

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR



**Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas
Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em
baculovírus recombinantes**

ROBERTO FRANCO TEIXEIRA CORRÊA

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-orientadora: Dra. Rose Gomes Monnerat

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR



**Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas
Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em
baculovírus recombinantes**

ROBERTO FRANCO TEIXEIRA CORRÊA

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro
Co-orientadora: Dra. Rose Gomes Monnerat

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 2007

À minha família

Aos meus amigos e amados

Ao meu orientador, Professor Bergmann

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Centro de Zoonose-DF

Ao Professor Bergmann, obrigado pela oportunidade e pela orientação.

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

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

Ao Brasil.

ÍNDICE

OFERECIMENTO	iii
AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.2 - Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.2.1 - α -exotoxina	7
2.2.2 - β -exotoxina	7
2.2.3 - Vip3A	8
2.2.4 - δ -endotoxinas	9
2.3 - Modo de ação das proteínas Cry	16
2.4 – Receptores	18
2.5 - Regulação da transcrição dos genes cry	19
2.5.1 - Expressão de genes dependentes da esporulação	19
2.5.2 - Genes não dependentes da esporulação	21

2.5.3 - Mecanismos pós-transcricionais	21
2.6 - Proteínas da classe Cry4	22
2.7 – Baculovírus	24
2.7.1 - Infecção e colonização	25
2.7.2 – Baculovírus como vetor de expressão	28
3 – OBJETIVO	33
3.1 – Estratégias	33
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 - Vírus e células	34
4.2 - Manipulação do DNA	34
4.3 - Amplificação, clonagen e seqüenciamento dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i>	35
4.4 - Construção dos vetores de transferência	37
4.5 - Construção, por recombinação homóloga, e isolamento dos baculovírus recombinantes expressando genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i>	37
4.6 - Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene <i>cry4Aa</i>	40
4.7 - Análise transcricional dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i> em células de inseto	40
4.8 - Expressão das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto	42
4.9 - Análise das proteínas Cry heterólogas obtidas de lagartas de terceiro instar de <i>S. frugiperda</i> infectadas com os vírus recombinantes	42
4.10 - Purificação de cristais de <i>Bt</i> por gradiente de sacarose	43
4.11 – Bioensaios com as proteínas recombinantes	44

5 – RESULTADOS	46
5.1 - Clonagem e seqüenciamento dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i>	46
5.2 - Construção dos vetores de transferência e dos baculovírus recombinantes	55
5.3 - Análise transcricional dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i>	58
5.4 - Expressão das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba de baculovírus recombinantes em células de inseto	59
5.5 - Expressão de proteínas Cry recombinantes em larvas de terceiro instar de <i>S. frugiperda</i>	60
5.6 - Bioensaios	63
6 – DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Figura 2 - Microscopia de contraste de fase de <i>B. thuringiensis</i>	6
Figura 3 - Representação esquemática da toxina Cry3A	10
Figura 4 - Alinhamento da estrutura das toxinas Cry	15
Figura 5 - Representação esquemática do modo de ação de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
Figura 6 - Micrografia eletrônica de baculovírus	25
Figura 7 - Esquema do ciclo de infecção por baculovírus desenvolvida em insetos susceptíveis	27
Figura 8 - Esquema ilustrativo da construção e isolamento de baculovírus recombinantes pelo método de recombinação homóloga	30
Figura 9 - Esquema ilustrativo da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição	31
Figura 10 - Construção dos vetores de transferência	38
Figura 11 - Esquema da clonagem dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i> e eletroforese em gel a 0,8% mostrando as digestões dos vetores de clonagem pGemcry4Aa e pGemcry4Ba	47
Figura 12 – Análise da seqüência do gene <i>cry4Aa</i>	48
Figura 13 – Análise da seqüência do gene <i>cry4Ba</i>	51
Figura 14 – Análise da inserção correta dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i> nos vetores de transferência e vírus recombinantes	56
Figura 15 – Microscopia de luz invertida de células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas com baculovírus recombinantes após setes dias de infecção	57

Figura 16 – Análise transcricional dos genes <i>cry4Aa</i> e <i>cry4Ba</i> em células de inseto com os baculovírus recombinantes	59
Figura 17 - Análise da expressão das proteínas recombinantes Cry4Aa e Cry4Ba em células de inseto infectadas com os baculovírus recombinantes	61
Figura 18 - Análise da expressão das proteínas recombinantes Cry4Aa e Cry4Ba em lagartas de <i>S. frugiperda</i> infectadas com os vírus recombinantes	62
Figura 19 – Análise da expressão e quantificação das proteínas recombinantes Cry4Aa e Cry4Ba	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Organização das classes de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
Tabela 2 – Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho	36
Tabela 3 – Concentração final do bioensaio de dose com as proteínas Cry4Aa e Cry4Ba	45
Tabela 4 – Concentração final do bioensaio de dose com o controle positivo à base de <i>Bti</i>	45
Tabela 5 – Resultado da CL ₅₀ das proteínas	65

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Amp	resistente à ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
BtI	promotores de <i>B. thuringiensis</i>
cDNA	DNA complementar
CL ₅₀	Concentração letal para 50% da população
EDTA	ditiotritol
EGTA	cido tetraacético etilenoglicol
dH ₂ O	gua destilada
dNTP	Desoxinucleotídeos
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
Gentam.	Gentamicina (antibiótico)
h.p.i.	horas pós-infecção
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase = 1000 pares de base
kDa	quilodalton
μ l	microlitro
M	molar: mol/L
mg	miligrama
μ g	micrograma = 10 ⁻⁶ grama

mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma = 10^{-9} grama
pb	pares de base
PCR	reação de polimerase em cadeia
RT-PCR	transcriptase reversa-Reação de PCR
pH	potencial de hidrogênio
pfu	unidade formadora de placa
PMSF	fenilmetanosulfonilfluoreto (inibidor de proteases)
Ppolh	promotor do gene da poliedrina
Psyn	promotor sintético derivado do promotor do gene da poliedrina
PXIV	promotor derivado do promotor do gene da poliedrina
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS
Tn7L e Tn7R	elementos de transposição sítio-específica
Tris	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
U	unidade enzimática
vSynVI-gal	vírus com gene β -galactosidase no locus do gene da poliedrina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

Os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, pertencentes a diferentes estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis*, S1806 e S1989, respectivamente, foram amplificados por PCR e clonados em um vetor de clonagem. A análise do seqüenciamento do gene *cry4Aa* mostrou alta identidade com outras seqüências do gene já descritas e este foi clonado tanto no vetor de transferência pSynXIVVI+X3, como no pFastBac[®]1 para expressão e análise da toxicidade da proteína heteróloga a partir dos baculovírus construídos por recombinação homóloga, vSyncry4Aa, e por transposição sítio-específica, vBacCry4Aa. O gene *cry4Ba* foi introduzido no vetor pSynXIVVI+X3 dando origem, por recombinação homóloga, ao baculovírus recombinante vSyncry4Ba. Os vírus recombinantes, derivados de recombinação homóloga, foram isolados em placas de 96 poços, enquanto o vírus recombinante obtido por transposição foi isolado de colônias de células de *Escherichia coli* DH10Bac[™] crescidas em placas de Petri contendo antibióticos, X-Gal e IPTG. Células de inseto BTI-TN5B1-4 foram infectadas com os vírus recombinantes isoladamente e mRNA derivados dos extratos celulares (72 h.p.i.) analisados por RT-PCR, para confirmação da expressão e presença de transcritos específicos para os genes. Extratos de larvas de *Spodoptera frugiperda*, infectadas com os vírus recombinantes (120 h.p.i.) foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrando a presença de bandas de aproximadamente 128 e 130 kDa correspondentes aos tamanhos das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba, respectivamente. Possíveis cristais das proteínas recombinantes foram observados por microscopia de luz. Bioensaios com os extratos de insetos infectados mostraram-se tóxicos para larvas de segundo instar de *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

The *cry4Aa* and *cry4Ba* genes from Brazilian strains of *Bacillus thuringiensis*, S-1806 and S-1989, respectively, were amplified by PCR, cloned into a plasmid cloning vector and sequenced. Sequence analysis of the *cry4Aa* gene showed high identity to previous known *cry* genes and it was cloned into both pSynXIVVI+X3 and pFastBac[®]1 transfer vectors for expression and toxicity analysis of the heterologous proteins derived from the recombinant baculoviruses constructed by homologous recombination (vSynCry4Aa) and transposition (vBacCry4Aa). The *cry4Ba* gene was introduced into the transfer vector pSynXIVVI+X3/3 resulting in the construction of the recombinant virus vSynCry4Ba by homologous recombination. The recombinant viruses, derived from homologous recombination, were isolated by serial dilution in 96 well plates while the recombinant virus produced by transposition was isolated from *Escherichia coli* (DH10Bac[™]) colonies grown on Petri dishes containing antibiotics, X-Gal and IPTG. Insect cells BTI-TN5B1-4 were separately infected with the recombinant viruses and mRNA from cell extracts (72 h.p.i.) analysed by RT-PCR, in order to confirm the presence of the genes specific transcripts. Recombinant viruses infected insect extracts (120 h p.i.) were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showing the presence of polypeptide bands of around 128 and 130 kDa, corresponding, respectively to the sizes of the proteins Cry4Aa and Cry4Ba. Putative crystals from the recombinant proteins were observed by light microscopy. Bioassays with virus-infected insect extracts were shown to be toxic to second instar *Aedes aegypti* larvae.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O controle de insetos vetores de doenças humanas é um dos aspectos mais relevantes em saúde pública, na atualidade, principalmente nos grandes centros urbanos com crescimento demográfico não controlado e falta de saneamento básico adequado. Este tipo de ambiente é favorável ao desenvolvimento de insetos transmissores de doenças para o homem.

