus na forma oclusa (OB). Os OB são rapidamente dissolvidos em um pH altamente alcalino no intestino médio de uma larva de um inseto susceptível. As partículas virais são liberadas dando início à infecção das células colunares epiteliais do intestino médio (infecção primária), através da fusão dos nucleocapsídeos virais com a membrana das microvilosidades (Volkman & Keddie, 1990, Horton & Burand, 1993). Após a entrada no núcleo, o DNA viral é replicado e novos nucleocapsídeos são produzidos. Esses nucleocapsídeos são transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio e são liberados para infectar células do sistema respiratório e circulatório (Engelhard *et al.*, 1994).). Alternativamente, os vírus oriundos da dissolução dos OB entram na célula colunar e a atravessam para infetar as células do sistema traqueal ou hemolinfa (Barrett *et al.*, 1998). A replicação do *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) é caracterizada pela produção de duas formas virais.

Primeiro, o vírus extracelular ou "budded virus" (BV) é produzido por volta de 12 a 24 h após a infecção. Os BV são caracterizados pela presença de um nucleocapsídeo simples envoltos por envelopes frouxos, derivados da membrana plasmática, contendo ainda projeções na superfície compostas da proteína GP64 (Granados *et al.*, 1986). Os BV produzidos são responsáveis por disseminar a infecção a outras células. Segundo, o vírus ocluso (OB) é produzido bem mais tarde no núcleo da célula, continuando até a morte celular por volta de 72 h após a infecção (Granados & Williams, 1986). A oclusão dos vírus em uma matriz protéica é importante para garantir a proteção das partículas infectivas na transmissão dos vírus de inseto para inseto, permitindo aos baculovírus resistirem às condições ambientais fora do hospedeiro (Figura 6).

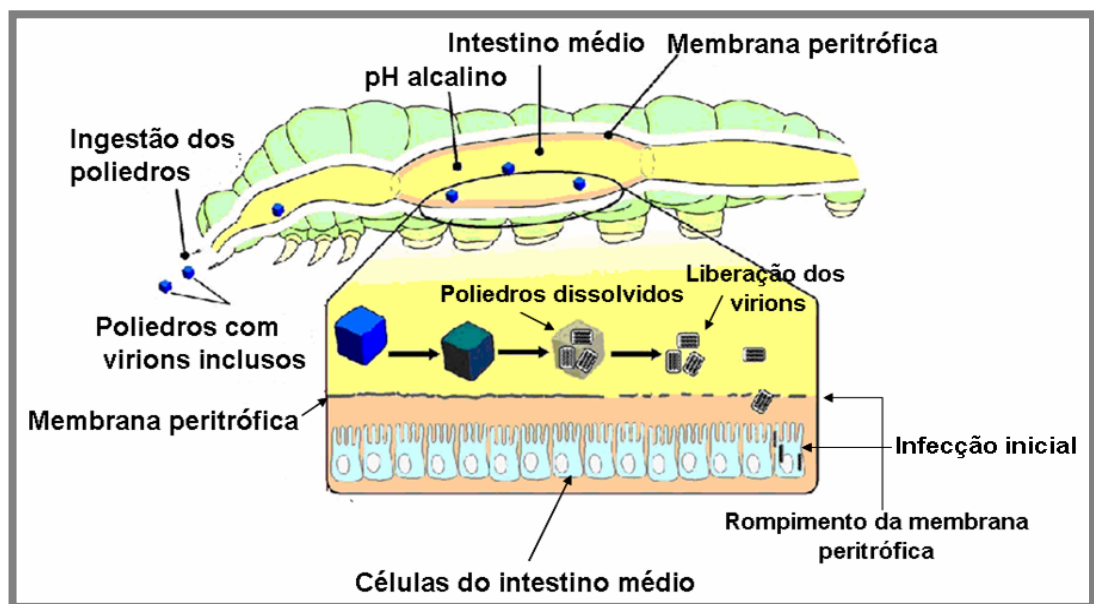


Figura 6. Esquema da infecção primária desenvolvida pelo baculovírus em insetos susceptíveis. A figura mostra desde a ingestão dos poliedros pelos insetos até o início da infecção das células do intestino médio (Adaptada de Kalmakoff & Ward, 2003).

Nos últimos anos, os baculovírus têm sido utilizados como vetores de expressão de proteínas de origem eucariótica e procariótica (Luckow & Summer, 1988). Isto está relacionado à presença de promotores fortes ativados durante a infecção de células de inseto, principalmente na fase muito tardia, também conhecida como fase "very late" (VL). Esses promotores são derivados dos genes da poliedrina e da proteína P10, que estão envolvidos na formação do OB, na fase final da infecção. As proteínas recombinantes quando expressas no sistema de expressão de baculovirus, principalmente sob o comando dos promotores citados acima são, em sua grande maioria, expressas em grandes quantidades e biologicamente similares às proteínas nativas. A expressão do gene da poliedrina conduzida a partir de seu promotor produz, por volta de 70 h após a infecção, cerca de aproximadamente uma quantidade de poliedrina equivalente a 20-50% de toda proteína produzida pela célula infectada.

O genoma do baculovirus permite, por meio de recombinação homóloga, a introdução de genes exógenos com facilidade. Para que isso ocorra, os genes são inseridos dentro de vetores de transferência. Em geral esses vetores de transferência têm um promotor forte da fase "very late" do baculovirus associados a um sítio de restrição, onde o gene é introduzido. O promotor e o sítio de clonagem são franqueados por seqüências do genoma viral onde deverá ocorrer a inserção. Após a co-transfecção do DNA viral com o DNA do vetor de transferência, a recombinação ocorre entre as seqüências homólogas do vetor de transferência e do baculovírus (Fig. 7). Desse modo, a inserção do gene de interesse se dá dentro do genoma no local de interesse. Sendo assim, Existem vários sítios no genoma do baculovírus, onde genes heterólogos podem ser inseridos (O'Reilly *et al*, 1992), dependendo do vetor. Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetores de expressão foram publicados por Smith *et al*. (1983), que usaram o AcMNPV para produzir  $\beta$ -interferon e  $\beta$ -galactosidase, respectivamente em

células de *S. frugiperda*. Dentre as vantagens para utilização de baculovírus como vetores de expressão estão:

1. potencial para expressão de proteínas heterólogas em altos níveis;
2. existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção (não interferindo no ciclo viral);
3. diferentes fases na regulação gênica do ciclo viral, oferecendo oportunidade de expressão de genes heterólogos sob diferentes condições celulares;
4. capacidade para clonagem de grandes inserções;
5. eficiência na expressão de genes contínuos (sem íntrons) e cDNAs;
6. simplicidade de manipulação.

Alem do método de obtenção de baculovírus recombinantes por recombinação homóloga, existe o método de transposição *in vivo* com o uso de um transposon bacteriano que permite obter baculovirus recombinantes (Luckow, 1993). Este método consiste nos seguintes procedimentos: o gene de interesse é inserido no sítio de clonagem do vetor doador que contém o promotor da poliedrina, um sítio de multiclonagem flaqueados por regiões necessárias para transposição. O vetor é, posteriormente, usado em uma transformação de células *E. coli* DH10BAC (Invitrogen) que possuem um bacmídeo contendo um sítio de inserção de um transposon no locus da poliedrina, mais um plasmídeo ajudante ("helper"), que codifica transposases necessárias para ocorrer o evento de transposição entre o plasmídeo doador e o genoma do baculovirus inserido no bacmídeo. Após a seleção dos clones contendo o bacmídeo recombinante, o DNA do bacmídeo é purificado e usado para a transfecção de células de insetos usando lipossomos. Como o DNA do bacmídeo é infectivo, ocorre a replicação do vírus recombinante em células de inseto em cultura. Atualmente, esse



procedimento é comercializado como sistema Bac-to-Bac pela empresa Invitrogen (Figura 8).

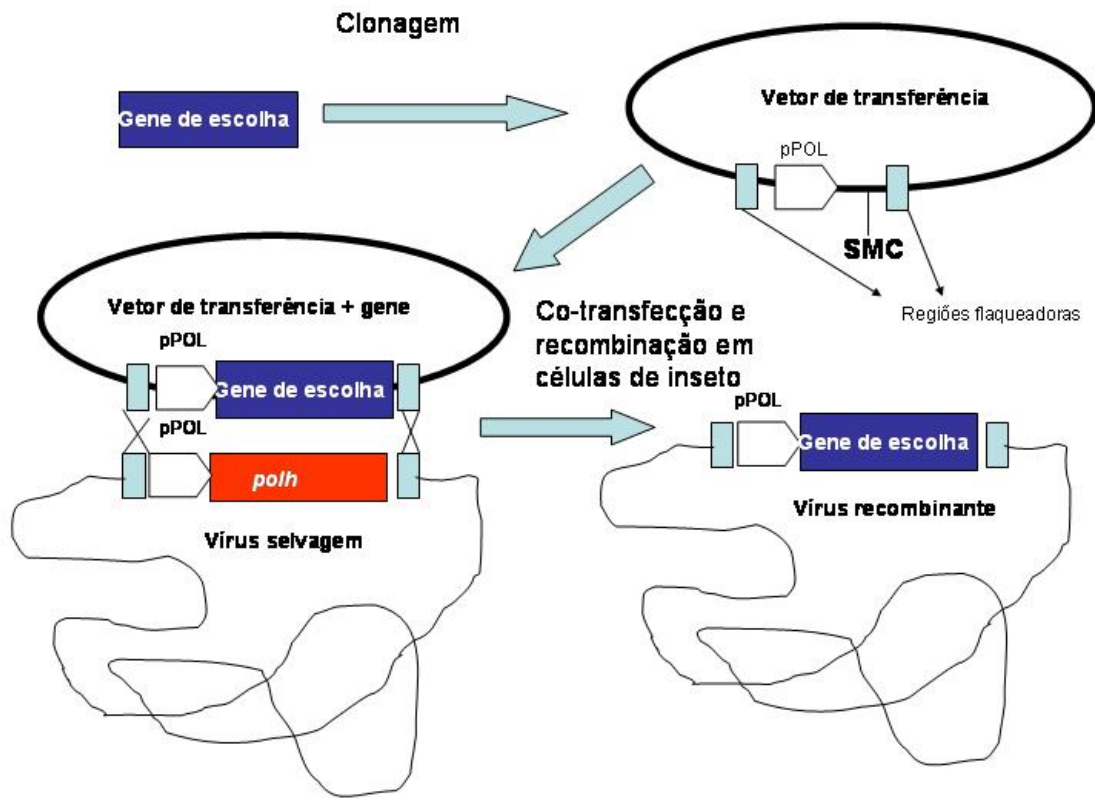


Figura 7. Construção de baculovírus recombinantes usando o sistema de recombinação homóloga. O gene de interesse é clonado em um sítio de multiclonagem (SMC) de um vetor de transferência, contendo um promotor forte de baculovírus (pPOL = promotor do gene da poliedrina, *polh*). Após a co-transfecção de células de inseto com o vetor de clonagem, contendo o gene de interesse, e o genoma de um baculovírus, ocorre a recombinação homóloga entre as regiões franqueando o gene de interesse do vetor e o gene da poliedrina (*polh*) no genoma do baculovírus.

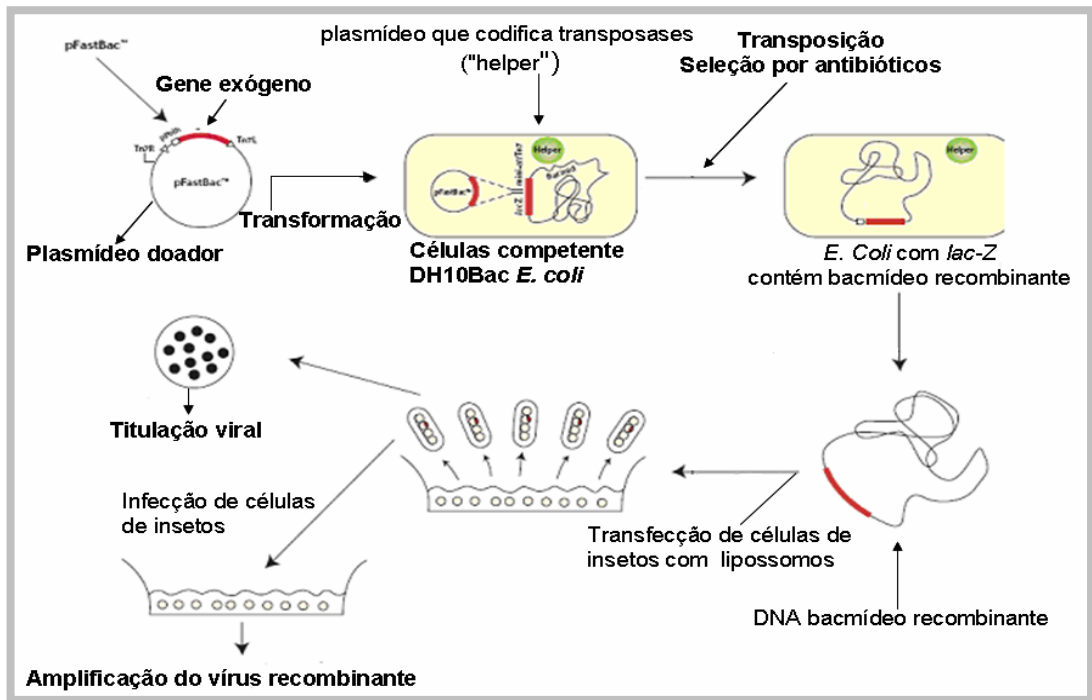


Figura 8. Esquema de construção de baculovírus recombinantes via transposição (sistema Bac-to-Bac, Invitrogen).

Outra vantagem do sistema de expressão, baseado em baculovírus, é que esses vírus não são infecciosos a vertebrados, assim, são considerados suficientemente seguros para manipulação e produção industrial de proteínas de importância biotecnológica. Analogamente, o promotor *p10*, dos baculovírus também tem sido utilizado, uma vez que, também, permite a produção de altos níveis de expressão e por não constituir o gene que codifica a proteína P10 um elemento essencial para a replicação viral (Vlak *et al.*, 1998; Weyer *et al.*, 1990). Os níveis de expressão dos genes exógenos em células de inseto, usando o sistema de expressão em baculovírus, são variáveis, o intervalo de 1 a 600 mg de proteína/litro de cultura tem sido relatado (Maiorela *et al.*, 1988; Luckow & Summers, 1988).

Alguns trabalhos, descritos na literatura, mostraram que a expressão das proteínas Cry de *Bt*, utilizando o sistema de expressão de baculovírus em células de

insetos é viável. Esses trabalhos tinham como objetivo um aumento na patogenicidade viral, pela inserção do gene da toxina bacteriana (Martens *et al.*, 1995; Merryweather *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1993, 1998). Nesses trabalhos, houve a expressão tanto da pro-toxina como várias versões truncadas da pro-toxina (Martens *et al.*, 1995; Merryweather *et al.*, 1990). Quando a toxina na forma ativa é injetada na hemolinfa do inseto, apresenta alta toxicidade aos insetos suscetíveis, semelhantes às toxinas administradas via oral nos insetos suscetíveis (Ribeiro & Crook.,1993). Além de não influenciar de maneira direta na patogenicidade viral, essas proteínas podem auxiliar no controle de insetos-praga (vírus e toxina) podendo aumentar a eficiência de controle de uma determinada espécie de inseto-praga.

Outro fator de relevância no ponto de vista biotecnológico, é que as proteínas Cry possuem a capacidade de formar cristais nas células de insetos. Sendo que estes cristais podem ser facilmente purificados e sua toxicidade para os insetos suscetíveis verificada. Além disso, a proteína Cry pode ser expressa fusionada a uma outra proteína para melhorar a toxicidade contra os organismos alvos. Em trabalho desenvolvido por Chang *et al* (2003), foi demonstrado que a proteína Cry1Ac quando fusionada com a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV, melhorou significativamente a patogenicidade do vírus recombinante, quando comparado o vírus selvagem no controle *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

Considerando a grande variabilidade genética ocorrida entre as estirpes de *Bt*, isoladas de diferentes localidades no Brasil, e a busca por novas estirpes de *Bt* com alto potencial inseticida, para que seja utilizada na fabricação de bioinseticidas altamente eficiente no controle de insetos-praga. O nosso trabalho objetivou o estudo isolado de proteínas Cry recombinantes, visando determinar a toxicidade, isoladamente, destas toxinas utilizando o sistema de expressão baseado em baculovirus e célula de inseto.