Na década de 80, com o surgimento de novas técnicas, especialmente aquelas voltadas para a tecnologia do DNA recombinante, e manifestações públicas a respeito do uso abusivo dos inseticidas convencionais, levaram a um aumento, cada vez mais crescente, do interesse dos órgãos de pesquisa e indústrias sobre a utilização de microorganismos como alternativa biológica no controle de insetos prejudiciais à agricultura e à saúde pública.

Bacillus thuringiensis (Bt)

Entre os agentes microbianos, com atividade entomopatogênica, destaca-se o *Bacillus thuringiensis (Bt)*, uma bactéria aeróbia, gram-positiva, da família Bacillaceae caracterizada pela produção, no momento da esporulação, de inclusões protéicas cristalinas que são tóxicas para várias ordens de insetos (Feitelson *et alli*, 1992). Estas inclusões são compostas de uma ou várias proteínas com propriedades inseticidas (δ -endotoxinas) classificadas em duas grandes famílias – toxinas Cry e Cyt – baseado na similaridade de suas seqüências de aminoácidos (Höfte & Whiteley, 1989; Crickmore *et alli*, 1998).

O *Bt* foi inicialmente caracterizado como um patógeno de insetos, e sua atividade inseticida foi atribuída largamente ou completamente (dependendo do inseto) às inclusões protéicas cristalinas. Essa observação levou ao desenvolvimento de bioinseticidas baseados

em *B. thuringiensis* para o controle de certas espécies de insetos dentre as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Schnepf *et alli*, 1998).

B. thuringiensis já é uma alternativa ou suplemento para a aplicação de pesticidas químicos sintéticos na agricultura comercial, manutenção de florestas e controle de mosquitos que são vetores de algumas doenças tropicais como malária e febre hemorrágica viral.

Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é a sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas. Desta forma, esta bactéria não possui efeito poluente ao meio ambiente, pois é inócua a mamíferos, outros vertebrados e às plantas (Whiteley & Schnepf, 1986, OMS, 1987).

Baculovírus

Desde a década de 1980, os baculovírus têm sido extensivamente utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos. A popularidade deste sistema fundamenta-se na combinação de altos níveis de expressão com a habilidade de realizar a maioria das modificações pós-traducionais eucarióticas de maneira autêntica (O'Reilly, 1997). O sistema de expressão de proteínas heterólogas usando baculovírus, baseia-se na introdução de genes no genoma de um baculovírus sob o comando de um promotor forte. Trabalhos anteriores já demonstraram a utilidade do sistema de expressão baseado em células de inseto e baculovírus para a expressão, em grande quantidade, de proteínas Cry similares às proteínas nativas de *B. thuringiensis* (Merryweather *et alli*, 1990; Pang *et alli*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993, 1998; Chang *et alli*, 2003).

Aedes aegypti

O *Aedes aegypti* é um vetor oriundo do continente africano (Chiaravalloti-Neto, 1997). Foi erradicado do Brasil pela primeira vez em 1958, mas, em 1967, reapareceu em

São Luís e Belém, sendo em seguida eliminado (Franco, 1976). Em 1976, com origem em um foco em Salvador, inicia-se a recolonização no Brasil. Em 1977, foi encontrado no Rio de Janeiro e Santos; em 1979, em Natal, e em 1981, no Paraná (Marques, 1985; Neves & Pinho, 1996). Durante esses anos, as medidas de controle eram esporádicas e isoladas. Isso fez com que em 1985-1986, o *A. aegypti* fosse encontrado em praticamente em todos os estados brasileiros (Neves & Pinho, 1996).

O controle do dengue vem sendo um dos maiores desafios na saúde pública do País. Uma alternativa para o controle de seu vetor, o *A. aegypti*, é o uso de formulações à base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* com atividade tóxica para insetos da ordem Diptera, bem como toxinas produzidas por genes pertencentes a esta bactéria.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica, Gram positiva, aeróbia, formadora de esporos, que produz inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação, durante a fase estacionária de seu ciclo de crescimento (Schnepf *et alli*, 1998). 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, 2000) (Figuras 1 e 2).

O *Bt* foi pela primeira vez descrito por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou um bacilo de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado. Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome de *Bacillus thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento deste patógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwata isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease” a partir de larvas mortas de *Bombyx mori* (bicho da seda) (Lepidoptera: Bombycidae). Esta bactéria foi denominada *B. sotto* Ishiwata, mas este nome não foi mantido, sendo substituído pelo nome *B. thuringiensis* (Glare & O’Callaghan, 2000), podendo ser sistematicamente classificada como: Classe: Firmibacteria; Ordem: Eubacteriales; Família: Bacilaceae; Gênero: *Bacillus*; Espécie: *B. thuringiensis*.

A designação *Bacillus thuringiensis* é geralmente empregada para uma única espécie pertencente ao grupo do *B. cereus* que compreende várias espécies (*B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. Weihenstephannensis*). *B. thuringiensis* 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 fosfolipídios, comparação da seqüência 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 & Salameh, 2000; Schnepf *et alli*, 1998).

A primeira formulação à base de *Bt* foi produzida na França em 1938 (Polanczyk & Alves, 2003). Na década de 1950, inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* passaram a ser fabricados na Rússia, Checoslováquia, Alemanha e Estados Unidos (Martins, 2005). Inicialmente, o produto foi utilizado somente para o controle de lepidópteros. A partir dos anos 1970, novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes contra insetos das ordens Diptera, Coleoptera (Weiser, 1986; Edwards *et alli*, 1998), Himenoptera, Homoptera e Ortoptera (Feitelson, 1994). Também foi relatada toxicidade para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (Edwards *et alli*, 1998; Feitelson, 1994). Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (Monnerat *et alli*, 2001).

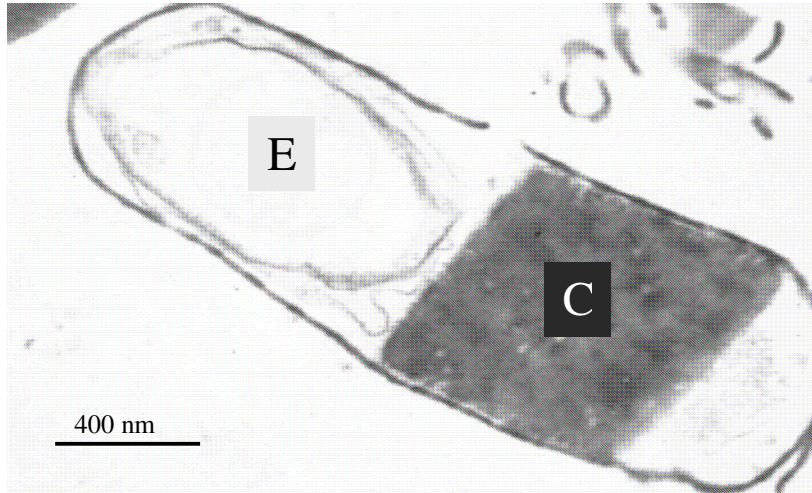


Figura 1: Micrografia eletrônica de uma célula de *B. thuringiensis* mostrando: cristais(c) e esporos (e) (adaptado de De Maagd *et alli*, 2001).

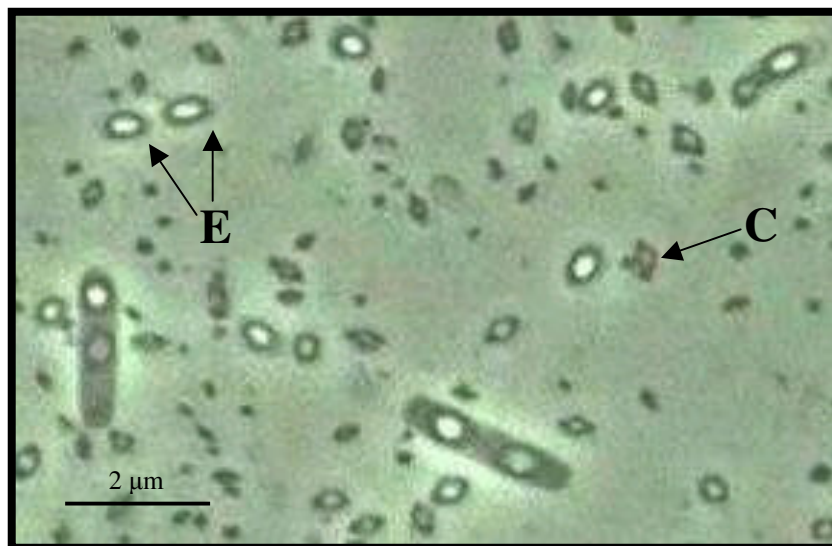


Figura 2: Microscopia de contraste de fase de *B. thuringiensis* mostrando: cristais(c) e esporos (e) (adaptado de <http://adang.myweb.uga.edu/>)

2.2- Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Além das proteínas Cry, *Bt* pode produzir várias outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamiou, 2000). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a patogenicidade, através da ação sinérgica com as proteínas Cry (Johnson & McGaughey, 1996).

2.2.1- α -exotoxina

A α -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C, lectinase ou fosfatidilcolina fosfolipase, é uma enzima que possui atividade citolítica sobre os fosfolipídios que formam as membranas celulares (Faust & Bulla Jr., 1982). Esta toxina é termoestável, solúvel em água, altamente tóxica para alguns insetos, através da administração oral ou intra-hemocélica. Também é tóxica para ratos e outros vertebrados, causando degeneração e lise de células como, por exemplo, hemócitos (Krieg, 1971, Hansen & Salamiou, 2000).