#### **3.2 Específicos:**

- Isolar, clonar, sequenciar os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* de *B. thuringiensis*.
- Expressar as proteínas Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa em células de inseto usando o baculovírus com vetor de expressão;
- Purificar as proteínas Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa e analisar da atividade tóxica contra larvas dos insetos susceptíveis;
- Analisar a ultra-estrutura dos cristais das proteínas Cry e poliedros produzidos pelos vírus recombinante em microscopia eletrônica de varredura.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos diferentes genes *cry*

O gene truncado *cry1Ca* (2.415 bp) foi obtido da estirpe S-1644 de *B. thuringiensis* pertencente ao banco de *Bacillus* da Embrapa Milho e Sorgo de Sete lagoas (MG), e os genes *cry2Ab* e *cry10Aa* foram amplificados a partir do DNA plasmideal das estirpes S-447 e S-1806 de *B. thuringiensis* pertencentes ao banco de *Bacillus* spp entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Monnerat *et al.*, 2001). Todos os genes utilizados neste trabalho foram amplificados por reações de PCR consistindo de 50 ng de DNA total bacteriano, que foi purificado de acordo com procedimentos descrito por Monnerat *et al* (2001). Além do DNA, foram utilizados oligonucleotídeos (0.4 µM de cada) específicos para cada gene (Tabela 3), 10 µM de cada dNTP, 2,5 µL de tampão de Taq DNA polimerase, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq polimerase (Invitrogen) em um volume total de 25 µL.

Amplificação dos genes foi realizada de acordo com os seguintes passos: 94 °C/5 min em seguida por 35 ciclos em 95 °C/30 s, 52 °C/1,30 s, 72 °C/4 min e a extensão final de 72°C/8 min. Os oligonucleotídeos F1 de cada gene anelam-se na região 5' de cada gene (Tabela 3, o códon de início da tradução de cada gene está em itálico). O oligonucleotídeos R1 do gene *cry1Ca* anela-se nos nucleotídeos 2.444 a 2.469 após o codon de início. Os sítios de restrição *Bam* HI e *Bgl* II foram introduzidos dentro da seqüência dos oligonucleotídeos (Tabela 3, em negrito). O oligonucleotídeo R1 do gene *cry2Ab* anela-se nos nucleotídeos 1908 a 1922, após o códon de início. O sitio de restrição *Bam* HI foi introduzido dentro da seqüência dos oligonucleotídeos (Tabela 3, em negrito) para facilitar futuras manipulações do gene. O oligonucleotídeo R1 do gene *cry10Aa* se anela nas posições 2.015 a 2.042 após o códon de início do

gene. Os fragmentos amplificados foram, então, clonados dentro do plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega), de acordo com o protocolo de instruções do fabricante, e introduzido em células de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  (Invitrogen). O DNA dos plasmídeos recombinantes foram purificados, utilizando o Kit de purificação de DNA Wizard<sup>®</sup>Plus SV Minipreps (Promega) e seqüenciados no seqüenciador automático MEGA BACE<sup>®</sup> 1000 (Amersham Bioscience) no laboratório de Bioinformática da Embrapa Cenargen com oligonucleotídeos (SP6 e T7) que se anelam em regiões franqueadoras do plasmídeos pGEM<sup>®</sup> T-easy vector (Promega) e oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 3). Para o gene *cry1Ca*, o plasmídeo pBluescript contendo o gene (pBScry1Ca) foi obtido do Dr. Fernando Valicente da Embrapa Milho e Sorgo. As seqüências obtidas foram analisadas pelos programas ORF finder e Blast, disponíveis na página da internet do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI): [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* de estirpes de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao banco de *Bacillus* spp entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Monnerat *et al.*, 2001) e da Embrapa Milho e Sorgo. As seqüências dos sítos de restrição para as enzimas *Bam* HI (GGATCC) e *Bgl* II (AGATCT) estão destacadas em negrito. O códon de início da tradução (ATG) está destacado em itálico em cada um dos oligonucleotídeos "forward".

Gene	Oligo	Seqüência do oligo (direção 5' > 3')	Estirpe de <i>Bt</i>
<i>cry1Ca</i>	Foward (F1)	CCTTTTAGGATCCTTATGGAG-	S-1644
	Reverso (R1)	CCAGATCTGCAGGAACAATCTAGATCAGGATTC	
<i>cry2Ab</i>	Foward (F1)	<b>GGATCC</b> ATGAATAGTGTATTGAATAGCGGAAG	S-447
	Reverso (R1)	GGGATCCTTAATAAAGTGGTGGGAAGATTAGTTGG	
<i>Cry10Aa</i>	Foward (F)	<b>GGGATCC</b> GGGAGGAATAGATATGAATC	S-1806
	Reverso (R)	ATAGTGAATGATTTATTTGTAAGGATCCTTTCC	
		<b>Oligo interno <i>cry2Ab</i></b>	
	F-501	AGGATACCAACTGTTATT	
	R-1309	TGAAGATTTAAGAAGAC	
		<b>Oligo interno <i>cry10Aa</i></b>	
	F-496	GCACGTACACACGCTAATGC	
	R-1324	GATATTCATCCAATTCAACAATA	

#### 4.2. Construção dos vetores de transferência

O DNA dos plasmídeos pBScry1Ca, pGemcry2Ab e pGemcry10Aa foram digeridos com a enzima de restrição *Eco* RI e os fragmentos contendo os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* foram separados do vetor de clonagem e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, seguindo instruções descritas em Sambrook et al (1989). Os fragmentos contendo os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* foram purificados do gel usando o kit GFX Kit<sup>®</sup> (Amersham) e ligados ao vetor de transferência pSynXIVVI+X3 (Wang *et al.*, 1991) previamente digerido com *Eco* RI usando metodologia descrita em Sambrook et al (1989). Posteriormente, as ligações acima descritas foram utilizadas para transformar *E. coli* DH5- $\alpha$  (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Colônias contendo possíveis clones foram selecionadas em meio seletivo, e uma reação de PCR foi realizada para confirmar a presença do gene e para verificar a orientação do gene dentro do vetor de transferência. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes *cry* (Tabela. 3) e específicos para o pSynXIVVI+X3 (oligonucleotídeos ORF 603 (5'-ACAGCCATTGTAATGAGACG-3', que anela-se entre os nucleotídeos +8 e -11 relativos ao códon de início da ORF 603) e polhR (5'-CTAGATTCTGTGCGTTGTTG-3', que anela-se entre os nucleotídeos 34 e 54 após o códon de terminação do gene da poliedrina), o que permite verificar se o gene está na posição correta sob o comando dos promotores em série P<sub>syn</sub> e P<sub>XIV</sub> (Wang *et al.*, 1991).



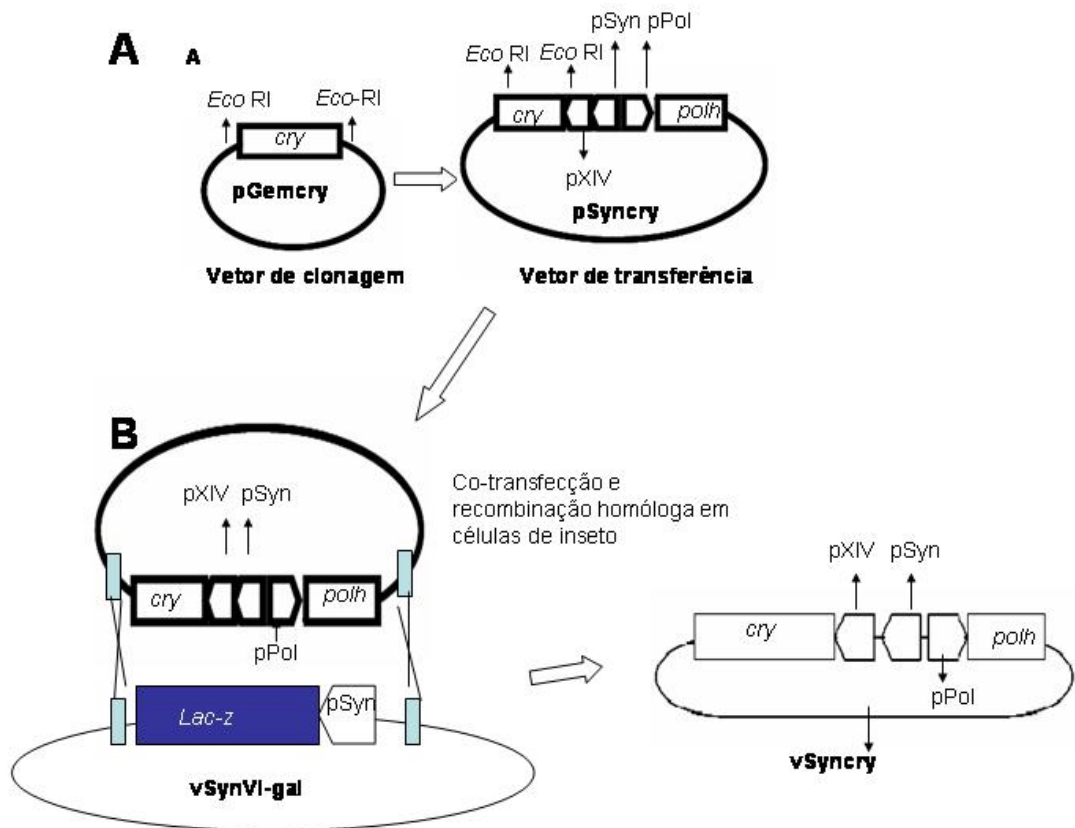


Figura 9. Diagrama mostra o esquema utilizado para obtenção dos vírus recombinantes contendo os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* (vSyncry). Os plasmídeos contendo os genes *cry* (pGemcry para os genes *cry2Ab* e *cry10Aa* e pBScry, para o gene *cry1Ca*) foram digeridos com a enzima *Eco*RI e os fragmentos contendo cada gene foram separados em gel de agarose por eletroforese e purificados. O plasmídeo vetor pSynXIVVI+X3, previamente digerido com *Eco*RI, foi usado para a clonagem de cada gene, gerando os plasmídeos pSyncry (A). Os plasmídeos pSyncry foram então, co-transfectados (B) com DNA do vírus vSynVI-gal em células de inseto *Trichoplusia ni* em cultura e os vírus recombinantes vSyncry foram purificados por diluição seriada em placas de 96 poços. A posição dos promotores pXIV, pSyn e pPol estão indicados na figura.

### 4.3. Células e vírus

Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4) (Granados *et al.*, 1994) foram mantidas a 27 °C em meio TC100 com 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen). Esta linhagem de células serve como hospedeira para propagação *in vitro* dos baculovírus AcMNPV e seus recombinantes. O vírus recombinante vSynVI-gal, que contém o gene da  $\beta$ -galactosidase no locus do gene da poliedrina (Wang *et al.*, 1991), foi usado para as construções dos AcMNPV recombinantes contendo os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa*.

### 4.4. Construção e purificação dos vírus recombinantes contendo os genes *cry*

Um  $\mu\text{g}$  do DNA dos plasmídeos recombinante (pSyncry1Ca, pSyncry2Ab e pSyncry10Aa) e 0.5  $\mu\text{g}$  DNA do vírus vSynVI-gal, previamente linearizados com a enzima de restrição *Bsu* 36I, foram utilizados em co-transfecções em placas 60-mm com células BTI-TN5B1-4 ( $10^6$  células), usando lipossomos e seguindo as instruções do fabricante (Cellfectin<sup>®</sup>, Invitrogen). As placas foram incubadas por sete dias, a 27 °C, até que aparecesse corpos de oclusão viral (OB), o sobrenadante das placas foram coletados e usados para purificação dos vírus recombinantes em diluições seriadas em placas de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992). O único sítio de *Bsu* 36I no vírus vSynVI-gal é localizado no gene  $\beta$ -galactosidase, e a linearização torna o vírus não infectivo (Kitts *et al.*, 1990), facilitando a purificação do vírus recombinante. Além disso, os plasmídeos pSyncry1Ca, pSyncry2Ab e pSyncry10Aa possuem, além dos genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa*, o gene da poliedrina (ausente no vSynVI-gal). Após a recombinação homóloga entre o DNA dos plasmídeos (pSyncry1Ca, pSyncry2Ab e pSyncry10Aa) e o DNA viral, dentro das células de inseto, o vírus vSynVI-gal recupera a forma circular

infectiva e a expressão do gene da poliedrina, que torna evidente a formação de OB pelos vírus recombinantes (vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa), pela observação de células em um microscópico de luz invertido (Axiovert 100, Zeiss). Os mesmos foram purificados em três diluições seriadas em placas de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992).

#### **4.5. Análise transcricional dos genes *cry2Ab* e *cry10Aa* em células de inseto infectadas pelo vírus vSyncry2Ab e vSyncry10Aa**

Na análise transcricional dos vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa, foram usadas duas placas de 100 mm em diâmetro (TPP), onde foram adicionadas  $5 \times 10^6$  células (BTI-Tn5B1-4) e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. O meio das placas foi removido e as células infectadas com os vírus recombinantes com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20. Após 1 h, o inóculo dos vírus foi removido e adicionado meio com soro fetal bovino a 10%. Após 96 h.p.i, as células foram coletadas e a extração do RNA total foi feita utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total purificado das células infectadas com os vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa foram utilizados para obtenção de cDNA usando um oligonucleotídeo específico para calda de poly-A do RNA mensageiro (T1: 5'CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') e a enzima transcriptase reversa Mu-MLV (Invitrogen). Os seguintes procedimentos foram realizados: na primeira parte, foram adicionados 2µl do RNA total derivado de células infectadas com os vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa em 9 µl água Milli-Q "Rnase free" e 1 µl do primer T1, em um micro tubo com volume final de 12 µl. Posteriormente, as soluções foram incubadas a 65 °C por cinco minutos em Banho-maria e acondicionadas no gelo. Logo em seguida, em um novo tubo, foram adicionados 1 µl da solução dos 4

dNTP (10 mM cada). 1 µl de DTT (0,1 M), 28 unidades do inibidor de Rnase (RNA guard<sup>®</sup>, Gibco), 5 µl do tampão 5X, 1 µl (5U) da enzima Transcriptase reversa M-MLV RT (Gibco BRL), e água Mili-Q<sup>®</sup> autoclavada em um volume/mL de 8µl. No segundo passo, os tubos contendo o RNA foram colocados juntamente com o conteúdo do segundo tubo contendo a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Gibco BRL) (volume total de 20 µl), e incubados a 37 °C por 50 min, para obtenção da síntese de cDNA. Os cDNA das células infectadas com os vírus recombinantes vSyncry2Ab e vSyncry10Aa foram, então, usados em uma reação de PCR com os oligonucleotídeos T2 (5' CCTGCAGGATCCTTAGGTT 3') e os oligonucleotídeos específicos para os genes *cry2Ab* e *cry10Aa*. O oligo Foward (F1) se anela na posição inicial do gene *cry2Ab* (Tabela 3) e o F-496 se anela na posição 496 a 516 após o códon de início (ATG) do gene *cry10Aa*, e a seqüência do primer T2 é idêntica para os primeiros 17 nucleotídeos presentes no oligonucleotídeos T1, usado na reação do cDNA (Rodrigues *et al.*, 2001). Para se confirmar que os fragmentos obtidos na reação de RT-PCR correspondem ao gene *cry2Ab* foi realizado uma PCR com oligonucleotídeos internos (F-501, que anela-se na posição +501 a +519, relativa ao códon de início do gene e R-1309, que anela-se nas posições +1309 a +1327, relativas ao códon de início do gene, Tabela 3) para a amplificação de um fragmento de 900 pb da região interna do gene *cry2Ab*. Enquanto que, para confirmar a especificidade do fragmento amplificado do gene *cry10Aa* foram realizados ensaios com a enzima de restrição *Xho* I que corta o gene na posição +1064, após o códon de início do gene *cry10Aa*.

#### **4.6. Análise dos possíveis cristais das proteínas Cry recombinantes obtidas de larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes.**

Cem larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas por injeção na hemolinfa de 5 a 10 µl de um estoque de BV ( $1,17 \times 10^7$  pfu/mL) dos vírus recombinantes vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa. Após 120 h.p.i, as larvas mortas e vivas foram coletadas e OB com possíveis cristais das proteínas recombinantes foram purificados de acordo com o procedimento para purificação de OB descritos por O'Reilly et al (1992). Após a purificação, os possíveis cristais das proteínas recombinantes e os poliedros virais foram analisados em microscopia de luz (Axiophot 100, Zeiss), fotografados, e posteriormente armazenados a -80 °C. Para análise em SDS-PAGE, tanto os poliedros do vírus selvagem, assim como, os cristais da proteína recombinante, foram ressuspensos em 100 µL de PBS (136 mM NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH 7.4) e amostra de 10 µL foram analisadas em SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970) usando o aparato Mini-Protean II, de acordo as de instruções do fabricante (Bio-Rad).

#### **4.7. Produção de anti-soro policlonal contra as proteínas Cry recombinantes**

Soro imune foi preparado utilizando três coelhos da raça Nova Zelândia de três meses de vida, para cada proteína recombinante, onde 300 µl de solução, contendo as proteínas recombinantes Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa, foram inoculadas subcutâneamente como antígenos. As proteínas foram obtidas a partir de uma banda (120 µg) correspondente a cada proteína recombinante em um gel de SDS-PAGE a 12%. Após a eletroforese, as bandas das respectivas proteínas foram retiradas do gel e homogeneizadas em 200 µL de tampão PBS 1X com auxílio de um homogeneizador

(Homogenizer Glas-Col). Primeiramente, coletou-se uma alíquota de soro pré-imune dos coelhos para testes posteriores. Três imunizações foram feitas com intervalos de 15 dias cada. Na primeira aplicação, os coelhos foram imunizados com 120 µg da proteína Cry homogeneizada em 200 µL de PBS 1X com adjuvante completo de Freud (Sigma, Saint Louis). Na segunda aplicação, os coelhos foram imunizados com 200 µL da proteína homogeneizada em PBS 1X com adjuvante incompleto de Freud e na terceira etapa da imunização, foram somente aplicadas os 200 µL das proteínas homogeneizadas em PBS 1X sem adição de adjuvante de Freud. Decorridos quarenta dias após o início de imunização, foram coletados cerca de 30 mL de sangue arterial por meio de punção cardíaca, o soro foi obtido por centrifugação do material a 5.000 x g por 20 min e estocados em alíquotas com 50% de glicerol a -20 °C (Harlow e Lane, 1988; Sambrook et al., 2001). A análise do anti-soro foi realizada por teste de dot-blot (Harlow & Lane, 1988) usando amostras de células de *Trichoplusia ni* não infectadas, células infectadas com AcMNPV, células infectadas com vSynVI-gal, células infectadas com os respectivos recombinantes (vSynCry1Ca, vSynCry2Ab e vSynCry10Aa), extratos total de larvas de *S. frugiperda* não infectados e extrato total de larvas de *S. frugiperda* com os vírus recombinantes.

#### **4.8. Análise ultra-estrutural de OB e possíveis cristais das proteínas Cry recombinantes**

Larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas com BV do vírus recombinantes (vSynCry1Ca, vSynCry2Ab e vSynCry10Aa) como descrito no item 2.6 e após 120 h.p.i., as larvas mortas foram coletadas e maceradas para a purificação de OB e possíveis cristais das proteínas recombinantes, de acordo com o protocolo descrito em O'Reilly et al (1992). A mistura de OB e cristais foram fixados por duas h com 2% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 1 M (pH 6.4), em

seguida, lavados três vezes, com intervalo de 15 minutos, com tampão cacodilato de sódio 0.1 M e pós-fixado em uma solução de tetróxido de ósmio (1:1) e ferricianato de potássio por 2 h. As amostras foram desidratadas em acetona e secas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub>, em equipamento Balzer CPD30, coberto com ouro no equipamento sputter coater, Balzer SCD 050, como descrito em Benchimol et al (1996). As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 840 a 10 Kv.

#### **4.9. Avaliação da toxicidade das proteínas Cry recombinantes.**

Larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas com 10 µL dos vírus recombinantes como descrito no item 2.6 e, após cinco dias, as larvas foram homogeneizadas em 1 mL de água MiliQ<sup>®</sup> para cada cadáver de inseto. O homogeneizado foi filtrado em lã de vidro e a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram ressuspendidos em uma solução de 100 mM de EDTA, 40 mM de EGTA e 1,0 mM de PMSF. A quantificação das proteínas Cry2Ab e Cry10Aa foram realizadas por análise em géis de poliacrilamida, com respectivos peso molecular Cry1Ca (65 KDa), Cry2Ab (65 KDa) e Cry10Aa (74 KDa), usando um programa Image phoretix 2D<sup>®</sup> (Pharmacia), que através de cálculos de proporções entre as bandas das proteínas recombinantes e com uma concentração da proteína albumina bovina previamente determinada (100 mg) em gel SDS-PAGE, que foram "Scaneados" e, por meio do programa citado acima, foi possível determinar a quantidade de proteínas recombinantes presente em 1 ml do homogeneizado.

Os bioensaios para cálculo da CL<sub>50</sub> das proteínas recombinantes para larvas de *S. frugiperda* foram realizadas com adição de trinta µL de cada diluição das proteínas

recombinantes Cry1Ca (30  $\mu$ L contendo  $30,000 \times 10^{-3}$ ;  $3,000 \times 10^{-3}$ ;  $300 \times 10^{-3}$ ;  $30 \times 10^{-3}$ ;  $3 \times 10^{-3}$ ;  $0.3 \times 10^{-3}$ ;  $0.03 \times 10^{-3}$ ;  $0.003 \times 10^{-3}$ ;  $0.0003 \times 10^{-3}$  e  $0.00003 \times 10^{-3}$  de proteína ng/ml, respectivamente) e Cry2Ab (30  $\mu$ L contendo  $5.280 \times 10^{-3}$ ;  $528 \times 10^{-3}$ ;  $52,8 \times 10^{-3}$ ;  $5,28 \times 10^{-3}$ ;  $0,528 \times 10^{-3}$ ;  $0,0528 \times 10^{-3}$ ;  $0,00528 \times 10^{-3}$ ;  $0,000528 \times 10^{-3}$ ;  $0,0000528 \times 10^{-3}$  e  $0,00000528 \times 10^{-3}$  mg/ml, respectivamente) sobre uma dieta artificial com 72 larvas (para cada dose dividida em 3 repetições), no total de 24 larvas por repetição e incubados individualmente em placas de 24 poços (Monnerat *et al.*, 2001). Como parte do controle experimental, foram mantidas 72 larvas de segundo instar de *S. frugiperda* nas mesmas condições dos bioensaios (sem adição das proteínas recombinantes sobre a dieta). A mortalidade dos insetos foi analisada em 24 e 48 h pós-inoculação e a  $CL_{50}$  foi determinada pela análise de Próbit (Finney1971). No controle experimental, a mortalidade não ultrapassou a 10%, sendo o padrão utilizado.

Bioensaios com larvas de *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) para determinar a  $CL_{50}$  da proteína Cry1Ca foi idêntico como descrito anteriormente para larvas de segundo instar de *S. frugiperda*.

O bioensaios com larvas neonatas de *A. grandis* foi realizado de acordo com os procedimentos descritos em Martins et al (2005). Brevemente, a dieta artificial foi vertida em uma placa de Petri (15 mm x 20 mm) e, após sua solidificação, foram feitos 25 orifícios. Em cada orifícios foi colocada uma larva neonata de *A. grandis*, no total de 25 larvas para cada dose da proteína Cry10Aa. Sendo no total de 75 larvas por dose, que foram submetidas a cinco doses da proteína recombinante Cry10Aa (10,4; 8.32; 6,24; 4,16; 2.08  $\mu$ g/ml) e mais um controle com adição de somente da dieta. Após sete dias, foi realizada a leitura experimental, e determinou a  $CL_{50}$ , por meio de análise de probit (Finney, 1971).

Todos os bioensaios foram realizados em câmaras de incubação com fotofase de 14:10 h (luz e escuro) a uma temperatura de 25 °C e 75 % de umidade relativa do ar.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Clonagem e seqüenciamento dos genes *cry* de *B. thuringiensis*

Os fragmentos correspondentes aos genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* (2.394, 1.922 e 2.048 pb, respectivamente), foram clonados dentro dos vetores de clonagem pBluescript<sup>®</sup> (*cry1Ca*) e pGem<sup>®</sup>-T easy (*cry2Ab* e *cry10Aa*) (Fig. 9), gerando assim, os plasmídios recombinantes pBSCry1Ca, pGemCry2Ab e pGemCry10Aa. Após a obtenção das colônias das células DH5 $\alpha$  com os plasmídeos recombinantes, o DNA plasmidial das colônias selecionadas foi submetido a ensaios de restrição com a enzima *Eco* RI para confirmar a clonagem (Fig. 11). Após a confirmação da clonagem, os plasmídeos pGemcry2Ab e pGemcry10Aa foram seqüenciados. Análise de BLAST das seqüências obtidas mostrou que o gene *cry2Ab* da cepa S447 tem 100% de identidade com o gene *cry2Ab* descrito por DANKOCSIK et al. (1990) (número de acesso no Genbank = CAA39075. 1). O mesmo foi observado com a ORF do gene *cry10Aa* da estirpe S-1806, que apresentou alta identidade com o gene *cry10Aa* descrito por THORNE et al. (1986), ocorrendo somente dois nucleotídeos diferentes (número de acesso no Genbank = M12662). Nas posições +1779 e +1885, houve alterações da base A por G e C por G, respectivamente (Fig. 10). Com esses resultados ocorreram alterações nos respectivos aminoácidos da proteína Cry10Aa T589A e T624S.

A análise da seqüência da proteína truncada Cry1Ca (804 aminoácidos) foi idêntica aos primeiros 824 aminoácidos do total de 1.189 descrita por HONÉE et al. (1988), com exceção de uma deleção de 20 aminoácidos entre os resíduos 589 e 608.

## Seqüência do gene *cry2Ab*

### A Foward (F1)

1. ggatccatgaatagtgattgaatagcgggaagaactactat tttgtgatgcgtataatgtagcggctcatga  
71. tccatttagttttcaacacaaatcattagataccgtacaaaaggaatggacggagtggaaaaaaaaataat  
141. catagtttatacctagatcctattggtggaactgtggctagtttctgttaaagaaagtggggagtctt  
210. gttggaaaaaggataactaagtgagttacggaatttaatat ttcctagtggtagtagacaaatcta atgcaa  
279. gatattttaagagagacagaaaaattcctgaatcaaagacttaatacagacactcttgcccgtgtaaat  
348. gcggaattgacagggctgcaagcaaatgtagaagagtttaatcgacaagtagataat tttttgaaccct  
417. aaccgaaacgctgttcccttatcaataacttcttcagttaataca atgcaacaattat tttctaaataga  
486. ttaccccagttccag atgcaaggataccaactg ttattattacctttat tttgacaggcagccaattta

 F 501nt

555. catctttcttttattagagatg ttattctaaatgcagatgaatggggaatttcagcagcaacattacgt  
624. acgtatcgagattacttgaaaaattatacaagagattactctaactattgtataaatacgtatcaaagt  
693. gcgtttaaaggtttaaacactcgtttacacgat atgttagaatttagaacatata atgtttttaaagtga  
762. tttgagtatgtatctatctggtcgttgtttaaatatcaaagtcttctagtagtcttccggtgctaat tta  
831. tatgcaagtggttagtggaccacagcagacccaatcatttacttcacaagactggccatttttatattct  
900. cttttccaagttaattcaaattatgtgttaaattggatttagtgggtgctaggtttctaaatccctccct  
969. aatatagttggtttacctggttctactacaactcaacgcatgcttgctgcaagggtaattacagtgga  
1038. ggaatttcgtctggtgatataggtgcatctcgtttaatcaaaattttaattgtagcacattttctccc  
1106. cccattg ttaacgccattt ggttaggagttggctagattcaggttcagatcgggagggcgttggccaccg  
1174. ttacaaattggcaaacagaatcctttgagacaactttagggttaaggagtggtgcttttacagctcgc  
1242. ggtaattcaaacattttcccagattat tttattcgtaatat tttctggagttcctttagttgtagaaa

 R 1309nt

1310. tgaagatttaagaagaccgttacactataatgaaataagaaatatagcaagtccttcaggaacacctg  
1378. gtggagcacgagcttat atggtatctgtgcataacagaaaaataatccatgctgttcatgaaaat  
1446. ggttct atgattcatttagcgc caaatgactatacaggatttactat tttcgcgatacatgcaactca  
1514. agtgaataatcaaacacgaacattttat tttctgaaaaatttggaaatcaaggtgattctttaaggtttg  
1582. aacaaaacaacacgacagctcgttatacgttagagggaaatggaaatagttacaatctttat ttaaga  
1650. gtttcttcaataggaaattccactattcaggttactataaacggtagggatatactgctacaaatgt  
1718. taatactactacaaataacgatggagttaatgataatggagctcgtttttcagatattaatatcggta  
1786. atgtagtagcaagtagtaattctgatgtaccattagatataaatgtaacattaaactccggtagtcaa  
1854. tttgatctt atgaatatt atgcttgt accaactaat atttcaccactttat taagggatccttaataa  
1922. agtgggtggaagattagttggc

 Reverso (R1)

## Seqüência do gene *cry10Aa*


**B**  **Foward (F)**

1. **gggaggaatagatatgaatc**catatcaaaataagaatgaatatgaaatattcaatgctccatccaatggtttttag  
75. caagtctaataactattctagatatccattagcaaataagccaaatcaaccactgaaaaacacgaattacaaag  
149. attggctcaatgtgtgtcaagataatcaacaatatggcaataatgcggggaatTTTgctagttctgaaactat  
222. tgttggagtttagtgcaggattatttgttagtaggaact**atg**ttaggagctTTTgctgcccctgtcttagctgca  
295. ggtataatatctTTTgggactTTTggtgccgatctTTTggcaaggatctgaccctgcaaagtTTTggcaggatt  
368. tgttaaacatcggaggaaggcctatacaagaaatagataaaaaacataattaatgtactaacttctatcgtaac

**F-496** 

441. acctataaaaaatcaacttgataaatatcaagaatTTTTcgataaatgggagccag**gcacgtacacacgcta**at  
514. **gc**taaagcagtacatgatctctTTTactaccttagaacctataatagataaagatttagat**atg**ttaaaaaata  
587. atgctagctatcgaataccaacactccctgcatatgcacaaatagctacttggcacttgaatttattaaaaaca  
660. tgctgctacctattacaatatatggctgcaaaatcaaggataaatccaagtactTTTcaattcatctaattac  
733. tatcagggctatTTTaaaacgtaaaatacaagaatatactgactattgtatacaaacgtacaatgcaggactaa  
806. ct**atg**attagaactaactaactaacgcaacatggaat**atg**tataatacttaccgTTTtagaa**atg**actctaactgt  
859. gttagatcttattgctatTTTTccaaattatgaccagaaaaatatccaataggagttaaatctgaacttatc  
942. agagaagtttatacgaatgttaattcagatacatTTTtagaacataacagaactagaaaatggattaactagaa

1010. atcctacattatTTTacttggataaaaccaagggcgTTTTtacacaagaaatt**ctcgag**acattcttgatcctt  
1097. atgatTTTTTTctTTTtacaggtaaccag**atg**gcTTTTtacacatactaatgatgatcgcaacataatctggg  
1169. gagcggttcatggaaatattatTTTctcaagacacatccaaagtattcTTTTtatagaaacaaacctattg  
1241. ataaggtcgaaattgtcagacatagagagtactcagatataatatgaa**atg**atTTTTTTTcgaatagca

 **Sítio de Xho I**

 **R-1324**

1313. gtgaagtattt**cgatattcatccaattcaacaata**gaaaaataattataaaagaactgattcttat**atg**attc  
1385. caaaacaaacatggaaaaatgaagaatatgggcatactctatcgatatataaaaactgataattatatatTTT  
1457. cagtagttagagaaagaagaagagttgcatttagttggacacatactagtggtgatttccaaaatacaatag  
1529. atttagataacatcaccacaaatccacgctctaaaagctTTTgaaggtaagttctgattcgaaaattgtgaaag  
1601. gtcttggtcacacaggtggagacttggtaattcttaaagatagt**atg**gattTTTtagagtttagattTTTaaaaa  
1673. atgtttctcgacaatatcaagtagctattcgttatgctactaatgctccaaagacaacagtatcttaaccg  
1747. gaatagatactataagtggtggagctccctagt**g**ccacttcccgccaaaacccaaatgctacagatttaacat  
1817. atgcagattTTTggatattgtaacatttccaagaacagttccaaataaaacatttgaaggagaagacag**g**tttat  
1889. ta**atg**accttatatggtacaccaaattcattcatataatatatattgacaaaatcgaatttattccaatca  
1961. ctcaatctgtatttagattatacagagaagcaaaatatagaaaaaacacagaaa**atagtgaaatgatttatttg**  
2033. **ttaatttcc** |