2.2.2- β -exotoxina

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

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

2.2.3 – Vip3A

As protoxinas “Vip” (do inglês: *vegetative insecticidal proteins*), são proteínas produzidas e secretadas pelas células bacterianas durante a fase vegetativa e de esporulação. Estas demonstram ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas proteínas Cry, mas principalmente contra larvas de lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon* (praga na cultura do milho), *Heliothis virescens* (praga na cultura do algodão), *Helicoverpa Zea* (praga na cultura do tomate, algodão e milho), *Spodoptera exigua* (praga na cultura de milho e tomate) e *Spodoptera frugiperda* (praga na cultura do milho) (Glare & O’Callaghan, 2000). As Vip foram excluídas da nomenclatura Cry porque não têm homologia de seqüência ou estrutura com as Cry. Os genes responsáveis pela síntese das proteínas Vip estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com os genes *cry* (Estruch *et alli*, 1996). Em concentrações letais, a Vip3A causa paralisia e lise das células epiteliais do intestino médio dos insetos, de modo semelhante às proteínas Cry (Yu *et alli*, 1997).

As Vip são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando, assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não apenas se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de

Bacillus thuringiensis, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat & Bravo, 2000; Soberón & Bravo, 2002).

2.2.4 – δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas, constituídas por duas grandes famílias de proteínas denominadas Cry e Cyt. Individualmente, apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma ordem de insetos em particular (De Maagd *et alli*, 2001). A análise dos cristais protéicos por microscopia de contraste de fases e do perfil eletroforético pode dar uma idéia inicial do espectro de ação (Valadares-Inglis *et alli*, 1998).

As estruturas terciárias de algumas toxinas (Cry1Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry2Aa e Cyt 2Aa) foram determinadas por cristalografia de raio X (Li *et alli*, 1991; Grochulski *et alli*, 1995; Morse *et alli*, 2001; Galitsky *et alli*, 2001; Boonserm *et alli*, 2005, 2006). Assim verificou-se a presença de três domínios estruturais (Figura 3), cada um com cerca de duzentos resíduos de aminoácidos (Polanczyk & Alves, 2003). O domínio I N-terminal consiste de sete α -hélices (seis hélices anfipáticas ao redor de uma hélice central hidrofóbica). O domínio II, chamado β -prisma, consiste de três "folhas β "-antiparalelas dispostas em volta de um núcleo hidrofóbico e o domínio III C-terminal consiste de duas "folhas β "-antiparalelas (Aronson & Shai, 2000).

A toxina Cyt2Aa possui menos de 20% de identidade de seqüência de aminoácidos com Cry1Aa e Cry3Aa (Schnepf *et alli*, 1998). Não surpreendentemente, a estrutura de Cyt 2Aa é radicalmente diferente das estruturas das outras duas toxinas. As toxinas Cyt, diferentemente das proteínas Cry, são capazes de lisar uma ampla variedade

de tipos celulares. A proteína Cyt2Aa consiste de um único domínio no qual duas camadas mais externas de α -hélices envolvem uma folha β (Schnepf *et alli*, 1998).

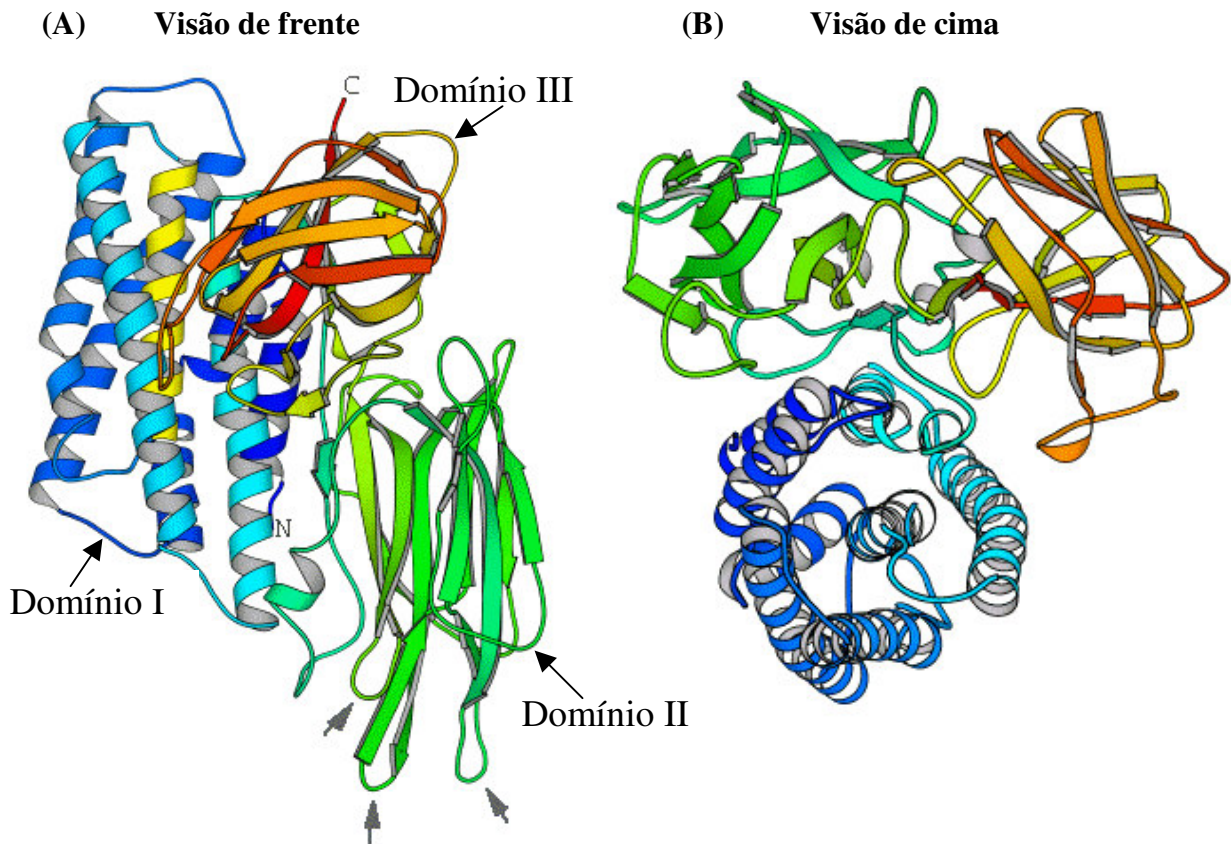


Figura 3. Representação esquemática da toxina Cry3A (baseada na estrutura de Li *et alli*, 1991). Os três domínios estão indicados em cores diferentes. O domínio I N-terminal compreende sete α -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II está relacionado à ligação a receptores de membrana. Este domínio é formado por três folhas β -antiparalelas terminando em alças bastante variáveis (setas) no ápice da molécula. O domínio III corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas β -antiparalelas, formando um β -sanduíche. Acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural da proteína, podendo ainda ter participação na ligação ao receptor. (Adaptado de <http://www.bioc.cam.ac.uk/~dje1/>)

Uma determinada cepa de *Bacillus thuringiensis* pode produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, podem conter uma ou mais toxinas Cry com peso molecular variando entre 40 e 140 kDa (Serafini *et alli*, 2002). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes (Polanczyk & Alves, 2003).

O processo de formação do cristal está ligado à esporulação, uma vez que estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação, e é liberado no momento em que as células são lisadas (Monnerat & Bravo, 2000). O cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib & Andrade, 1998).

No final da década de 80, Hofte e Whiteley (1989) propuseram uma classificação para as toxinas de *Bt*, baseada na combinação de suas seqüência de aminoácidos e espectro inseticida. Nesta classificação 42 genes foram agrupadas em 5 classes diferentes. As quatro classes Cry continham toxinas com atividade contra Lepdoptera (I), Lepidoptera e Diptera (II), Coleoptera (III), Diptera (IV) e Cyt (associada a CryIV) que, por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi reconhecida como uma classe a mais (Tailor *et alli*, 1992). No entanto, essa classificação mostrou certas limitações, pois tentou relacionar toxinas com seqüências de aminoácidos similares a diferentes atividades inseticidas. Durante a década de 90, uma nova classificação foi proposta por Crickmore *et alli* (1998), baseada somente na similaridade entre as seqüências de aminoácidos. Essa mudança permitiu uma alta relação entre as toxinas e eliminou a necessidade de bioensaios contra um grande número de insetos (Polanczyk & Alves, 2003). O novo sistema de classificação é composto pelo nome da toxina (Cry ou Cyt) seguido de elementos encadeados hierarquicamente, como números, letras maiúsculas, letras minúsculas e

números (ex: Cry25Aa1) dependendo de sua localização na árvore filogenética (Maagd *et alli*, 2001). Nessa nova classificação, 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. A atualização constante desses dados pode ser acessada via internet no endereço http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html

Tabela 1 – Organização das classes com os respectivos subgrupos das proteínas Cry de *B. thuringiensis* proposta pelo comitê internacional de 1994, baseado nas seqüências dos aminoácidos. (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html)

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

^a Não disponível

O alinhamento das toxinas Cry revela a presença de cinco blocos de seqüências conservadas comuns à grande maioria das proteínas. Isso 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 muito semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000).

Na figura 4, são apresentados os grupos desta 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 alli*, 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 alli*, 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 alli*, 1989).