**Reverso (R)** 

## Seqüência do gene *cry1Ca*

Foward (F1) →

1. cttttaggatccttatggaggaaaataatcaaaatcaatgcataccttacaattgtttaa  
61 gtaatcctgaagaagtacttttggatggagaacggatatcaactggtaattcatcaattg  
121 atatctctctgtcacttgttcagtttctgggatctaaccttgtaccagggggaggatttt  
181 tagtggattaatagattttgtatggggaatagttggcccttctcaatgggatgcatttta  
241 gtacaaattgaacaattaattaatgaaagaatagctaatttgctaggaatgctgctattg  
301 ctaattagaaggattaggaacaatttcaatataatgtggaagcatttaaagaatggg  
361 aagaagatcctaataatccagaaaccaggaccagagtaattgatcgcttctgtatacttg  
421 atgggctacttgaaagggacattccttctgcttctcgaatttctggatttgaagtacccttt  
481 tatccgtttatgctcaagcggccaatctgcatctagctataattaagagattctgtaattt  
541 ttggagaaagatggggattgacaacgataaatgtcaatgaaaactataatagactattag  
601 gcatattgatgaatatgctgatcactgtgcaaatacgtataatcggggattaaataattt  
661 accgaaatctacgtatcaagattggataacatataatcgattacggagagacttaacatt  
721 gactgtattagatatcgccgcttcttccaaactatgacaataggagatatccaattca  
781 gccagttggtcaactaacaaggggaagttatacggaccatttaattaattttaatccaca  
841 gttacagtctgtagctcaattacctacttttaacgttatggagagcagccgaattagaaa  
901 tcctcatttactttgatataatgaataatcttacaatctttacggattggtttagtgttg  
961 gacgcaatttttattggggaggacatcgagtaatatctagcccagcttataggaggtgg  
1021 aacataacatctcctatataatggaagagaggcgaaccaggagcctccaagatcctttact  
1081 tttaatggacacggtatttaggactttatcaaatcctactttacgattattacagcaacc  
1141 ttggccagcgcaccattttaatttacgtggtggtgaaggagtcaagaatctctacacctac  
1201 aatagctttacgtatcgaggaagaggtacggttgattctttaactgaattaccgctgag  
1261 gataatagtggtgccacctcgcaaggatagtgatcatcgtttatgtcatgcaacttttgctc  
1321 aaagatctggaacaccttttttaacaactgggtgtagtattccttcttgaccgatcgtagt  
1381 gcaactcttacaataacaattgatccagagagaattaatcaaaatccttttagtgaaaggat  
1441 ttagagtttggggggcacctctgtcattacaggaccaggatttacaggaggggatcctt  
1501 cgaagaaatacctttgggtgattttgtatctctacaagtaataatcaccattacca  
1561 aagataccgtttaagatttctgttacgcttccagtagggatgcacgagttatagtattaaca  
1621 ggagcgcacccacaggagtgggaggccaagttagtgtaaatatgcctcttcagaaaaactat  
1681 ggaaataggggagaacttaacatctagaacatttagatataaccgatttagtaatcctttt  
1741 tcatttagagctaatccagatataattgggataagtgaacaacctctatttgggtgcaggtt  
1801 tattagtagcgggtgaactttatataagataaaaattgaaattattctagcagatgcaacattt  
1861 gaagcagaatctgatttagaaagagcacaaaaggcgggtgaatgccctgtttacttcttcca  
1921 atcaaatcgggttaaaaaccgatgtgacggattatcatattgatcaagtatccaattagtg  
1981 gattgtttatcagatgaattttgtctggatgaaaagcgagaattgtccgagaaaagtcaaac  
2041 atgcaagcgaactcagtgatgagcggaaatttacttcaagatccaaacttcagaggggatcaa  
2101 tagacaaccagaccgtggctggagaggaagtacagatattaccatccaaggaggagatgac  
2161 gtattcaaagagaattacgtcacactaccgggtaccggttgatgagtgctatccaacgtatt

2221 tatatcagaaatagatgagtcgaaattaaagcttatacccgttatgaattaagagggtat  
 2281 atcgaagatagtcaagacttagaaatctatcttgatccggttacaatgcaaaacacgaaatag  
 2341 taaatgtgccaggcacgggtaa cagatctgcaggaacaatctagatcaggattc 2414  
 ← Reverso (R1)

Figura 10. Seqüência de nucleotídeos dos genes *cry2Ab*, *cry10Aa* e *cry1Ca*. Os códons **atg** e **taa** correspondem, respectivamente para o início e o final das orfs dos genes *cry2Ab*, *cry10Aa* e *cry1Ca*, respectivamente. As setas (em azul e vermelho) indicam a posição e a direção de anelamento (5' e 3') dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes *cry2A*, *cry10Aa* e *cry1Ca* e amplificação da região interna de cada genes para o completar o seqüenciamento de cada orf deste trabalho. Os nucleotídeos destacados em vermelho (**g,g**) dentro da seqüência do gene *cry10Aa* foram os nucleotídeos que apresentaram diferenças entre o gene *cry10Aa* da estirpe S-1806 e o genes *cry10Aa* descrito por Thorne et al. (1986). Enquanto, a região marcada de marron dentro da seqüência do gene *cry1Ca*, corresponde a deleção de 20 aminoácidos da seqüência descrita por Honnée et al. (1988).

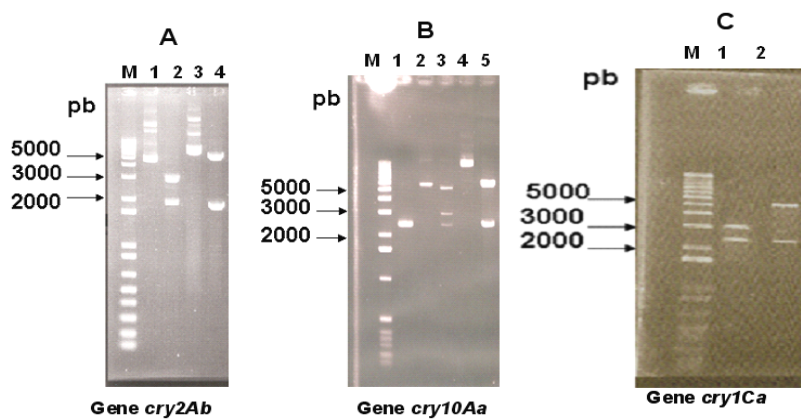


Figura 11. As figuras **A**, **B** e **C** mostram géis de agarose a 0,8% com as respectivas clonagens dos genes *cry2Ab*, *cry10Aa* e *cry1Ca* nos vetores de clonagem pGEM<sup>®</sup>-Teasy (Promega) ou pBluescript<sup>®</sup> (Stratagene) e no vetor de transferência pSynXIVVI+X3. (**A**) **M**- Marcador 1Kb ladder plus (Promega), **2** DNA intacto do plasmídeo pGemcry2Ab contendo o gene *cry2Ab*, **3**- Digestão do DNA do plasmídeo pGemcry2Ab com a enzima de restrição *Eco* RI, **4**- DNA intacto do plasmídeo pSyncry2Ab contendo o gene *cry2Ab*, **5**- DNA do plasmídeo pSyncry2Ab digerido com *Eco* RI; (**B**) **M**- Marcador 1Kb ladder plus (Promega), **1**- Fragmento de DNA derivado da amplificação do gene *cry10Aa* obtido por PCR a partir do DNA plasmideal da estirpe 1806; **2**- DNA intacto do plasmídeo intacto pGemcry10Aa, contendo o gene *cry10Aa* **3**- Digestão do plasmídeo pGemcry10Aa com a enzima de restrição *Eco* RI, a digestão do plasmídeo foi parcial, como pode ser observado pela presença de 3 bandas no gel. **4**- DNA intacto do plasmídeo pSyncry10aA, contendo o gene *cry10Aa*, **5**- Digestão do plasmídeo pSyncry10aA com a enzima *Eco* RI; (**C**) **M**- Marcador 1Kb ladder plus, **1** Plasmídeo pBScry1Ca, contendo o gene *cry1Ca* e digerido com a enzima de restrição *Eco* RI; **2** - Plasmídeo pSyncry1Ca, contendo o gene *cry1Ca* e digerido com enzima de restrição *Eco* RI;

## **5.2. Construção e purificação dos vírus recombinante vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa.**

Após a recombinação homóloga em células transfectadas, os genes *cry1Ca*, *cry2Ab* e *cry10Aa* foram inseridos no lugar do gene *lac-Z* gene do vírus vSynVI-gal (Fig. 9) e os recombinantes vSyncry1C, vSyncry2AB e vSyncry10Aa foram isolados a partir do sobrenadante das co-transfecções em diluições seriadas em placas de 96 poços. Células BTI-TN5B1-4 ( $10^6$ ) infectadas com os vírus recombinantes (10 pfu/célula) e após 72 h p.i., foram analisadas por microscopia de luz (Fig. 12). Os vírus recombinantes possuem, além dos genes *cry*, o gene da poliedrina que facilita o isolamento do vírus pela formação de corpos de oclusão (OB) dentro do núcleo das células infectadas (Fig.12B). Os vírus recombinantes vSyncry1Ca e vSyncry10Aa obtidos produziram, além da proteína poliedrina, cristais em forma de cubo no citoplasma das células durante a fase tardia da infecção viral (Fig.12 C e E). Enquanto, que os cristais da proteína Cry2Ab só foram visualizados na hemolinfa de larvas de *S. frugiperda* infectadas pelo recombinante vSyncry2Ab (Fig. 12D).

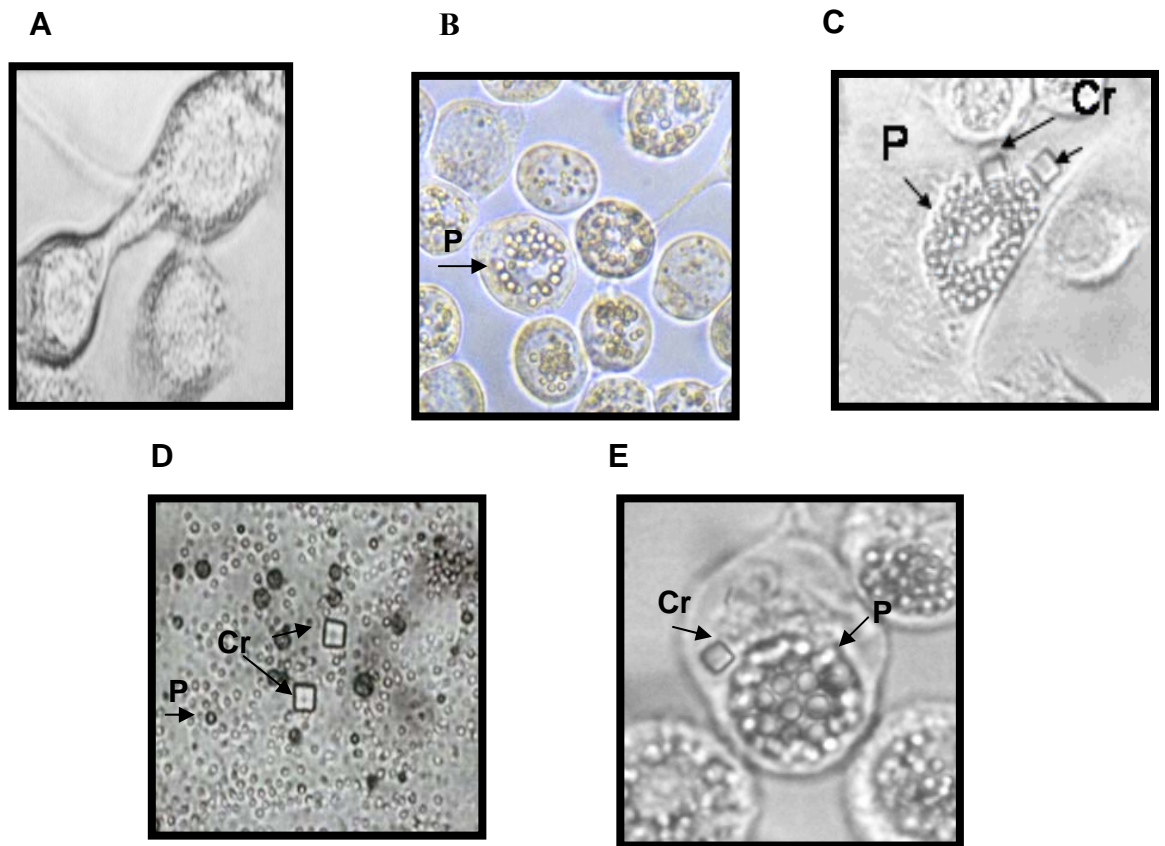


Figura 12. Identificação dos vírus recombinantes por microscopia de luz- **A**- células de BTI-TN5B1-4 não infectadas; **B** - células de BTI-TN5B1-4 infectadas com AcMNPV (72 h p.i.); **C**- células BTI-TN5B1-4 infectadas com o recombinante vSyncry1Ca (72 h p.i.); **D**- Hemolinfa de larvas de segundo instar de *S. frugiperda* infectadas com o recombinante vSyncry2Ab (72 h p.i.) e **E**- células BTI-TN5B1-4 infectadas com o recombinante vSyncry10Aa (72 h p.i.). As setas indicam os corpos de oclusão, também denominados de poliedros (**P**) e cristais (**Cr**).



### **5.3. Análise transcricional dos genes *cry2Ab* e *cry10Aa* em células de *Trichoplusia ni* infectadas com os vírus recombinante vSyncry2Ab e vSyncry10Aa.**

A transcrição dos genes *cry2Ab* e *cry10Aa* foram confirmadas por uma reação de RT-PCR a partir do mRNA obtidos das células BTI-TN5B1-4 infectadas com os vírus vSyncry2Ab e vSyncry10Aa, a 96 h p.i.. Na análise transcricional do gene *cry2Ab*, vários fragmentos foram amplificados. (Fig. 13A). Como o oligonucleotídeo específico para amplificar o gene *cry2Ab* se anela no início do gene (oligonucleotídeo F1, Tabela 3) o único fragmento com tamanho compatível com o esperado (2.500 pb) foi purificado do gel (Fig. 13A, poço 2) e usado em novas reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene *cry2Ab* (Fig. 13B. poços 3 e 4). As reações de PCR confirmaram a presença do gene *cry2Ab*, demonstrando assim, que o fragmento transcrito corresponde ao gene *cry2Ab*. Enquanto que a análise transcricional por RT-PCR do gene *cry10Aa* revelou a amplificação de um único fragmento de aproximadamente 1.600 pb (Fig. 13C, poço 2), e para confirmar a especificidade do fragmento amplificado, foram realizados ensaios de restrição com a enzima de restrição *Xho* I que corta o gene na posição +1.064 após o códon de início do gene *cry10Aa* (fig. 10). A digestão do fragmento produziu o fragmento esperado de 1.100 pb e outro de aproximadamente de 548pb (Fig. 13D poço 2), confirmando a especificidade da amplificação.

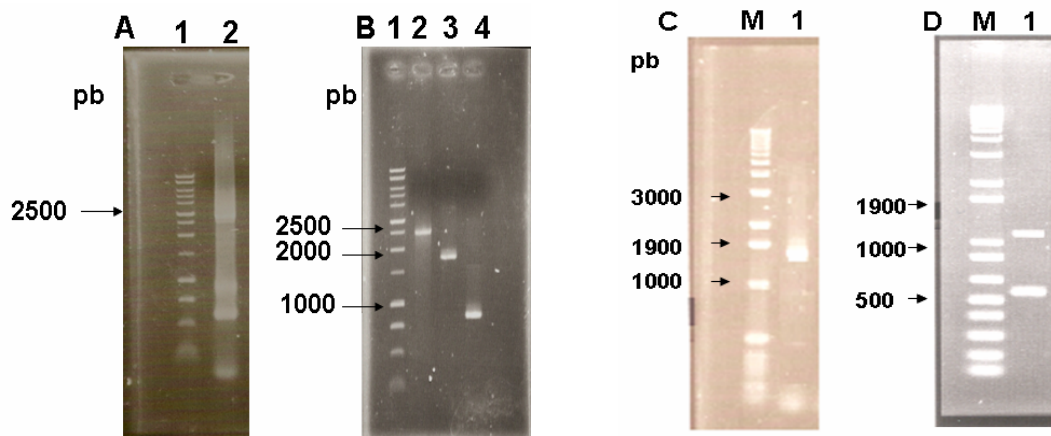


Figura 13. Análise da transcrição dos genes *cry2Ab* e *cry10Aa* por RT-PCR a partir de mRNA de células BTI-TN5B1-4 infectadas com os vírus recombinante vSyncry2Ab e vSyncry10Aa. As figuras **A**, **B** e **C** mostram géis de agarose a 0,8%. **A** e **C** -1 Marcador 1Kb ladder (Invitrogen), **2** Amplificação dos produtos de RT-PCR a partir do mRNA de células infectadas com o vírus vSyncry2Ab e vSyncry10Aa. **B** e **D**, **1** Marcador 1 Marcador 1Kb ladder (Invitrogen) **2B**- Fragmento de 2,5 kb eluído do gel mostrado em A. **3** e **4B** Confirmação da especificidade do fragmento eluído pela amplificação, por PCR, de regiões específicas do gene *cry2Ab*. **D1** digestão do fragmento obtido do RT-PCR das células infectadas com vSyncry10Aa com a enzima de restrição *Xho* I. A digestão produziu os fragmentos esperados de aproximadamente 1.100 pb e 600pb, respectivamente, confirmando a especificidade do fragmento amplificado.

#### 5.4. Análise da expressão das proteínas Cry recombinantes

Células BTI-TN5B1-4 foram infectadas com diferentes vírus recombinantes e, após 96 h p.i., extratos celulares foram analisados por SDS-PAGE e Western-blot (Fig.14 A, B e C). A presença de uma proteína de cerca 65 kDa foi detectada tanto em extrato de células de *T. ni* e extrato de larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* infectadas com vSyncry1Ca. Essa proteína foi reconhecida por um anticorpo específico contra a proteína Cry1Ca, tanto nas amostras de extratos de células e insetos infectados com o vírus recombinante (Fig. 14A1, poços 7 e 8). Na análise da expressão da proteína recombinante Cry2Ab, foram utilizados dois grupos de 100 larvas de *S. frugiperda*, que foram infectadas com BV dos vírus AcMNPV tipo selvagem e do vSyncCry2Ab para obtenção tanto de poliedros como, cristais da proteína recombinante. Um polipeptídeo de aproximadamente 65 kDa e outro de 30 kDa foram detectados nas amostras de cristais e poliedros purificados das larvas infectadas com vírus recombinante vSyncry2Ab (Fig. 14B, poço 2). Enquanto que, na amostra obtida do AcMNPV selvagem apenas um peptídeo por volta de 30 kDa, que corresponde à proteína poliedrina, foi obtido (Fig. 14B, poço 1). A proteína de 65 kDa presente junto aos poliedros foi reconhecida pelo anticorpo específico específico da proteína Cry2Ab. No gel de poliacrilamida a proteína recombinante Cry10Aa de aproximadamente 74 KDa foi detectada no extrato de células infectadas com vírus recombinante vSyncry10Aa e imunomarcada com um anti-soro específico contra esta proteína (Fig. 14C1 e 14C2, poço 6)

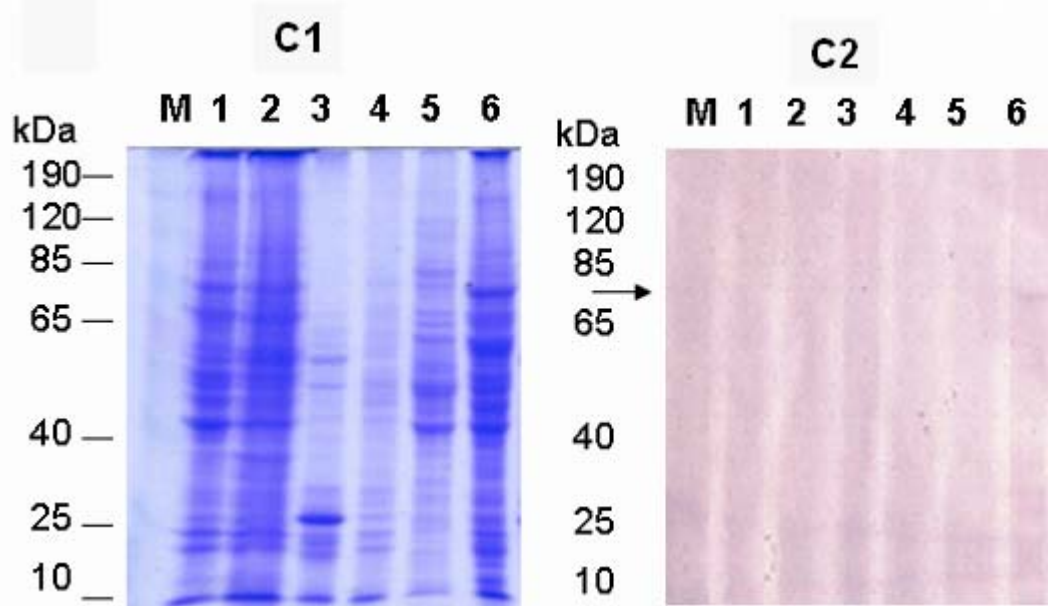
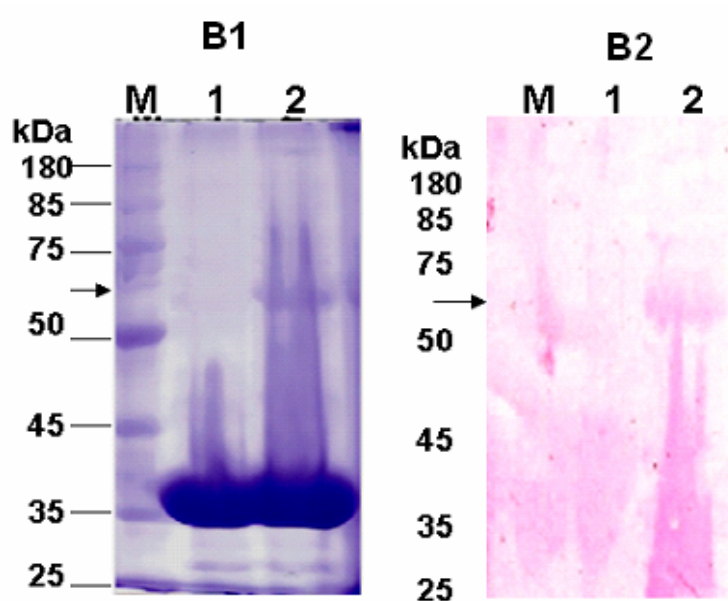
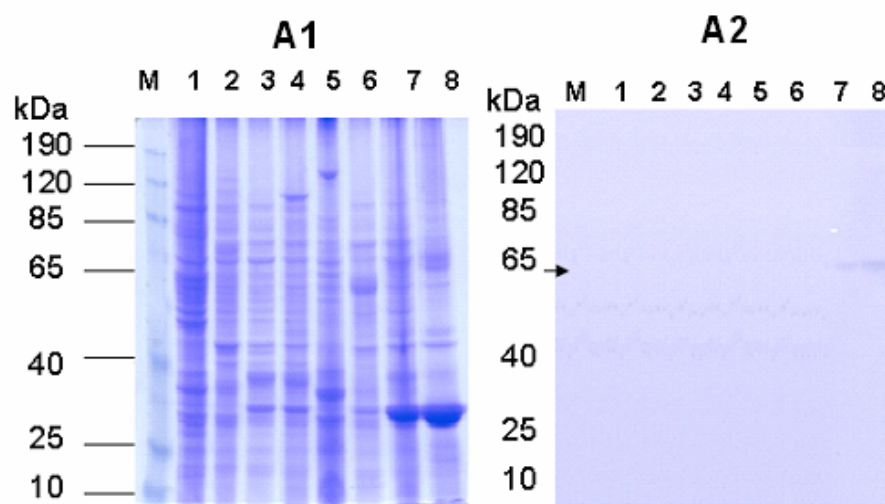


Figura 14. Análise da expressão das proteínas recombinantes. **A1** (SDS-PAGE a 12%) e **A2** (Western Blot) da proteína Cry1Ca produzida pelos vírus recombinantes vSyncry1Ca. Sendo células não infectadas (1), e extrato de células BTI-TN5B1-4 infectadas com vSynVI-gal (2), AcMNPV (3), vSynprotD (4), vAcBtm (5), vSynYFE (6), e vSyncry1Ca (7), extrato de larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vSyncry1Ca (8). **B1** e **B2** - análise da expressão da proteína Cry2Ab pelo recombinante vSyncry2Ab e imunomarcção usando anticorpo contra a proteína a Cry2Ab, (1)- poliedros do vírus selvagem AcMNPV, (2)- poliedros e cristais da proteína recombinante Cry2Ab. A seta mostra a posição da proteína de aproximadamente 65 kDa marcada dos cristais e poliedros purificados de larvas infectadas com o vírus vSyncry2Ab. **C1** e **C2** - análise da expressão da proteína recombinante Cry10Aa e imunomarcção com anticorpo contra a proteína Cry10Aa. Células não infectadas (1), e extrato de células BTI-TN5B1-4 infectadas com vSynVI-gal (2), AcMNPV (3), vSynYFE (4), vAcBtm (5) e (6) vSyncry10Aa. A seta mostra a posição da proteína de aproximadamente de 70 kDa marcada em células de BTI-TN5B1-4 infectadas com o vírus vSyncry10Aa.

### 5.5. Análise ultra-estrutural dos possíveis cristais das proteínas recombinantes Cry produzidos em células de inseto em cultura e insetos.

Larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas, separadamente com BV dos vírus recombinantes vSyncry1Ca, vSyncry2Ab e vSyncry10Aa por injeção intra-hemocelica e, a 120 h p.i., cadáveres dos insetos foram coletados e usados para purificar poliedros e possíveis cristais das proteínas recombinantes. Os cristais e poliedros purificados foram processados para microscopia eletrônica de varredura e analisados. Cristais na forma de cubo, juntamente com os poliedros virais, foram detectados em extratos de insetos infectados como os vírus recombinantes. Os cristais observados são formados, provavelmente, pelas proteínas recombinantes Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa (Fig 15).

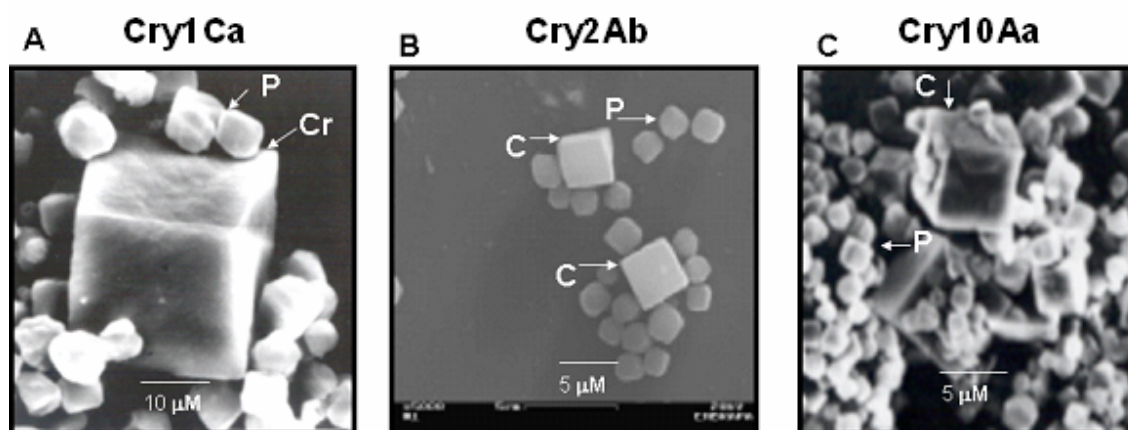


Figura15. Análise ultra-estrutural dos poliedros (P) e cristais (C) purificados de larvas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes. Cristais e poliedros produzidos pelos vírus recombinantes vSyncry1Ca (A), vSyncry2Ab (B) e vSyncry10Aa (C).

## 5.6. Avaliação da toxicidade das proteínas recombinantes Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa

Para se determinar a  $CL_{50}$  das proteínas recombinantes (Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa) para larvas de *S. frugiperda* (Cry1Ca e Cry2Ab), *A. gemmatalis* (Cry1Ca) e *A. grandis* (Cry10Aa), diferentes doses da mistura de poliedros e cristais de cada amostra foram diluídas e aplicadas sobre a dieta dos insetos. A mortalidade dos insetos foi determinada no intervalo de 24 e 48 h após cada tratamento. As  $CL_{50}$  da proteína Cry1Ca para *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foram de 19,49 ng/mL e 114,44 ng/mL, respectivamente (Tabela 4). Entretanto, os limites de confiança se sobrepõem, mostrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre as  $CL_{50}$ . Conseqüentemente, ambos os insetos tem susceptibilidade similares à toxina Cry1Ca. A  $CL_{50}$  da proteína recombinante Cry2Ab para larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, foi de 3,405 µg/mL (Tabela 4). A  $CL_{50}$  da proteína Cry10Aa para larvas neonatas do bicudo do algodoeiro (*A. grandis*) foi de 7,12 µg/mL (Tabela 4). Os resultados obtidos demonstraram que todas as proteínas Cry recombinantes foram tóxicas para os insetos testados, demonstrando a eficiência do sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto para a produção de proteínas Cry biologicamente similares às proteínas nativas.

---

Tabela 4. Toxicidade da mistura de OB e cristais das proteínas recombinante Cry1Ca, Cry2Ab e Cry10Aa purificados de larvas de *S. frugiperda* infectados com baculovírus recombinante vSynCry1Ca, vSynCry2Ab e vSynCry10Aa, sendo que para a proteína Cry1Ca foi verificada a toxicidade para as larvas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis* e *S. frugiperda* e para a proteína Cry2Ab somente para larvas de segundo instar de *S. frugiperda* e para a proteína Cry10Aa foi verificada a toxicidade para larvas neonatas de *Antonomus grandis*. Os resultados são a média de três repetições.

Proteína Cry recombinante	Insetos	n	CL <sub>50</sub> (ng /mL) (final)	Intervalo de confiança	X <sup>2</sup>
	<i>S. frugiperda</i>	72	114,44	32,17-529,62 <sup>a</sup>	4,68
Cry1Ca	<i>A. gemmatalis</i>	72	19,49	4,91-156,88 <sup>a</sup>	2,38
			CL <sub>50</sub> (µg /mL) (final)		
Cry2Ab	<i>S. frugiperda</i>	72	3,405	1,055-11,263 <sup>a</sup>	4,53
Cry10Aa	<i>A. grandis</i>	72	7,12	5,27-9,80 <sup>a</sup>	3,39

CL<sub>50</sub>: Concentração letal para 50% dos indivíduos testados durante o período de 48 horas. <sup>a</sup> – amostras com p >0,05 e G >0,04 e n – número de insetos utilizados por repetição.



## 6. DISCUSSÃO

Baculovírus são excelentes vetores de expressão de proteínas heterólogas, sendo possível obter de 1 a 600 mg de proteína recombinante/L de cultura de células de inseto infectadas com vírus recombinantes (Maiorela *et al.*, 1998; Luckow & Summers, 1988). Este nível de expressão é suficientemente alto para se estudar a toxicidade das proteínas Cry para seus respectivos insetos susceptíveis, uma vez que uma quantidade (ng ou µg) pequena de proteína Cry por mL de dieta é suficiente para se obter 100% de mortalidade de insetos susceptíveis, em bioensaios de laboratório.

Algumas proteínas Cry já foram expressas em células de insetos usando o sistema de expressão baseado em baculovírus (BEV), tais como as proteínas: Cry1Ab, Cry1Ac (Ribeiro & Crook, 1993, 1998) e Cry11Aa (Pang *et al.*, 1992), mostrando que as proteínas recombinante são biologicamente similares às proteínas nativas expressas em *Bt*. Além disso, a incorporação dos genes heterólogos não influenciou de maneira significativa na patogenicidade do baculovírus contra os insetos alvos. Ao contrário, quando a proteína Cry1Ab foi expressa como uma proteína fusionada com a proteína que forma os OB de baculovírus (poliedrina), o vírus recombinante aumentou sua virulência contra larvas de *P. xylostella* (Chang *et al.*, 2003). Além disso, diferentes genes, como o hormônio juvenil (Hammock *et al.*, 1990), toxinas aranhas ou escorpiões (Hughes *et al.*, 1997) têm sido introduzidas dentro do genoma de baculovírus com objetivo de melhorar a virulência viral contra seus hospedeiros.