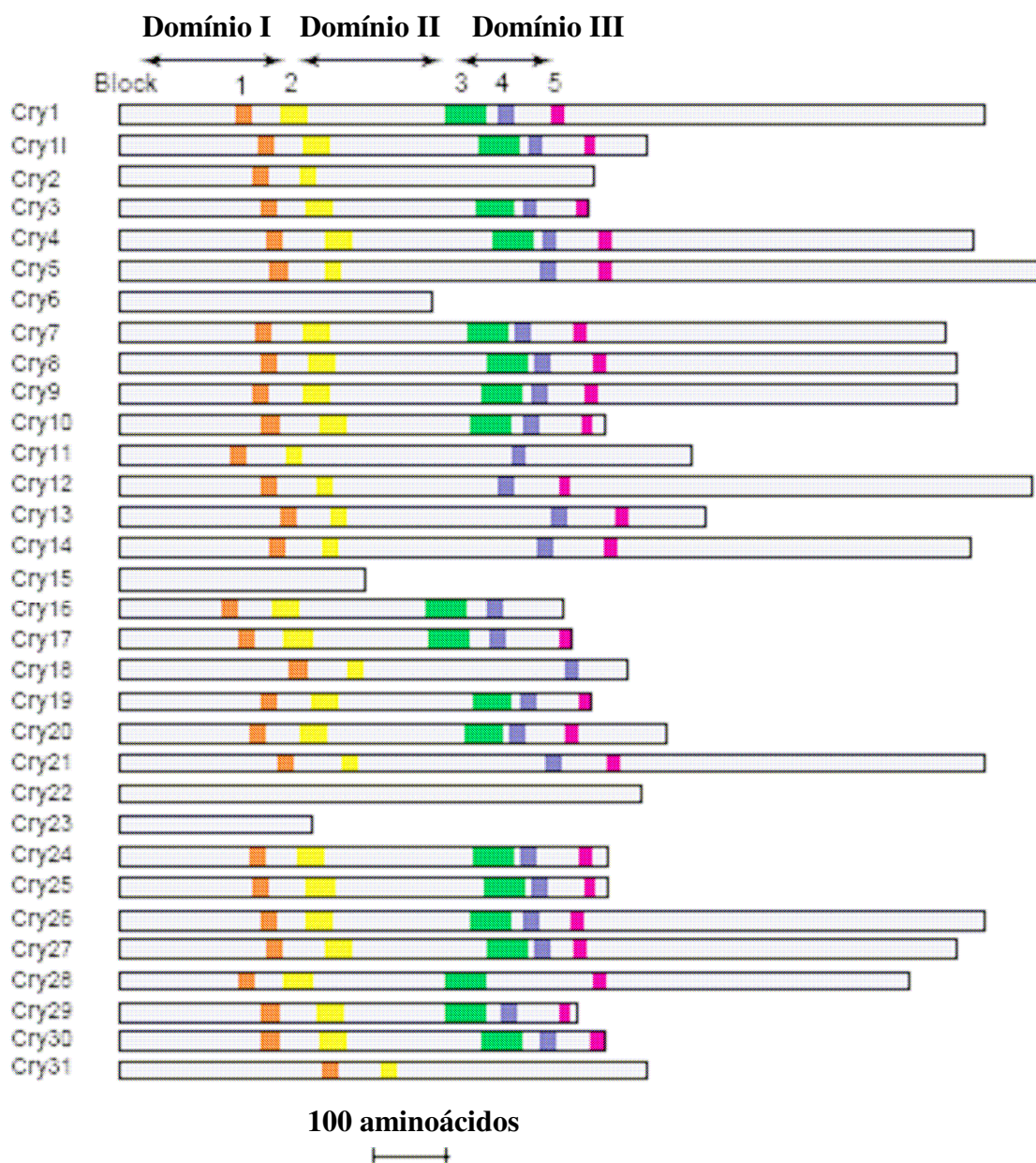


Figura 4. Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Comprimentos relativos das proteínas Cry e posição dos cinco blocos conservados, se presentes. Os retângulos coloridos correspondem às seqüências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa para Cry1 e varia para as outras toxinas. (adaptado de De Maagd *et alli*, 2001).

2.3 – Modo de ação das proteínas Cry

A maioria das toxinas Cry nativas de *Bt* é sintetizada como pro-toxinas inativas contidas nos corpos de inclusão (Aronson *et alli*, 1986). Após a ingestão por larvas de insetos suscetíveis e dissolução no lúmen do intestino médio, em pH alcalino, as pro-toxinas solubilizadas são ativadas por proteases do intestino produzindo fragmentos tóxicos que são relativamente resistentes a proteólises posteriores (Aronson *et alli*, 1986; Höfte & Whiteley, 1989). Ao tornarem-se 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, aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, pode ser clivada pela ação de metaloproteases sintetizadas pela própria bactéria durante a esporulação (Rukmini *et alli*, 2000) (Figura 5).

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

Toxinas Cry ativas ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino médio do inseto, seguindo-se de inserção das toxinas na membrana para formar poros permeáveis a cátions (De Maagd *et alli*, 2001). Os poros causam vazamento de íons e levam as células alvo epiteliais do intestino médio ao inchaço e à lise osmótica, resultando em dano extensivo ao intestino médio e, eventualmente, em morte larval (Knowles & Ellar, 1987; Knowles, 1994; Angsuthanasombat *et alli*, 2004) 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 destruição da membrana peritrófica e do epitélio intestinal do inseto propiciam acesso dos esporos de *Bt* 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) (Figura 5).

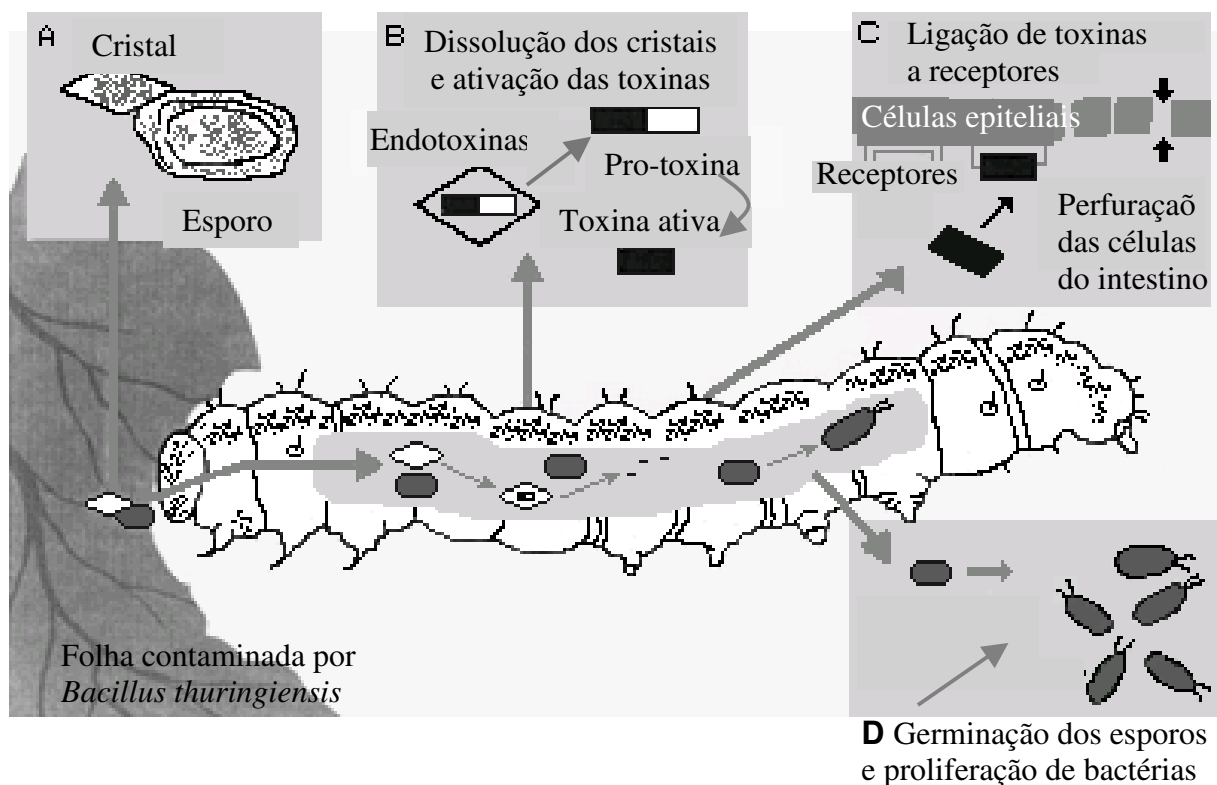


Figura 5. Representação esquemática do modo de ação de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. (Figura adaptada do site www.inchem.org/documents/ech/ech/ech217.htm)

2.4. Receptores

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 alli*, 1995; Denolf *et alli*, 1997). A observação de que os domínios II e III podem atuar separadamente em um processo composto de duas etapas de ligação de Cry1Ac a uma aminopeptidase N, poderia ajudar a explicar por que novas combinações de domínios II e III podem gerar uma mudança de especificidade (De Maagd *et alli*, 2001).

A construção de proteínas quiméricas entre Cry1C e Cry1Ea mostrou que o domínio III da primeira é determinante para a especificidade a *Spodoptera exigua* e *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) (Bosch *et alli*, 1994; De Maagd *et alli*, 2001). Inclusive a troca de domínios entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac resultou numa proteína dez vezes mais tóxica para *S. exigua* (De Maagd *et alli*, 2001) que a toxina Cry1C.

A toxina Cry4B, como várias outras toxinas de Bt, é formadora de canais em bicamadas lipídicas. O domínio I desta proteína Cry, correspondente a uma região N-terminal de sete α -hélices, no qual a hélice $\alpha 5$, relativamente hidrofóbica, é circundada por seis outras hélices anfipáticas, é responsável pela inserção da toxina na membrana (Puntheeranurak *et alli*, 2004). Evidências substanciais corroboram um modelo do tipo guarda-chuva que foi proposto para demonstrar o estado ligado à membrana das toxinas Cry. Este modelo envolve a inserção de $\alpha 4$ e $\alpha 5$ na membrana como uma estrutura de

hélice alça hélice, com as demais hélices espalhadas na superfície membranar (Grazit *et alli*, 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 alli*, 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).

2.5 – Regulação da transcrição dos genes *cry*

Os genes *cry* têm sido considerados exemplos típicos de genes específicos da esporulação. No entanto, estudos sobre a expressão de *cry3Aa* revelaram que esta consideração nem sempre é válida (Scheneopf *et alli*, 1998). Faz-se necessário, portanto, a distinção entre os genes *cry* expressos durante a fase estacionária, sendo eles os dependentes da esporulação, e aqueles que não o são.

2.5.1 – Expressão de genes dependentes da esporulação

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 desfavorável ao seu desenvolvimento. Os diferentes mecanismos que regulam a esporulação têm sido estudados principalmente em *B. subtilis*, uma espécie semelhante ao *Bt*. De modo que, os estudos morfológicos e genéticos mostraram alta similaridade entre o mecanismo de esporulação entre estas duas espécies (Driks, 2002). Estes estudos têm fornecido informações detalhadas a respeito de mecanismos complexos de controle temporal e espacial do processo de diferenciação.

Em nível transcricional, o desenvolvimento da esporulação é controlado por ativações sucessivas de fatores que se ligam à RNA polimerase para direcionar a transcrição a partir de promotores específicos da esporulação (Moran, 1993). Estes fatores são compostos do fator σ^A que é o principal fator ativo durante a fase vegetativa, e cinco outros fatores denominados σ^H , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K , que aparecem nessa ordem temporal durante o processo. Os fatores σ^A e σ^H são ativos na célula pré divisionária, σ^E e σ^K são ativos na célula-mãe e σ^F e σ^G são ativos no pré-esporo (Schnepf *et alli*, 1998).

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

2.5.2 – Genes não dependentes da esporulação

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

2.5.3 – Mecanismos pós-transcricionais

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

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

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

A inserção da região não-traduzida 5' de *cry3Aa* (extendendo-se dos nucleotídeos –129 a –12), entre o promotor *xy1A* de *B. subtilis* e o gene repórter *lacZ* aumentou, cerca de dez vezes, tanto a estabilidade do mRNA fusionado do *lacZ*, como a produção de β -galactosidase (Agaisse & Lereclus, 1994). Análise de mutação e deleção indicam que a sequência requerida para o efeito de estabilização é uma sequência Shine-Dalgarno (GAAAGGAGG) localizada entre os nucleotídeos –125 a –117. A estabilidade do mensageiro de *cry3Aa* pode ser devida a uma interação entre a extremidade 3' do rRNA 16S e a sequência Shine-Dalgarno. A ligação da subunidade ribossomal 30S a esta sequência pode proteger o mRNA de ribonucleases com atividade 5'-3', resultando em um transcrito estável com a extremidade 5' no nucleotídeo –129. Sequências Shine-Dalgarno potenciais estão presentes em posições similares *upstream* dos genes *cry3Ba*, *cry3Bb* e *cry3Ca* (Donavan *et alli*, 1992; Lambert *et alli*, 1992).

2.6 – Proteínas da classe Cry4

Até agora, as δ -endotoxinas Cry de *Bt* têm-se mostrado tóxicas para uma ampla variedade de larvas de insetos incluindo os da ordem Diptera. Dentre os inseticidas biológicos, o *Bt* subsp. *israelensis* tem sido largamente utilizado como um inseticida bacteriano eficiente e seguro para o controle de mosquitos vetores de doenças (Federici *et alli*, 2003).

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

Os genes que codificam as proteínas Cry4 estão localizados em um plasmídeo residente de 72 MDa (Ward & Ellar, 1983; Gonzáles & Carlton, 1984).

As toxinas Cry4Aa e Cry4Ba são moléculas intimamente relacionadas, exibindo alta taxa de identidade de seqüência de aminoácidos. As regiões C-terminais das pro-toxinas de 130 kDa Cry4Aa e Cry4Ba são praticamente idênticas, no entanto, suas porções terminais proteoliticamente ativadas, apresentam apenas cerca de 55% de similaridade de seqüência (Chungjatupornchai *et alli*, 1988; Ward & Ellar, 1988). Apesar desta similaridade, essas toxinas exibem diferentes níveis de toxicidade contra várias espécies de mosquitos. Enquanto Cry4Ba é altamente tóxica para larvas de *Aedes* e *Anopheles* (vetores do dengue e febre amarela e da malária, respectivamente), esta toxina apresenta baixa atividade contra larvas de *Culex*. Em contraste, Cry4Aa exibe um alto nível de toxicidade contra larvas de *Culex* e *Aedes*, porém um pouco menos tóxica para *Anopheles* (Poncet *et alli*, 1995). Experimentos de mutagêneses sítio-dirigidas com toxinas Cry identificaram regiões do domínio II como os principais determinantes para a especificidade de insetos (Abdullah *et alli*, 2003; Rajamohan *et alli*, 1996; Wu *et alli*, 2000). Abdullah e colaboradores, 2003, introduziram resíduos de aminoácidos de Cry4Aa nas três alças do domínio II de Cry4Ba. A mudança na alça 3 aumentou significativamente a toxicidade de Cry4Ba contra *Culex*, enquanto que a atividade contra larvas de *Anopheles* e *Aedes* foi mantida. Sendo assim, foi

sugerido que um importante determinante da especificidade da toxina Cry4Aa para *Culex* está localizado na região da alça 3, e que, importantes determinantes da toxicidade de Cry4Ba para *Anopheles* e *Aedes* estão nas alças 1 e 2.

2.7 – Baculovírus

Dentre os vírus de insetos, os baculovírus compreendem o maior e mais estudado grupo e é o que tem sido mais aplicado como bioinseticida. A maioria dos baculovírus tem sido isolada a partir de lepidópteros, com centenas de espécies confirmadas como sendo hospedeiras (Ribeiro & Crook, 1998). Os baculovírus possuem como principais características um vírion com envelope em forma de bastão e um DNA circular, dupla fita, *supercoiled* contendo entre 80 e 200 Kb (Arif, 1986). Esses vírus pertencem à família Baculoviridae e esta é subdividida em dois gêneros: o *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e o *Granulovirus* (GV) (Murphy, 1995). Os dois gêneros produzem partículas virais envoltos por uma oclusão cristalina de natureza protéica, também denominada poliedro (Figura 6).

Mais de 500 NPV foram identificados em várias famílias de insetos (Martignoni & Iwai, 1986) e muitos parecem ser específicos para a família ou gênero de insetos em que os vírus foram isolados. Devido a essa especificidade, os NPV são candidatos ideais para o uso em programas de controle de pragas (Ribeiro & Crook, 1998).

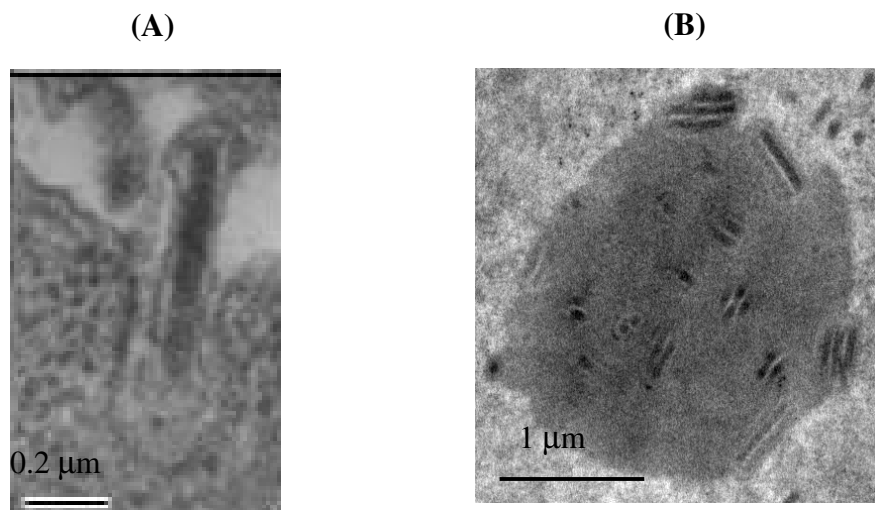


Figura 6. Ultraestrutura de um baculovírus. (A) – Microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma partícula viral extracelular ("budded virus") entrando em uma célula por endocitose. (B) – Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas virais ocluídas (ODV) em uma matriz protéica (corpo de oclusão). (Fonte: Bergmann Morais Ribeiro. Fotos não publicadas)

2.7.1- Infecção e colonização

A principal rota natural de infecção é através da ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída (ODV). No ambiente altamente alcalino do intestino médio da larva do inseto, os poliedros são rapidamente dissolvidos e as partículas virais são liberadas, dando início à infecção das células epiteliais do intestino médio (Volkman & Keddie, 1990) (Figura 7). Após a entrada no núcleo, o DNA viral é replicado, apresentando uma progênie de novos nucleocapsídeos após 8 horas de infecção. Esses nucleocapsídeos atravessam a membrana nuclear e são transportados para a região basolateral das células colunares do intestino médio sendo liberados para infectar células do sistema respiratório e circulatório (Engelhard *et alli*, 1994). Alternativamente, os vírus oriundos da dissolução dos

poliedros entram na célula colunar e a atravessam para infectar as células do sistema traqueal ou hemolinfa (Barrett *et al.*, 1998). A maioria dos estudos tem sido conduzida com o baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Sua replicação é caracterizada pela produção de duas formas virais. Primeiro, o vírus extracelular ou *budded virus* (BV) é produzido por volta de 12 a 24 horas após a infecção e brota da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular de forma polarizada, sendo envelopado individualmente. Os BV produzidos são responsáveis pela infecção de célula à célula no hospedeiro (Ribeiro & Crook, 1998). Segundo, o vírus derivado da oclusão (ODV) é produzido bem mais tarde no núcleo da célula, continuando até a morte celular por volta de 72 horas após a infecção. Os ODV adquirem a membrana sintetizada *de novo* no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrados mais de um nucleocapsídeo por envelope (Granados & Williams, 1986). Os ODV são, então, oclusos no núcleo da célula infectada, em uma matriz protéica, formando o corpo de oclusão, também denominado de poliedro. 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.