Uma outra utilidade de introduzir os genes das proteínas Cry dentro do genoma do baculovírus é a expressão de proteínas Cry isoladamente em células de insetos para estudos funcionais dessas proteínas, pois elas podem ser analisadas isoladamente sem a presença de outras proteínas Cry, que é o que comumente se encontra em estirpes de *Bt*. A outra possível vantagem é a formação de grandes cristais

destas proteínas no citoplasma de células de insetos (Pang *et al.*, 1992, Ribeiro & Crook, 1993; Martens *et al.*, 1990, Aguiar *et al.*, 2006; Martins, 2005), que pode facilitar estudos estruturais destas proteínas. Além disso, estudos sobre o sinergismo entre diferentes proteínas Cry podem ser facilitados com a expressão concomitante de duas ou mais proteínas usando diferentes baculovírus recombinantes. Trabalhos anteriores têm mostrado que as proteínas Cry podem agir sinergicamente aumentando a toxicidade destas contra insetos susceptíveis (Crickmore *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2005) e estes estudos ajudam na busca de genes *cry* mais apropriados para serem introduzidos no genoma de plantas cultivadas de grande interesse econômico.

A utilização de proteínas Cry, expressas em insetos por baculovírus recombinantes, pode ser um atrativo na fabricação de bioinseticidas com maior espectro de ação, pois a associação do baculovírus e os cristais das proteínas Cry podem agir em conjunto para o controle de insetos susceptíveis ou pouco susceptíveis a um dos bioinseticidas. Outra vantagem seria a possibilidade de retardar o aparecimento de resistência à proteína Cry mencionada em alguns trabalhos (Schnepf *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1995). Isso porque insetos resistentes à proteína Cry poderiam ser eliminados pela infecção viral.

### **6.1. Toxicidade da proteína Cry1Ca**

A versão truncada do gene *cry1Ca* de *B. thuringiensis* foi inserido dentro do genoma do baculovírus AcMNPV, sob comando de dois promotores (Psyn e PXIV) arranjados em seqüência (Van Regenmortel, *et al.*, 2000) para a construção do baculovirus recombinante vSyncry1C.

Em extratos de células de *T. ni* (BTI-TN5B1-4) e larvas de terceiro instar *S. frugiperda* que foram infectadas com vSyncry1Ca, verificou-se a presença de uma

proteína de aproximadamente 65 kDa, sendo ausente no AcMNPV tipo selvagem e em outros vírus recombinantes em SDS-PAGE. Este polipetídeo provavelmente corresponde à proteína Cry1Ca processada por proteases do inseto. As proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* são sintetizadas como grande precursores (pró-toxinas) de cerca de 130 Kda que são clivados por protease no intestino do inseto para uma forma de toxina ativa de aproximadamente 65 kDa (Rukmini *et al.*, 2000).

Apesar de truncada, a proteína recombinante Cry1Ca mostrou toxicidade para larvas de segundo instar de *S. frugiperda* com CL<sub>50</sub> de 144,44 ng/mL e para *A. gemmatalis* com CL<sub>50</sub> de 19,49 ng/mL. Esse resultado já era esperado, pois a forma ativa da proteína Cry1Ca corresponde aproximadamente 663 aminoácidos, que foi recentemente expressa em tabaco e apresentou toxicidade para larvas de *S. litura* (Lin *et al.*, 2003).

Apesar da ausência de 1/3 da região C-terminal da proteína Cry1Ca (aproximadamente 365 aminoácidos) e de uma deleção de 20 aminoácidos, a proteína truncada expressa em células de insetos pelo recombinante vSyncry1C foi capaz de formar grandes cristais nos citoplasmas das células infectadas. A formação dos cristais de proteínas Cry em células infectadas com baculovirus recombinantes tem sido relatadas para as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry11Aa (Ribeiro & Crook, 1993, 1998, Martens *et al.*, 1990, Pang *et al.*, 1992). Essas proteínas recombinantes foram expressas em altas quantidades e algumas formaram cristais maiores do que quando são expressas em células de *Bt*, sugerindo que o tamanho dos cristais produzidos em *Bt* é limitado pelo tamanho da bactéria (Ribeiro & Crook, 1998).

Trabalhos anteriores mostraram a formação de cristais a partir de versões truncadas da proteína Cry1Ab em células de insetos (Ribeiro & Crook, 1998). Além disso, a quantidade dos cristais foi reduzida quando comparado com a proteína expressa no tamanho normal. Alguns autores correlacionam a formação de cristais e a estrutura

das proteínas Cry com a presença de resíduos de cisteína na região C-terminal da proteína Cry1Ab (Bietlot *et al.*, 1990, Hofte & Whiteley, 1989). A proteína Cry1Ca completa possui 19 resíduos de cisteína e a proteína recombinante obtida neste trabalho tem somente 11 resíduos. A ausência de 8 resíduos de cisteínas da proteína Cry1Ca não afetou a formação de cristais em células de insetos. Além do que, recentes estudos têm mostrado que a formação de cristais de algumas proteínas Cry é também dependente da expressão de proteínas auxiliares (Ge *et al.*, 1998, Wu & Frederici, 1995). É possível considerar que proteínas presentes nas células de insetos estejam ajudando na formação de grandes cristais dentro do citoplasma das células infectadas. Cristais de proteínas Cry foram também detectados durante a expressão em outras bactérias (Oeda *et al.*, 1988, Shivakumar *et al.*, 1986) e cloroplasto de plantas transgênicas (de Cosa *et al.*, 2001).

## **6.2. Toxicidade da proteína Cry2Ab**

O gene *cry2Ab* de *B. thuringiensis* foi primeiramente descrito por Widner & Whiteley, 1989, sendo encontrado em diferentes cepas de *Bt* (Widner & Whiteley 1989, Dankocsik *et al* 1990, Crickmore *et al.*, 1998, Jain *et al.*, 2006, Chen *et al* 2003, Wang *et al* 2006, Zhang *et al* 2005 e Huang *et al* 2006). A proteína Cry2Ab apresenta toxicidade conhecida para diversos tipos de insetos da ordem lepidoptera, como por exemplo, *Heliothis virescens* (Greenplate *et al.*, 2003; Gore *et al.*, 2005), *Helicoverpa zea* (Dankocsik *et al.*, 1990) *Pectinophora gossypiella* (Tabashnik *et al.*, 2002), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Chen *et al.*, 2002), *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa punctigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lião *et al.*, 2002). Plantas de algodão transgênicas expressando as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab sofreram menos danos causados pela *S. frugiperda* quando comparado com plantas não transgênicas, (Greenplate *et al.*, 2003; Chitkowski *et al.*, 2003).

A proteína Cry2Ab, expressa em células de inseto durante a infecção do baculovírus recombinante vSyncry2Ab, apresentou toxicidade para larva de segundo instar *S. frugiperda* com uma CL<sub>50</sub> de 3,405 µg/mL. No entanto, os cristais desta proteína quando expressa em *Bacillus thuringiensis cry*<sup>HDI</sup>, foram tóxico para larvas de *H. armigera* e *H. punctigera* (Lião *et al.*, 2002), Aparentemente as larvas de *S. frugiperda* foram mais tolerantes à proteína Cry2Ab, quando comparado aos resultados obtidos por por LIÃO *et al.* (2002) para as larvas de *H. armigera* e *H. punctigera*. Em alguns trabalhos já foram demonstrados, que a diferença de suscetibilidade dos insetos a proteínas Cry de *B. thuringiensis*, pode variar em função dos organismos alvos (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003)

O gene *cry2Ab* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* codifica um polipeptídeo (633 aminoácidos) de 70.75 kDa. Essa proteína contém no N-terminal, 49 aminoácidos que são clivados no intestino de insetos susceptíveis para liberar a toxina na forma ativa. A proteína ativa, por sua vez, apresenta três domínios, que são similares a outras toxinas já estudadas tais como: a proteína Cry3Aa (Li *et al.*, 1991) e Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995). A seqüência de aminoácidos da proteína recombinante Cry2Ab expressa pelo baculovírus recombinante vSyncry2Ab é idêntica à proteína Cry2Ab de *B. thuringiensis kurstaki* (Dankocsik, *et al.*, 1990, número de acesso CAA39075.1) e apresentou um peptídeo de 65 kDa em SDS-PAGE, a partir dos cristais purificados larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus recombinante. O transcrito do gene *cry2Ab* foi detectado por RT-PCR a partir do mRNA de células de inseto infectadas com o vSyncry2Ab (96 h p.i.), confirmando a funcionalidade dos promotores virais.

A proteína recombinante Cry2Ab quando foi expressa em cultura de células de *T. ni* pela infecção com o recombinante vSyncry2Ab, não apresentou a formação de cristais no citoplasma das células infectadas, como demonstrado para outras proteínas Cry expressas usando o sistema baculovírus-células de inseto (Ribeiro & croock,

1993,1998; Pang *et al.*, 1992; Martens *et al.*, 1990). Porém, quando larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas, via hemolinfa, com o vírus recombinante vSyncry2Ab, foi possível observar a formação de cristais cubóides, derivados da proteína Cry2Ab, na hemolinfa dos insetos a 96 h.p.i. De acordo com trabalhos desenvolvidos por Widner & Whitelely (1989), as proteínas Cry2Aa e Cry2Ab quando expressas em *Bt* apresentam cristais cubóides durante a fase de esporulação. A cristalização no inseto pode estar associada ao maior nível de expressão da proteína nos diferentes tipos de células presentes no inseto, permitido assim, a cristalização da proteína. Por outro lado, a cristalização da proteína Cry2Aa em *Bt* é dependente da presença de proteínas auxiliares durante a esporulação (Staples *et al.*, 2001). Quando a proteína Cry2Aa foi expressa em cloroplasto de tabaco, a sua cristalização só ocorreu com a expressão concomitante com a proteína ORF2 de *B. thuringiensis*, presente no operon deste gene. Na ausência dessa proteína (ORF2), não foi detectado a presença de cristais em cloroplastos (De Cosa, 2001; Kota *et al.*, 1999). Dessa forma, outra possibilidade para a formação de cristais em células de *S. frugiperda* infectadas com o vSynCry2Aa, é a presença de proteínas celulares, possivelmente chaperonas que auxiliam na sua cristalização.

Apesar de 87% de identidade com a proteína Cry2Aa, a proteína Cry2Ab possui toxicidade conhecida somente para insetos da ordem Lepidoptera. Já a proteína Cry2Aa apresenta toxicidade tanto para os insetos da ordem Lepidoptera quanto para Diptera. Estudos realizados com híbridos entre as duas proteínas (Cry2Aa e Cry2Ab) demonstram que uma região de 76 aminoácidos esta relacionada com a especificidade para os insetos das ordens Diptera e Lepidoptera. No entanto, a proteína Cry2Ab apresenta diferença de somente 18 aminoácidos nesta região (Widner & Whitelely, 1989). Essa região pertencente à proteína Cry2Aa, quando foi incorporada à proteína

Cry2Ab, apresentou toxicidade para insetos das ordens Diptera e Lepidoptera (Widner & Whitelely, 1989).

A proteína Cry2Ab foi altamente expressa quando o gene *cry2Ab* foi incorporado ao genoma do algodão apresentando um alto potencial no controle dos insetos da ordem Lepidoptera desta cultura (Tabashnik *et al.*, 2002). No entanto, quando a proteína Cry2Ab foi expressa juntamente com a proteína Cry1Ac em plantas de algodão, o nível de expressão foi dez vezes maior do que a proteína Cry1Ac resultando assim, em maior eficácia na proteção das plantas. Além disso, insetos resistentes a uma toxina (Cry1Ac) não mostraram resistência cruzada à proteína Cry2Ab (Grenplate *et al.*, 2003).

### **6.3. Toxicidade da proteína recombinante Cry10Aa**

O gene *cry10Aa* codifica uma proteína de 70 kDa que, quando expressa em *Bt* é clivada em uma toxina ativa de 60 kDa para insetos susceptíveis da ordem díptera. A proteína recombinante Cry10Aa produzida pelo baculovírus recombinante vSyncry10Aa em extratos de células de *T. ni* (BTI-TN5B1-4), foi detectada por SDS-PAGE a 12% como um polipeptídios de aproximadamente de 70 kDa. Durante a infecção das células BTI-TN5B1-4 pelo recombinante vSyncry10Aa, foi possível visualizar, assim como outras proteínas citadas acima, a formação de cristais cubóides no citoplasma das células infectadas.

A proteína Cry10Aa foi primeiramente descrita na literatura como proteína de atividade tóxica para insetos da ordem Díptera. Principalmente por ser encontrada na estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, que possui várias proteínas com atividade tóxica para diversos insetos da ordem Díptera, entre elas estão a Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba (Ben-Dov *et al.*, 1999; Guerchicoff *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002).

Além do *B. thuringiensis* subsp. *israelenses*, outras estirpes de *Bt* possuem diversas proteínas Cry tóxicas para dípteros, que são codificadas por diferentes genes *cry* e estão distribuídas em outras classes (Crickmore *et al.*, 1998). A classe dos genes *cry2* possui genes que codificam proteínas com atividade tóxica contra dípteros. Além destes, existem outros genes que codificam proteínas Cry ativas contra dípteros, como *cry14Aa*, *cry16*, *cry17* e *cry18* (Zhang *et al.*, 1997).

A partir da proteína purificada dos extratos de larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, foi possível verificar a toxicidade da proteína Cry10Aa em bioensaios seletivos contra larvas de outros insetos. A proteína Cry10Aa causou 100% de mortalidade para larvas neonatas de *A grandis* que é o inseto-praga mais importante da cotonicultura brasileira, ocasionando sérios prejuízos no cultivo do algodão (Toledo *et al.*, 2000). Esta praga é um inseto endófago, onde as larvas se desenvolvem dentro dos botões florais, local de preferência para deposição de seus ovos, e os adultos se alimentam principalmente do pólen e ocasionam danos ao botão floral, o que leva uma enorme perda produtiva das plantas de algodão devido à queda desses botões florais. Um fator importante relacionado a esta praga é o seu difícil controle pelos inseticidas atualmente empregados, apenas produtos sistêmicos são capazes de impedir o desenvolvimento deste organismo dentro dos botões forais do algodoeiro.

Diversos insetos da ordem Coleoptera possuem suscetibilidade às proteínas Cry de *Bt*, tais como: *Chrysomela scripta* e *Antonomus grandis* (Tailor *et al.*, 1992; Martins, 2005), *Leptinotarsa texana* (Martínes, 2004), *Leptinotarsa decemlineata* (Martínes, 2004), *Tenebrio molitor* e *Tribolium castaneum* (Martínes, 2004), e *Diabrotica undecimpunctata* (Martínes, 2004), *Ephilachna varivestis* (Martínes, 2004), *Phaedon brassicae* e *Anomala cuprea* (Martínes, 2004). Além disso, os insetos possuem diferentes suscetibilidades às proteínas Cry. Por exemplo, a proteína CryIIa apresentou toxicidade para *L. decemlineata*, causando 60% de mortalidade, quando submetidos a



uma dose de 195 µg/mL. Ao passo que, para *Ostrinia nubilalis* foi necessário uma dose de 16 µg/mL da proteína CryIIa para ocorrer 100% de mortalidade (Tailor et al., 1992).

A CL<sub>50</sub> da proteína Cry10Aa para *A. grandis* foi de 7,12 µg/mL. Comparando com outros resultados de toxinas de *Bt* tóxicas para larvas de *A. grandis*, as larvas neonatas de *A. grandis* apresentaram alta suscetibilidade à proteína Cry10Aa do que à proteína CryIIa, que apresentou uma CL<sub>50</sub> de 21,5 µg/mL (Martins, 2005).