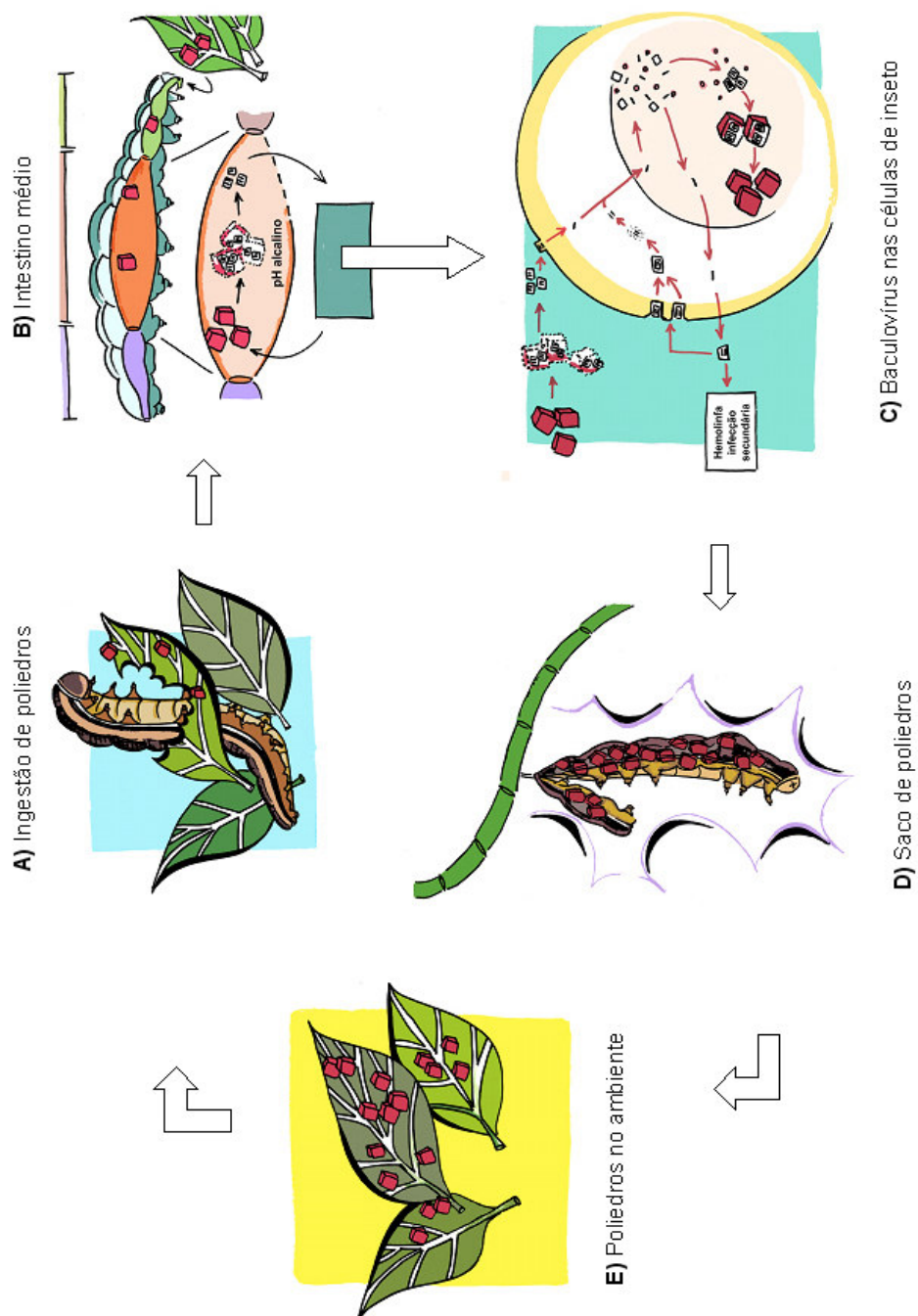


Figura 8. Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. Em (A) ocorre a ingestão de poliedros pela larva do inseto e, após ingeridos, estes seguem pelo trato digestivo (B) até chegarem ao intestino médio e sofrem dissolução pelo alto pH e liberam as partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (caracterizando a infecção primária) e, em seguida, partir para infectar outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (caracterizando a infecção secundária) (C). A infecção se espalha, causando a morte da larva (D) e ela se torna um “saco” de poliedros que, quando se rompe, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (E).

Fonte: Maria Creuza do Espírito Santo Barros – Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia

Os baculovírus têm sido largamente empregados, em vários países do mundo, visando o controle de pragas das lavouras. Alguns vírus encontram-se comercialmente disponíveis na forma de macerado das lagartas ou como produto já formulado. No Brasil, pode-se citar como exemplos, produtos pulverizados com *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolhedrovirus* (SfMNPV) e *Erinnys ello grannulovirus* (EeGV) no controle de pragas de cultura de soja, milho e mandioca respectivamente (Ribeiro *et alli*, 1998).

Uma das desvantagens do uso comercial de baculovírus é o tempo que este leva para agir e matar os insetos alvo podendo levar alguns dias, diferentemente dos inseticidas químicos, que agem rapidamente, em questão de horas.

Uma grande variedade de proteínas com importância na medicina e na agricultura foram expressas em níveis elevados, em células de inseto usando baculovírus como vetores de expressão (Luckow & Summers, 1998). Os primeiros relatos do uso de baculovírus como vetores de expressão foram publicados por Smith *et alli* (1983) e Pennock *et alli* (1984), que usaram o AcMNPV para produzir β -interferon e β -galactosidase, respectivamente, em células de *S. frugiperda*.

2.7.2 – Baculovírus como vetor de expressão

O sistema de expressão de proteínas heterólogas usando baculovírus, baseia-se na introdução de genes no genoma de um baculovírus, no lugar de um gene não-essencial para replicação e sob o comando de um promotor forte (por exemplo, o promotor da poliedrina). A poliedrina é a principal proteína do OV e é codificada por um gene não-essencial. A inativação desse gene por exclusão ou inserção de uma seqüência de DNA produz um vírus

que é capaz de se replicar em células de inseto, mas não produz poliedrina, não ocorrendo a formação da forma ocluída do vírus (OB ou poliedro). A expressão do gene da poliedrina conduzida a partir de seu promotor produz, por volta de 70 horas após a infecção, aproximadamente uma quantidade de poliedrina equivalente a 20-50% de toda proteína produzida pela célula infectada (Ribeiro & Crook, 1998).

Analogamente, o promotor *p10* dos baculovírus também tem sido utilizado, uma vez que, também, permite a produção de altos níveis de expressão e por não constituir o gene que codifica a proteína P10 um elemento essencial para a replicação viral (Vlak *et alli*, 1998; Weyer *et alli*, 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 alli*, 1988; Luckow & Summers, 1988).

A inserção de genes heterólogos em baculovírus pode acontecer por recombinação homóloga, em célula de inseto, utilizando-se para este fim um vetor de transferência contendo um sítio de clonagem no qual será inserido o gene exógeno sob o comando de um promotor forte em uma fase tardia da infecção. Este cassete é flanqueado por regiões homólogas a seqüências do genoma viral onde ocorrerá a recombinação, após co-transfecção do DNA do vetor de transferência juntamente com o DNA do baculovírus, em célula de inseto (Figura 8). Existem vários sítios no genoma do baculovírus, onde genes heterólogos podem ser inseridos (O'Reilly *et alli*, 1992), dependendo do vetor.

Baculovírus recombinantes também podem ser gerados por transposição sítio específica de um cassete de expressão para o genoma do baculovírus (Bacmid) propagado em células de *Escherichia coli* DH10BacTM (Invitrogen) (Luckow *et alli*, 1993). Este

método utiliza um vetor de transferência pFastBac[®] contendo o gene de interesse controlado por um promotor específico do baculovírus. A linhagem de células hospedeiras de *E. coli* DH10Bac[™] possui, além do genoma do baculovírus (Bacmid), um plasmídeo

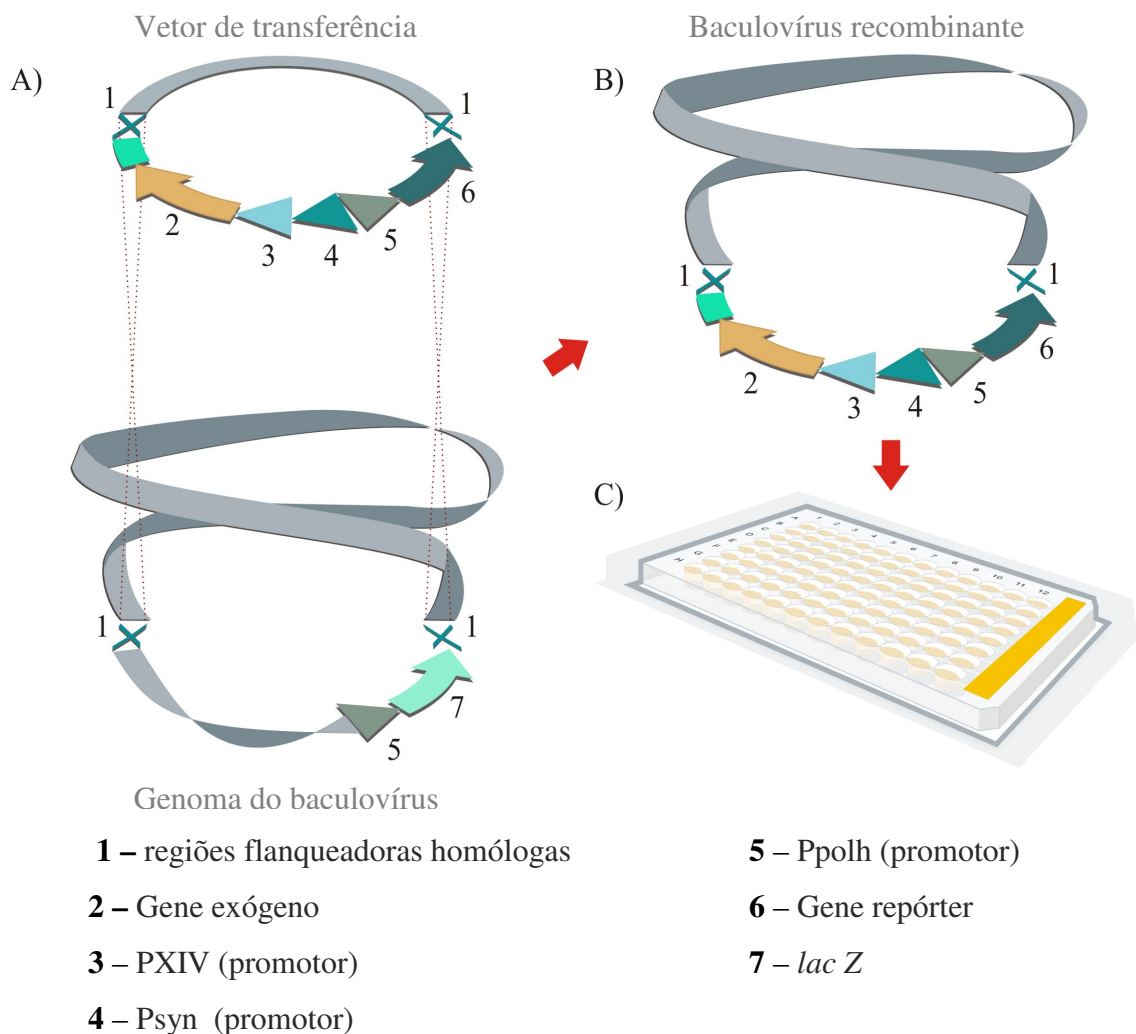


Figura 8. Esquema ilustrativo da construção e isolamento de baculovírus recombinantes pelo método de recombinação homóloga. Este evento ocorre entre as regiões flanqueadoras do cassete de expressão do gene exógeno, no vetor de transferência, e regiões homólogas no genoma do vírus selvagem (A). Dessa forma, o vírus recombinante adquire o cassete contendo o gene de interesse (B). O vírus recombinante é isolado em diluições seriadas em placas de 96 poços (C). Os promotores supracitados são derivados do promotor da poliedrina Ppolh. O vetor de transferência e o baculovírus mostrados acima correspondem ao pSynXIVVI+X3 e ao vSynVI-gal, respectivamente.

“helper” responsável pela codificação de uma transposase bacteriana que reconhece seqüências repetidas invertidas que flanqueiam o gene exógeno no vetor pFastBac[®]. Dessa forma, é conduzida a transposição do cassete de expressão do gene heterólogo para o Bacmid dentro da célula hospedeira. A transposição ocorre dentro do gene marcador *lac Z*, permitindo a seleção dos clones bacterianos positivos com extração subsequente do DNA viral para transfecção em células de inseto. Atualmente esse procedimento é comercializado como sistema Bac-to-Bac[®] pela empresa Invitrogen (figura 9).

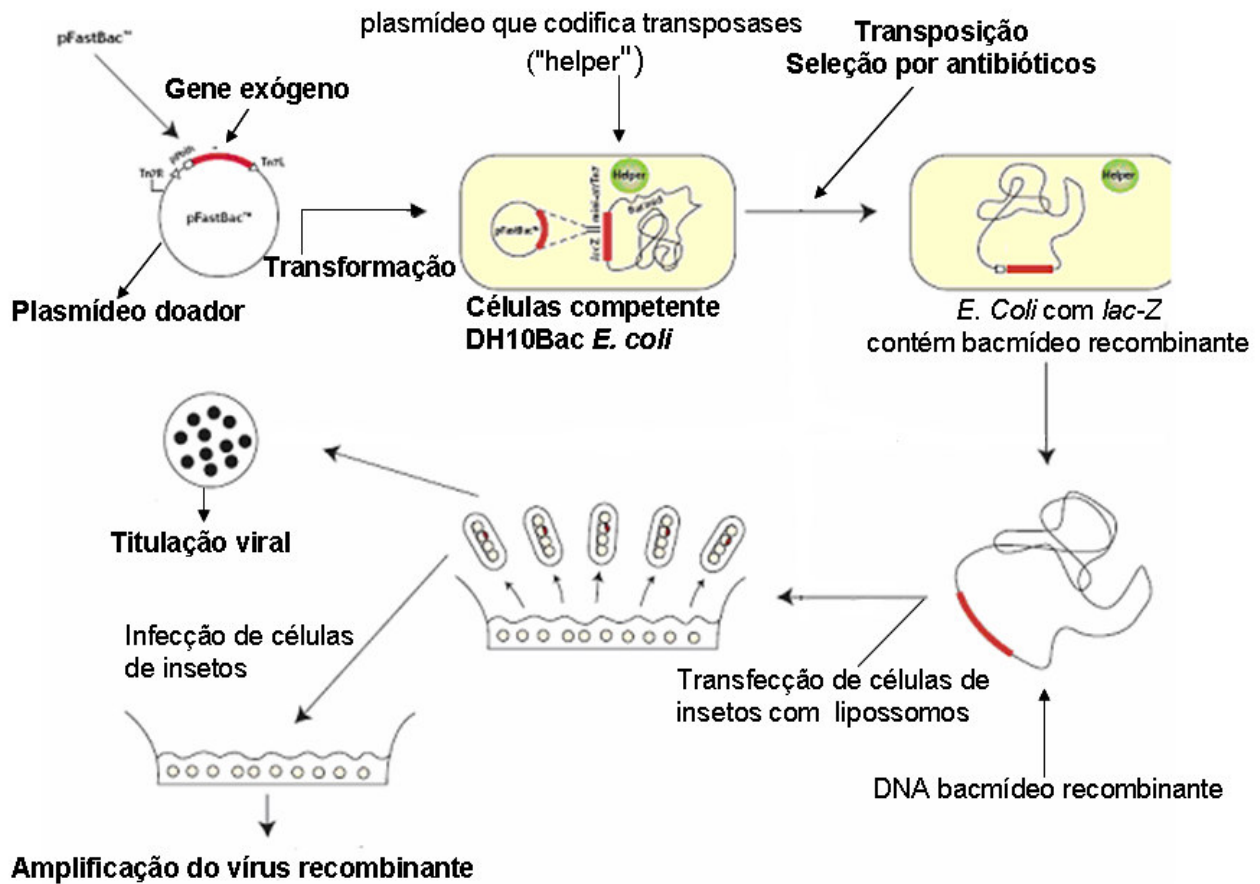


Figura 9. Esquema ilustrativo da construção de baculovírus recombinantes pelo método de transposição (adaptado do Kit Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System, Invitrogen). O gene *lac Z* está inserido no *locus* do gene da poliedrina no genoma do baculovírus e funciona como gene marcador para seleção de clones recombinantes.

O sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado no uso de baculovírus possui várias vantagens em relação a outros sistemas de expressão, como por exemplo:

- ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas de eucariotos;
- alta especificidade dos baculovírus, que os torna um sistema seguro de ser utilizado;
- altos níveis de expressão das proteínas heterólogas;
- facilidade de purificação da proteína heteróloga;
- capacidade para inserção de grande quantidade de DNA;
- coexpressão de dois ou mais genes.

Trabalhos anteriores já demonstraram a utilidade do sistema de expressão baseado em células de inseto e baculovírus para a expressão, em grande quantidade, de proteínas Cry similares às proteínas nativas de *B. thuringiensis* (Merryweather *et alli*, 1990; Pang *et alli*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993, 1998; Chang *et alli*, 2003).