A descoberta da alta suscetibilidade de *A. grandis* para a proteína Cry10Aa (relata neste trabalho), pode resultar em uma nova alternativa no controle dessa praga e de outros insetos da ordem Coleoptera. Outro fator importante para estudo da toxicidade apresentada da proteína Cry10Aa para insetos da ordem Coleoptera é a possibilidade de se estudar o sinergismo e antagonismo que esta proteína pode apresentar com outras proteínas Cry com atividade conhecida para insetos dessa ordem. Além disso, torna se objeto de estudo também, os receptores das células do intestino para ligação das proteínas Cry, visando o conhecimento do modo de ação dessa toxina e desenvolvimento de resistência, comparado com outras toxinas específicas para insetos da ordem Coleoptera. Diante desses estudos, no futuro, a introdução do gene *cry10Aa* no genoma de plantas juntamente com outros genes *cry* poderá melhorar a proteção das plantas contra pragas importantes (coleobrocas), conforme já demonstrado em alguns trabalhos de construção de plantas transgênicas que expressam duas proteínas Cry diminuindo assim, o desenvolvimento de resistência dos insetos a proteínas Cry de classe diferentes (Chitkowski *et al.*, 2003).

A busca de novas alternativas para o controle de insetos-praga, principalmente na redução do uso de inseticidas convencionais, como a introdução de genes da toxina de *Bt* no genoma de plantas de interesse econômico, tem sido alvo de inúmeras pesquisas e hoje em dia já estão disponíveis diversas plantas transgênicas contendo genes *cry*, tais como: tabaco (Barton *et al.*, 1987; De cosa *et al.*, 2001), tomate

(Fischhoff, 1987), algodão (Perlak *et al.*, 1990), batata (Cheng *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1998), arroz (Fujimoto *et al.*, 1993; Nayak *et al.*, 1997), milho (Koziel *et al.*, 1993) e soja (Stewart *et al.*, 1996). Porém, apenas plantas transgênicas de milho, soja, algodão e batata estão sendo comercializadas (Betz *et al.*, 2000). Com uma área cultivada de aproximadamente 13 milhões de ha (milho, soja, algodão e batata) somente nos Estados Unidos da América e 102,2 milhões de ha em 2006, distribuídos em todo mundo, esta tecnologia é uma importante ferramenta no controle de insetos-praga (Zhao *et al.*, 2005). Um fator importante para o estudo das proteínas Cry é o sinergismo e/ou antagonismo existente entre as diferentes toxinas Cry. Desta forma, a pesquisa de novas proteínas Cry e suas interações é uma importante estratégia na construção de bancos de genes para serem possíveis candidatos para a introdução em cultivares de importância econômica (Schnepf *et al.*, 1998).

## 7. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos mostraram que, os baculovírus são excelentes vetores de expressão de proteínas Cry, devido à possibilidade de estudar a toxicidade das proteínas Cry separadamente e com seus respectivos insetos susceptíveis. Além de ser atrativo na fabricação de bioinseticidas com maior espectro de ação para o controle de insetos susceptíveis ou pouco susceptíveis a um dos bioinseticidas.
- A proteína recombinante Cry1Ca mostrou toxicidade para larvas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, demonstrando assim, que a proteína recombinante expressa por baculovírus apresentam toxicidade semelhante às proteínas comumente expressas em condições normais pela bactéria *B. thuringiensis*.
- Apesar da ausência de 1/3 da região C-terminal da proteína Cry1Ca foi possível observar a formação de grandes cristais nos citoplasmas das células infectadas, maiores do que quando são expressas normalmente em células de *Bt*.
- A proteína Cry10Aa apresentou atividade tóxica contra larvas neonatas de *Anthonomus grandis*, o principal inseto-praga da cotonicultura brasileira.

## 8. PERSPECTIVAS

Na determinação da toxicidade das proteínas Cry recombinantes (deste trabalho) de *Bt* contra insetos de grande importância econômica para a agricultura brasileira é possível elaborar estudos futuros na fabricação de bioinseticidas com maior espectro de ação, para serem usados no controle de insetos-pragas. Além disso, a expressão das proteínas Cry separadamente, utilizando o baculovírus como vetor de expressão permitirá desenvolver estudos de sinergismos e antagonismo das proteínas Cry e posteriormente elaborar uma melhor combinação entre as proteínas Cry para o controle desses organismos.

A observação de que diferentes espécies de insetos têm adquirido resistência a produtos químicos, torna necessário o estudo e o isolamento e a identificação de novas proteínas de *Bt*. Além dos estudos sobre expressão gênica, espectro de ação e especificidade das toxinas Cry, o que permitirá a disponibilização freqüente de novas versões gênicas mais eficazes, mais específicas e com vantagens ainda maiores sobre as práticas convencionais de controle, a fim de retardar o surgimento novas espécies de insetos resistentes.

A proteína Cry2Ab pode ser uma alternativa para controle de insetos-praga devido à possibilidade do gene *cry2Ab* ser incorporado no genoma de plantas com elevado potencial econômico. Resultando assim, numa maior eficácia na proteção das plantas.

A suscetibilidade de *A. grandis* para a proteína Cry10Aa poderá resultar em uma nova alternativa no controle deste insto-praga. Principalmente no futuro, a introdução do gene *cry10Aa* no genoma de algodão juntamente com outros genes *cry* poderá resultar numa melhoria na proteção das plantas contra esses organismos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. A Recombinant Truncated Cry1Ca Protein Is Toxic to Lepidopteran Insects and Forms Large Cuboidal Crystals in Insect Cells. **Current Microbiology**, v. 53, p. 287–292, 2006.

ARANTES, O., LERECLUS, D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, v. 108, p. 2647-2651, 1991.

ARIF, B.M. The structure of the viral genomic. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 131, p. 21-29, 1986.

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

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

BARTON, K.A., WHITELEY, H.R., YANG, N.S. *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.

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

BELFIORE, C.J., VADLAMUDI, R.K., OSMAN, Y.A., BULLA JR, L.A. Specific bind protein from tenebrio molitor for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. Tenebrionis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 200, p. 359-364, 1994.

BEN-DOV, E., G. NISSAN, N. PELLEGG, R. MANASHEROB, S. BOUSSIBA, ZARITSKY, A. Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. **Plasmid**, v. 42, p. 186–191. 1999.

BENCHIMOL, M., ATTIAS, M., SILVA, N.L.C., CARVALHO, T.M.U. **Métodos de estudo da célula**. Fenorte/UENF. 1996, p.125.

BETZ, F.S., HAMMOND, B.G., FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insects pest. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156-173, 2000.

BERRY, C., O'NEIL S., BEN-DOV, E., JONES, A.F., MURPHY L, QUAIL, M. A., HOLDEN, M.T., HARRIS, D., ZARITSKY, A. PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5082–5095, 2002.

BIETLOT, H.P.L., VISHNUBHA, T.L.A, I., CAREY, P.R., POZSGAY, M., KAPLAN, H. Characterization of the cysteine residues and disulfide link ages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 309-315, 1990.

BOBROWSKI, V.L., FIÚZA, L. M., PASQUALI, G., BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Revista Ciência Rural**, v. 34, p. 843-850, 2003.

BOBROWSKI, V.L, PASQUALI, G., ZANETTINI, M.H.B., FIUZA, L.M. Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 105–109, 2003.

BOSCH, D., SCHIPPER, B., VAN DER KLEIJ, H., DE MAAGD, R.A., STIEKEMA, W.J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **Bio/Technology**, v.12, p. 915–918, 1994.

BRADLEY, D., HARKEY, M.A., KIM, M.K., BREVER, D., BAUER, L.S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p.162-173, 1995.

BRAVO, A., AGAISSE, H., SALAMITOU, S., LERECLUSE D. Analysis of *cryIAa* expression in sigE and SigK mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular and General Genetics**, v. 250, p. 734-741, 1996.

BRAVO, A., HENDRICKK, K., JANSENS, S., PEFEROEN, M. Immunocytochemical analyses of specif binding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepdopteran an coleopteran midgut membranes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 247-253, 1992.

BRAVO, A., JANSENS, S., PERFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992.

BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. Modo of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxicon**, v.xx, p.xx, 2007.

BROWN, K.L., WHITELEY, H.R. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 549-557, 1992.



BURGES, H. D., HURST. J. A. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.30, p.131–139, 1978.

CARAMORI, T., ALBERTINI, A.M., GALIZZI, A. In vivo geration of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encodings genes. **Gene**, v. 98, p. 37-44, 1991.

CHANG, J.H., CHOI, J.Y., JIN, B.R., ROH, J.Y., OLSZEWSKI, J.A., SEO, S.J., O'REILLY D.R., JE, Y.H. Improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 30-37, 2003.

CHEN, Z, LI, C., LIU, J., ZHANG, J., HUANG, D. Expression and insecticidal activities analysis of silent gene *cry2Ab3* from *Bacillus thuringiensis* C002 strain. **Weishengwu-Xuebao**, v. 42, p. 561-566, 2002.

CHEN, Z.Y., JIE, X.W., SONG, F.P., DA G.Y., HUANG, F. Cloning of Bt cry Genes by rapid screening of DNA libraries with PCR-RFLP. **Agricultural Sciences in China**, v. 2, p. 132-136, 2003.

CHENG, J., BOLYARD, M.G., SAXENA, R.C., STICKLEN M.B. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Plant Science**, v. 81, p. 83-92, 1992.

CHENG, X., SARDANA, R., KAPLAN, H., ALTOSAAR, I. Agrobacteria-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 2767-2772, 1998.

CHITKOWSKI, R.L., TURNIPSEED, S.G., SULLIVAN, M.J., BRIDGES W.C. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 755-762, 2003.

CRICKMORE, N., BONE, E.J., WILLIAMS, J.A., ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 249–254, 1995.

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

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., BRAVO, A., DEAN D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em : [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acesso em:20 set 2006.

DANKOCSIK, C., DONOVAN, W.P., JANY, C.S. Activation of cryptic protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 2087-2094, 1990.

DE BARJAC, H., BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, v. 7, p. 5-31, 1962.

DE COSA, B., MOAR, W., LEE, S.B., MILLAR, M., DANIEL, H. Over expression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 71-74, 2001.

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

DE MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N., SCHNEPF, E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409-433, 2003.

DE MAAGD, R.A., BOSCH, D., STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, v. 4, p. 9-13, 1999.

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

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

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

DRIKS, A. Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 59, p. 389-391, 2002.

DU, C., NICKERSON, K. W. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2932–2939, 1996.

ELLIS, R.T., STOCKHOFF, B.A., STAMP, L., SCHNEPF, H.E., SCHWAB, G.E., KNUTH, M., RUSSELL, J., CARDINEAU, G.A., NARVA, K.E. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1137-1145, 2002.

ENGELHARD, E.D., KAM-MORGAN, L.N.W., WASHBURN – VOLKMAN, L. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autrogreapha californica* nuclear polydrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 3224-3227, 1994.

ERRIGTON, J. *Bacillus subtilis*: paradigm for the spatial and temporal control of gene expression. In: RUSSO, V.E.A., BRODY, COVEY, D., OTTOLENI, S. (Eds.): **Development the molecular genetic approach**. Springer-Verlag.1992. p. 28-44,

ERRIGTON, J. *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 1-33, 1993.

ERRIGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p.117-126, 2003.

ESTRUCH, J. J., WARREN, G., MULLINS, M., NYE, G., CRAIG, J., KOZIEL, M. 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**, v.93, p.5389–5394, 1996.

FEITELSON J.S. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: KIM L. (ed.). **Advanced engineered pesticides**. Marcel Dekker.1992. p. 63-71,

FERRE, J., VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501–533, 2002.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**, Cambridge University Press. 1971.

FISCHHOFF, D.A. Insect tolerant tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FUJIMOTO, H., ITOH, K., YAMAMOTO, KYOZUKA, J., SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Bio/technology**, v. 11, p. 1151-1155, 1993.

GE, B., BIDESHI, D., MOAR, J.W., FEDERICI, B.A. Differential effects of helper proteins encoded by the *cry2A* and *cry11A* operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, p. 35-41, 1998.

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

GONZÁLES, J.M., DULMAGE H.T., CARLTON B.C. Correlation between specific plasmid and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**, v. 11, p. 351-365, 1981.

GORE, J., ADAMCZYK, J.J., BLANCO, C.A. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 88-94, 2005.

GOULD, F., ANDERSON, A., REYNOLDS, A., BUMGGARNER, L., MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F., MARTINEZ-RAMIREZ, A., ANDERSON, A., FERRE, J., SILVA, F.J., MOAR, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 7986-7990, 1992.

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

GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. **The biology of baculovirus**. CRC press.1986. p.205.

GRANADOS, R.R., WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculovirus In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A (eds.). **The biology of baculovirus**. CRC press.1986. p. 89-108.

GREENPLATE, J.T., MULLINS, J.W., PENN, S.R., DAHM A., REICH B.J., OSBORN J.A., RAHN P.R., RUSCHKE L., SHAPPLEY Z.W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 340–347, 2003.

GROCHULSKI, P. MASSON, L. BORISOVA, S. PUSZTAI-CAREY, M., SCHWARTZ, J.L., BROUSSEAU, R., CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin – crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.

GUERCHICOFF, A., UGALDE, R. A., RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2716–2721, 1997.

HAIDER, M.Z., ELLAR, D.J. Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin: Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 208, p.183-194, 1989.

HAMMOCK, B.D., BONNING, B.C., POSSEE, R.D., HANZLIK, T.N., MAEDA, S. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. **Nature**, v. 344, p. 458-461, 1990.

HANSEN, B.M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F., DELÉCLUSE, A., NIELSEN- LEROUX, C. (Eds.): **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers. 2000. p.41-64.

HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. p.471-504.



HOFFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HOFTE, J., VAN RIE, J., JANSSENS, H., MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HOFTE, H., WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v.53, p. 242-255, 1989.

HONÉE, G., VAN DE SALM, T., VISSER, B. Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *B. thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding of toxin highly active Spodoptera specie. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 6240, 1988.

HORTON, H.M., BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

HUGHES, P.R., WOOD, H.A., BREEN, J.P., SIMPSON, S.F., DUGGAN, A.J., DYBAS, J.A. Enhanced bioactivity of recombinant baculovirus expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pest. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 112-118, 1997.

IHARA, H., KURODA, E., WADANO, A., HIMENO, M. Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Biochemic biotechnology Biochemic**, v. 57, p. 200–204, 1993.

ITO, A., SASAGURI, Y., KITADA, S., KUSAKA, Y., KUWANO, K., MASUTOMI, K., MIZUKI, E., AKAO, T., OHBA, M. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 21282-21286, 2004.

ITO, T., IKEYA, T., SAHARA, K., BANDO, H., ASANO, S. Cloning and expression of two crystal protein genes, cry30Ba1 and cry44Aa1, obtained from a highly mosquitocidal strain, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* INA288. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5673-5676, 2006.

JAIN, D., UDAYASURIVAN, V., ARULSELVI, P.I., DEV, S.S., SANGEETHA, P. Cloning characterization and expression of new Cry2Ab gene from *Bacillus thuringiensis* strain 14-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, p. 185-94, 2006.

JOHNSON, D.E., McGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Current Microbiology**, v. 33, p. 54-49, 1996.

KALMAKOFF & WARD. 2003. **Baculoviruses**. Disponível em: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/baculo.html>, acesso novembro 2006.

KITTS, P.A, AYRES, M.D, POSSEE, R.D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery recombinant virus expression vector. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 5667-5672, 1990.

KNOLWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Advances in insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KNOWLES, B.H., ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin with different insect specificity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 924, p.509-518, 1987.

KONGSUWAN, K., GOUGH, J., KEMP, D., MCDEVITT, A., AKHURST, R. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* endotoxin, Cry47Aa, from strains that are toxic to the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 127-136, 2005.

KOTA, M., DANIEL, H., VARMA, S., GARCZYNSKI, S. F., GOULD, F., MOAR W.J. Over expressaion of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplast confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96 p. 1840-1845, 1999.

KOZIEL, M.G., BELAND, G.L., BOWMAN, C., CAROZZI, C.. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

KRONSTAD J.W., WHITELEY H.R. Diversity of locations of *Bacillus thuringiensis* protein genes. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 419-428, 1981.

KRYWUNCZYR, J., FAST P.G. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140, 1980.

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

LAMBERT, B., HOFTE, H., ANNYS, K., JANSENS, S., SOETAERT, P. PEFFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2536-2542, 1992.

LEE, M.K., YOU, T.H., YOUNG, B.A., COTRILL, J.A., VALATIS, A.P., DEAN, D.H. Aminopeptidase N purified from Gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor of the Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2845-2849, 1997.

LERECLUS, D., AGAISSE, H., GOMINET, M., CHAUFAX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spOA mutant. **Bio/Technology**, v. 13, p. 67-71, 1995.

LERECLUS, D., AGAISSE, H., GRANDVALET, C., SALAMITOU, S., GOMINET, M. Regulation of toxin virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 290, p. 295-299, 2000.

LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADET. M.M., KLIER, A., RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: ISSAR SMITH, R., SLEPECKY, A., SETLOW, P. (Eds.): **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology. 1989. p. 71-88.

LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A., LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE P.F., CORY J.S., BAILEY M.J., AND HIGGS, S. (Eds.): ***Bacillus thuringiensis*, a invironmental biopesticide: theory and pratice**. John Wiley & Sons Ltd. 1993. p. 37-69.

LEVINSON B.L. High-performance liquid chromatography analysis of two beta – exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* Strains In: HICKLE L.A E FITCH W.L (Eds): **Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis***. American Chemical Society.1990. p.115-136.

LI, J., CARREL, J., ELLAR, D.J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353, p. 815-821, 1991.

LIANG, Y., PATEL S. S., DEAN D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 24719–24724, 1995.

LIÃO, C., HECKEL, D.G., AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 55-63, 2002.

LIN, C.H., CHEN, Y.Y., TZENG, C.C., TSAY, H.S., CHEN, L.J. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryICa* gene in plastid confers high insecticidal efficacy against tobacco cutworm - a *Spodoptera* insect. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 44, p. 199-210, 2003.

LÖVGREN A., ZHANG M.Y., ENGSTRÖM A., DALHAMMAR G., LANDÉN R. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**. v.4, p. 2137-2146, 1990.

LUCKOW V.L., SUMMERS, M.D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Bio/Technology**, v. 6, p. 47-55, 1988.

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

LUTHY P., WOLFERSBERGER, M.G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In CHARLES J.F., DELECLUSE A., NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds.) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers, 2000. p.167-180.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolutions of taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, p. 295-298, 1983.

MAIORELA, B., INLOW, D., SHAUGER, A., HARRANO, D. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. **Biology technology**, v.6, p.1406-1410, 1988.

MARTENS, J.W., HONEE, G., ZUIDEMA D., VAN LENT J.W.M., VISSER B., VLAK J.M. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2764-2770, 1990.

MARTENS, J.W., KNOESTER, M., WEIJTS, F., GROFFEN, S.J., HU, Z., BOSH, D., VLAK, J.M. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, p. 249-257, 1995.

MARTINS, E.S. **Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga**. Brasília: UNB, 2005. 130p. Dissertação Mestrado.

MARTÍNES O, J.W. Evaluación de la toxicidad de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A. CERON, J. (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico**. Bogotá. 2004. p.207-232.

MARUNIAK, A.G, MARUNIAK, J.E, ZANOTO, P.M., DOUMBOUYA, A.E., LIU, J.C, MERRITT, T.M, LANOIE, J.S. Sequence analysis of the genome of the neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 7036-7051, 2004.

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

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

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

MONNERAT, R.G., BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* modo de ação e resistência. In: MELO, I.S. AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, 2000, p.163-200.

NAYAK, P., BASU, A., GROUSH, D., RAMAKRISHNAN, N.A., GROSH, M., SER, S.K. Transgenic elite indica rice plants expressing Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistente against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 2111-2116, 1997.



- O'REILLY, D.R., MILLER, L.K., LUCKOW, V.A. **Baculovirus expression vectors.** A Laboratory Manual, Freeman. 1992. p. 345.
- OEDA, K., INOUE, K., IBUCHI, Y., OSCHIE, K., SHIMIZU, M., NAKAMURA, K., NISHIOKA, R., TAKADA, Y., OHKAWA, H. Formation of crystals of the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* IPL7 in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 3568-3571, 1988.
- OKUMURA, S., SAITOH, H., WASANO, N., KATAYAMA, H., HIGUCHI, K., MIZUKI, E. INOUE, K. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 144-151, 2006.
- PANG, Y., FRUTOS, R., FEDERICI, B.A. Synthesis and toxicity of full length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells a baculovirus vector. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 89-101, 1992.
- PÉRES, V.J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A. CERON, J. (Eds): **Bacillus thuringiensis en el control biológico**. Bogota. 2004. p. 207-232.
- PERLAK, F.J., DEATON, R.W., ARMSTRONG T.A., FUCHS, R.L., SIMS, S.R., GREENPLATE, J.T., FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 939-943, 1990.

PIETRANTONIO, P.V., GILL, S.S. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action of the insect midgut. In: LEHANE, M.J., BILLINGSELY, P.F. (Eds): **Biology of the insect midgut**. Chapman & Hall. 1996, p.345-372.

RAJAMOHAN, F., ALZATE O., COTRILL J. A., CURTISS A., DEAN D. H. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 14338–14343, 1996.

RAJAMOHAN, F., COTRILL J. A., GOULD F., DEAN D. H. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab d-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 2390–2396, 1998.

RAVOAHANGIMALALA, O., CHARLES, J.F., SCHOELLER-RACCAUD, Y.J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera). **Research in Microbiology**, v. 44, p. 271-278, 1993

RIBEIRO, B.M., CROOK, N.E Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cryIAb* and *cryIAc* genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 763-769, 1998.

RIBEIRO, B.R, CROOK, N.E. Expression of full length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 121-130, 1993.

RODRIGUES J.C.M., DE SOUZA M.L., O'REILLY D.R., VELOSO L.M., PINEDO F.J.R., RAZUCK F.B., RIBEIRO B.M Characterization of the Ecdyteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus*. **Virus Genes**, v. 22, p. 103-113, 2001.

ROSSO, M.L., DELÉCLUSE A. Distribution of the insertion element IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains. **Current Microbiology**, v. 34. p. 348–353, 1997.

ROUSH, R.T., SHELTON, A.M. assessing the odds: The emergence of resistance to Bt transgenic plants. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 816-817, 1997.

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

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**. A laboratory manual, 3 ed. Cold Spring Harbor. 2001.

SANCHIS, V., LERECLUS, D., MENOUE, G., CHAUFAX, J., LECADET, M.M. Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 393-404, 1998.

SARFRAZ, M. Interaction between diamondback moth and *Bacillus thuringiensis*. **Outlooks Pest Manag**, v. 5, p. 167–171, 2004.

SCHNEPF, H.E., WHITELEY, H.R. Protein toxins of *Bacilli*. In: HOCH, J.A., SETLOW, Y. (Eds): **Molecular biology of microbial differentiation**. American Society for Microbiology. 1985. p.209-216.

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

SHIVAKUMAR, A.G., GUNDLING, G.J., BENSON, T.A., CASUTO, D., MILLER, M.F., SPEAR, B.B. Vegetative expression of the delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 194-204, 1986.

SMITH, G. P., MERRICK, J. D., BONE. E.J., ELLAR, D.J. Mosquitocidal activity of the Cry1C  $\delta$ -endotoxin form *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.680-684, 1996.

SMITH, G.E., FRASER, M.J., SUMMERS, M.D. Molecular engineering of the *Autographa californica nuclear polyedrosis virus* genome: deletion mutations the polyhedron gene. **Journal of Virology**, v. 46, p. 584-493, 1983.

STAPLES, N., ELLAR, D., CRICKMORE, N. Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. **Current Microbiology**, v. 42, p.388–392, 2001.

STEWART, C.N., ADANG, M.J., ALL, J.N., BOERMA, H.R., CARDINEAU, G., TUCKER, D., PARROTT, W.A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Pathology**, v. 112, p. 121-129, 1996.

STRATIGER, P., LOSICK, R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Genetics**, v. 30, p. 297-341, 1996.

TABASHINK, B.E., DENNEHY T.J., SIMS, M.A., LARKIN, K., HEAD G.P., MOAR W.J., CARRIERE, Y. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68. p. 3790-3794, 2002.

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

THORNE, L., GARDUNO, F., THOMPSON, T., DECKER, D., ZOUNES, M., WILD, M., WALFIELD, A.M., POLLOCK, T.J. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki and israelensi*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 801-811, 1986.

TOLEDO, D.M., BRODSKY, H.A., PARDO, G.E., CONCI, O., BRAGA SOBRINHO, R. **Monitoreo del picudo del algodono (*Anthonomus grandis* Bh) em el Noreste Argentino**. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Cientificas y Tecnológicas, 2000.

VADLAMUDI, R. K., WEBER E., JI, I., JI, T.H., BULLA, J.R.L.A. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5490–5494, 1995.

VALADARES-INGLIS, M.C.C., SOUZA M.T., SHILER, W. Engenharia genética de microrganismo agentes de controle biológico. In: MELO I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds). **Controle biológico**. EMBRAPA: Jaguariúna, 1998. p.102-225.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A, MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. **Virus taxonomy classification and nomenclature of virus**. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VAN RIE, J., JANSENS, S., HOFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, p. 239–247, 1989.

VOLKMAN, L.E., KEDDIE, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v. 1, p. 249-256. 1990.

WANG, G., ZHANG, J., SONG, F., WU, J. FENG, S., HUANG, D. Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.xx, p.xx, 2006.

WANG, X., OOI, B.G., MILLER, L.K. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. **Gene**, v. 100, p. 131-137, 1991.

WIDNER, W.R., WHITELEY, H.R. Two highly related crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* possess different host range specificities. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 65-974, 1989.

WIRTH, M.C., DELÉCLUSE, A., WALTON, W.E. Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3280–3284, 2001.

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

WOLFERSBERG, M. G. Permeability of *Bacillus thuringiensis* CryI toxin channels. In CLARK, J. M. (ed.), **Molecular action of insecticides on ion channels**. American Chemical Society. 1995. p. 256-360.

WOLFERSBERG, M. G., CHEN X. J., DEAN D. H. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 279–282, 1996.

WU, D., CAO, X.L., BAI Y.Y., AROSON A.L. Sequencing of an operon containing a novel  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 81, p. 31-36, 1991.

WU, D., FEDERICI, B.A. Improved production of the insecticidal cryIV protein in *Bacillus thuringiensis* using (*cryIAC*) promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 697-702, 1995.

XUE, J.L., CAI, Q.X., ZHENG, D.S., YUAN, Z.M. The synergistic between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 460-465, 2005.



YAMASHITA, S., KATAYAMA, H., SAITOH, H., AKAO, T., PARK, Y.S., MIZUKI, E., OHBA, M., ITO, A. Typical three-domain cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. **Journal of Biochemistry**, v. 138, p. 663-672, 2005.

YOKOYAMA, T., TANAKA, M., HASEGAWA, M. Novel cry gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain Semadara inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 25-32, 2004.

ZHANG, M.Y., LÖVGREN, A., LOW, M.G., LANDÉN, R. Characterization of a virulent pleiotropic mutant of insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipase. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4947-4954, 1993.

ZHANG, J., HODGMAN, T.C., KRIEGER, L., SCHINETTER, W.Y., SCHAIRER, H.V. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p. 4336-4341, 1997.

ZHAO, J.Z., CAO, J., COLLINS, H.L., BATES, S.L., ROUSH, R.T., EARLE, E.D., SHELTON, A.M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 8426-8430, 2005.

ZHAO, J.Z., CAO, J., LI, Y., COLLINS, H.L., ROUSH, R.T., EARLE, E.D., SHELTON, A.M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1493-1497, 2003.

## ANEXOS

### Meios de cultura

Meio de cultura para células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4)

- Meio TC-100 (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS)

### Meios para cultura e soluções para *E. coli*:

#### A-Meio LB (1 litro)

Componentes	Quantidade (1 litro)
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
pH	7.0

**\*Para preparo do meio sólido adicionar 15 g de Agar bacteriológico**

#### B-Meio SOB:

Componentes	Quantidade
Triptona	2%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
pH	7.0

**Meio SOC:**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Meio SOB</b>	
<b>Glicose</b>	20 mM

**Soluções de preparo de células competente (DH5 $\alpha$ )****A - Solução RF1 (pH 5,8)**

<b>Componentes</b>	<b>g/100mL</b>
RbCl	1,2
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O 50mM	1,0
Acetato de potásio 30 mM	3 mL de estoque de 1M
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 10 mM	1,5
Glicerol 15% (p/v)	15 ml de estoque de 100%

**B-Solução RF2 (pH 6,8)**

<b>Componentes</b>	<b>g/100mL</b>
MOPS 10 mM	2 mL do estoque 0,5 M
RbCl 10 mM	0,12
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 75 mM	1,1
Glicerol 15% (p/v)	15 % (p/v)

### **Soluções e tampões para gel de agarose**

#### **Tampão de corrida 5x para gel de agarose (Tris-borato, TBE):**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
EDTA	0,01 M
Tris base	0,45 M
Ácido bórico	0,45 M

#### **Tampão de amostra de DNA para gel de agarose 6X**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Glicerol	30%
Azul de bromofenol	0,25%
Xileno cianol	0,25%

#### **Solução Corante para gel de agarose**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Água destilada	100 Ml
Brometo de etídio	0,5 µg/ mL

**Soluções e tampões para gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)****Tampão de corrida 5x**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Glicina	9 g
Tris base	43,2 g
SDS	3 g
H <sub>2</sub> O	600 mL

**Tampão de amostra 2X**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8	1,0 mL
SDS 10% (w/v)	1,6 mL
β-mercaptoetanol	0,4 mL
Glicerol	0,8 mL
Azul de bromofenol 1% (w/v)	0,4 mL
H <sub>2</sub> O	8,0 mL

**GEL Separador 12% volume final de 10 mL**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Acilamida/bis acilamida	4,0 mL
Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfato de amônio 10%	100 µL
TEMED	4,0 µL
H <sub>2</sub> O	3,3 mL

### **Gel concentrador volume final de 10 mL**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Acrilamida/bis acrilamida	0,83 mL
Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8	0,63 mL
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amônio 10%	50 µL
TEMED	5 µL
H <sub>2</sub> O	3,40 mL

### **Tampões de transferência para membrana nitrocelulose**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Tris base	6 g
Glicina	3 g
SDS	0,37g
Metanol	200 mL
H <sub>2</sub> O qsp	1 L

- **Tampão de transferência (metanol 20% (v/v) em tampão Tris/glicina 1X)**

### **Soluções de bloqueio, incubação com anticorpo e detecção.**

#### **- Tampão da fosfatase alcalina**

Tampão fosfato salina – PBS 10X

Tris-HCL 1M – pH 7,5

NaCl                    5M

### **- Solução de bloqueio**

BSA (soro albumina bovino) 3% (p/v) em PBS

Leite em pó desnatado 5% (p/v) (leite molico) em PBS

Gelatina 3% (p/v) em PBS

### **-Solução de incubação de anticorpo**

BSA 1% (p/v) em PBS

Leite desnatado 1% (p/v) em PBS

Gelatina 1% (p/v) em PBS

### **Soluções para detecção com fosfatase alcalina**

#### **Tampão de revelação**

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Tris-HCL 1M, Ph 9,5	100 MI
NaCl 5M	20 MI
MgCl 1M	5 MI
H <sub>2</sub> O	1 Litro

- Solução de estoque NBT (*Nitro blue tetrazolium*): NBT 50 mg/MI em dimetil formamida 70% (v/v).

- Solução de estoque BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato): BCIP 25 mg/MI em dimetil formamida. Estocar a 4° C, em frasco escuro. Estável por um ano.

-EDTA 20 Mm, Ph 8,0 em PBS 1X

## GLOSSÁRIOS

Amp	Ampicilina
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxrribunúcleico
EDTA	ditiotreitól
Dh <sub>2</sub> O	Água destilada
Dntp	Deoxinucleotídeos
g	grama
h.p.i	Horas após infecção
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilo base = 1000 pares de base
KCl	Cloreto de potássio
kDa	quilodalton
M	Molar: mol/Ml
mg	miligrama
μg	micrograma
Ml	Militro
μL	Microlitro
μM	Micromolar (micromol por litro)
Mm	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio



ng	Nanograma = 10 <sup>9</sup>
pb	Pares de base
p/v	Peso/volume
RNA	Ácido ribonucléico
RNASE	Ribonuclease
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio – Gel electrophoresis poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades enzimáticas
v/v	Volume/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopirásídeo
vSyngal	Vírus com gene β-galactosidase no locus do gene da poliedrina
vSynCry1Ca	Vírus recombinante da proteína Cry1Ca
vSynCry2Ab	Vírus recombinante da proteína Cry2Ab
vSynCry10Aa	Vírus recombinante da proteína Cry10Aa
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Transcriptase reversa-Reação de PCR
DH5α	Linhagem de células de <i>E. coli</i>
BTI	Promotores de <i>B. thuringiensis</i>
BV	Budded Vírus – vírus extracelular

ORF

Região aberta de leitura

Bti

*Bacillus thuringiensis israelensis*

OB

Vírus oclusos