Neste trabalho, os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, obtidos das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S1806 e S1989, respectivamente, pertencentes ao Banco de *Bacillus* ssp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram clonados e utilizados para construção de baculovírus recombinantes expressando individualmente cada um dos genes para avaliação da atividade inseticida das proteínas Cry para *Aedes aegypti*. A toxicidade das proteínas da classe Cry4 para insetos da ordem Diptera já foi descrita em trabalhos anteriores e tem-se mostrado uma alternativa viável no combate a mosquitos vetores de doenças humanas.

3 – OBJETIVO

Estudar a expressão de toxinas da classe Cry4 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* pertencentes a duas estirpes brasileiras do banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em células de inseto, utilizando baculovírus como vetor de expressão para análise da toxicidade das proteínas heterólogas isoladas contra larvas de mosquitos.

3.1 – Estratégias :

- Amplificar, clonar e sequenciar os genes *cry4Aa* e *cry4Ba* de duas estirpes brasileira de *B. thuringiensis*;
- clonar os genes em vetores de transferência para construção de baculovírus recombinantes;
- construir baculovírus recombinantes contendo genes *cry4Aa* e *cry4Ba*;
- analisar a expressão dos genes *cry* em células de insetos;
- Purificar as proteínas Cry4Aa e Cry4Ba e avaliar a atividade tóxica destas proteínas para larvas de mosquitos.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Vírus e células

O baculovirus vSynVIgal (Wang *et alli*, 1991), derivado do baculovírus selvagem AcMNPV, foi utilizado para produção, por recombinação homóloga, dos vírus recombinantes vSyncry4Aa e vSyncry4Ba construídos neste trabalho. Os vírus foram propagados em células de *Trichoplusia ni* (BTI-tn5B1-4), em cultura (Granados *et alli*, 1994). As células foram mantidas em meio TC-100 (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 27°C.

Células de *E. coli* DH5- α TM (Invitrogen) foram usadas como hospedeiras para os plasmídeos usados no trabalho: pGemcry4Aa, pGemcry4Ba, pSyncry4Aa, pSyncry4Ba e pFastBac1cry4Aa.

O baculovírus recombinante, vBacCry4Aa, foi obtido por transposição em *E. coli* DH10Bac, segundo instruções do fabricante do kit Bac-to-Bac (Invitrogen) e descrito no item 4.5.

As estirpes de *Bacillus thuringiensis* S1806 e S1989 do banco de *Bacillus* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram utilizadas como fonte dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, respectivamente.

4.2 – Manipulação do DNA

As técnicas de clonagem molecular, usadas neste trabalho, estão descritas em Sambrook *et alli*, (2001) e O'Reilly *et alli*, (1992).

4.3 – Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*.

Os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, derivados do DNA plasmidial das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S1806 e S1989, respectivamente, pertencentes ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram amplificados por PCR, usando-se os oligonucleotídeos Cry4AaF (“forward”), Cry4AaR (“reverse”), Cry4BaF (“forward”) e Cry4BaR (“reverse”) (Tabela 2). Os oligos Cry4AaF e Cry4BaF anelam-se nas posições -7 a +20 e -13 a +18 em relação aos sítios de início da tradução dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, respectivamente. Os oligos Cry4AaR e Cry4BaR anelam-se nas posições +3526 a +3546 e +3404 a +3432 (Tabela 2) em relação aos sítios de início da tradução dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, respectivamente. Foram adicionados sítios de restrição de *Bam*H I nas seqüências dos oligonucleotídeos. Trinta nanogramas do DNA plasmidial de cada estirpe foi utilizado juntamente com os oligonucleotídeos específicos, na concentração inicial de 10mM, para cada gene. À reação foram adicionados dNTP em concentração inicial de 10mM, MgCl²⁺ (25mM) e tampão da *Taq* polimerase 1x (Invitrogen®). O programa de PCR para a amplificação dos genes, usando-se 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen®), foi: 94°C/5 min seguido por 30 ciclos de 94°C/1 min e 30 s, 52°C/1 min e 30 s, 72°C/2 min e uma extensão final a 72°C/7 min. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM-T® easy (Promega), de acordo com o protocolo de instruções do fabricante e transformados em células de *Escherichia coli* DH5-α® (Invitrogen). O DNA dos plasmídeos recombinantes (pGemcry4Aa e pGemcry4Ba) foi purificado, utilizando-se o Kit de purificação de DNA Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) e seqüenciado no seqüenciador automático MEGA BACE 1000 (Amersham Bioscience) na plataforma de seqüenciamento de DNA da Embrapa recursos genéticos e

Biocologia com oligonucleotídeos universais (SP6 e T7) que se anelam nas regiões flaqueadoras do sítio de múltipla clonagem do plasmídeo pGEMT[®]-easy. As seqüências completas dos genes referidos acima foram obtidas a partir de oligonucleotídeos desenhados para as regiões internas dos genes (Tabela 2). As seqüências obtidas foram analisadas pelos programas ORF finder e Blast, disponíveis no site: www.ncbi.nlm.nih.gov.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência (5' → 3')	Aplicação	
<i>cry4Aa</i>	pCry4AaF	CGGATCCATGAATCCTTATCAAATAA	Amplificação do gene	
	pCry4AaR	CGGATCCTCACTCACTCGTTCATGAAATT	Amplificação do gene	
	pCry4AaF1	GAGCCTTTGCCAACAGCAAT	Seqüenciamento	
	pCry4AaF2	ATCACAATGTAAGTATGAT	Seqüenciamento	
	pCry4AaF3	CAAGGACCTGGTCATACAGGA	RT-PCR/Seqüenciamento	
	pCry4AaR1	CAACAAGCATATGATGTAGCG	Seqüenciamento	
	pCry4AaR2	CCGTATACACGTTACCTAG	Seqüenciamento	
	<i>cry4Ba</i>	pCry4BaF	GGGATCCGTGAATATGGGAGGAATAAATATG	Amplificação do gene
pCry4BaR		GGGATCCTTTCTCCATGGTTTTTAAAGC	Amplificação do gene	
pCry4BaF1		ATGGGAGGAATAAATATG	Seqüenciamento	
pCry4BaF2		GACGGTTGTGAAAGATTA	Seqüenciamento	
pCry4BaF3		CAGCTTTAGTAGAATCTCCT	Seqüenciamento	
pCry4BaF4		CAGTAACAGGGTTTCATTTGC	Seqüenciamento	
pCry4BaF5		CAAGTGATTATTGACAGAATCG	RT-PCR/Seqüenciamento	
pCry4BaF6		CTAGTGGTTTCACGCTAT	Seqüenciamento	
pCry4BaR1		AGGACTGGTTATTAGGCT	Seqüenciamento	
pCry4BaR2		CTCCAGTGCTGTATAGA	Seqüenciamento	
pCry4BaR3		CAACAATCTTATGTGTCC	Seqüenciamento	
pCry4BaR4		CAGATTGAGTGATTGGAA	Seqüenciamento	
pCry4BaR5		GATGGCATAACAATTTCTTC	Seqüenciamento	
pCry4BaR6		CACATATGGAATCGATTG	PCR/Seqüenciamento	
		SP6	GTAAAACGACGGCCAGT	Seqüenciamento
		T7	GGAAACAGCTATGACCATG	Seqüenciamento
	T1	CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Síntese de cDNA	
	T2	CCTGCAGGATCCTTAGGTT	Síntese de cDNA	
	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Detecção por PCR	
	ORF603	ACAGCCATTGTAATGAGACG	Detecção por PCR	
	polhF	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG	Detecção por PCR	

4.4 – Construção dos vetores de transferência

Um µg do DNA dos plasmídeos pGemcry4Aa e pGemcry4Ba foi digerido com 1 U das enzimas de restrição *BamH I* e *BamH I/EcoR I*, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Os fragmentos obtidos (aproximadamente 3,5 pares de quilobases, kpb) contendo os genes *cry4Aa* e *cry4Ba* foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% seguindo instruções descritas em Sambrook *et alli*, (2001). As bandas correspondentes aos genes *cry* foram eluídas do gel usando-se o kit GFX (Amersham). O gene *cry4Aa* foi clonado no vetor de transferência pSynXIV VI+X3 (Wang *et alli*, 1991), previamente digerido com a enzima de restrição *Bgl II*, seguindo-se instruções do fabricante (Promega), sob o comando dos promotores P_{syn} e P_{XIV}, dando origem ao plasmídeo pSyncry4Aa. O mesmo gene foi também clonado no vetor de transferência pFasBac[®] (Invitrogen) linearizado com a enzima *BamH I*, de acordo com as instruções do fabricante (Promega), sob o comando do promotor P_{polh}, dando origem ao plasmídeo pFastcry4Aa. O gene *cry4Ba* foi clonado no vetor de transferência pSynXIV VI+X3/3 (Wang *et alli*, 1991), derivado do pSynXIV VI+X3, previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Bgl II*, seguindo-se instruções do fabricante (Promega), sob o comando dos promotores P_{syn} e P_{XIV}, originando ao plasmídeo pSyncry4Ba (Figura 10).

4.5 – Construção, por recombinação homóloga, e isolamento dos baculovírus recombinates expressando genes *cry4Aa* e *cry4Ba*

Um µg do DNA dos vetores de transferência pSyncry4Aa e pSyncry4Ba e 0.5 µg de DNA do vírus vSynVIgal, previamente linearizados com a enzima de restrição *Bsu 36I* (Promega), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante, foram utilizados em co-transfecções em placas 35 mm de diâmetro com células BTI-TN5B1-4 (10⁶ células). Os

plasmídeos e o DNA viral foram diluídos conjuntamente em 250 µl de meio de cultura TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm de diâmetro. A mesma diluição foi feita com 10 µl

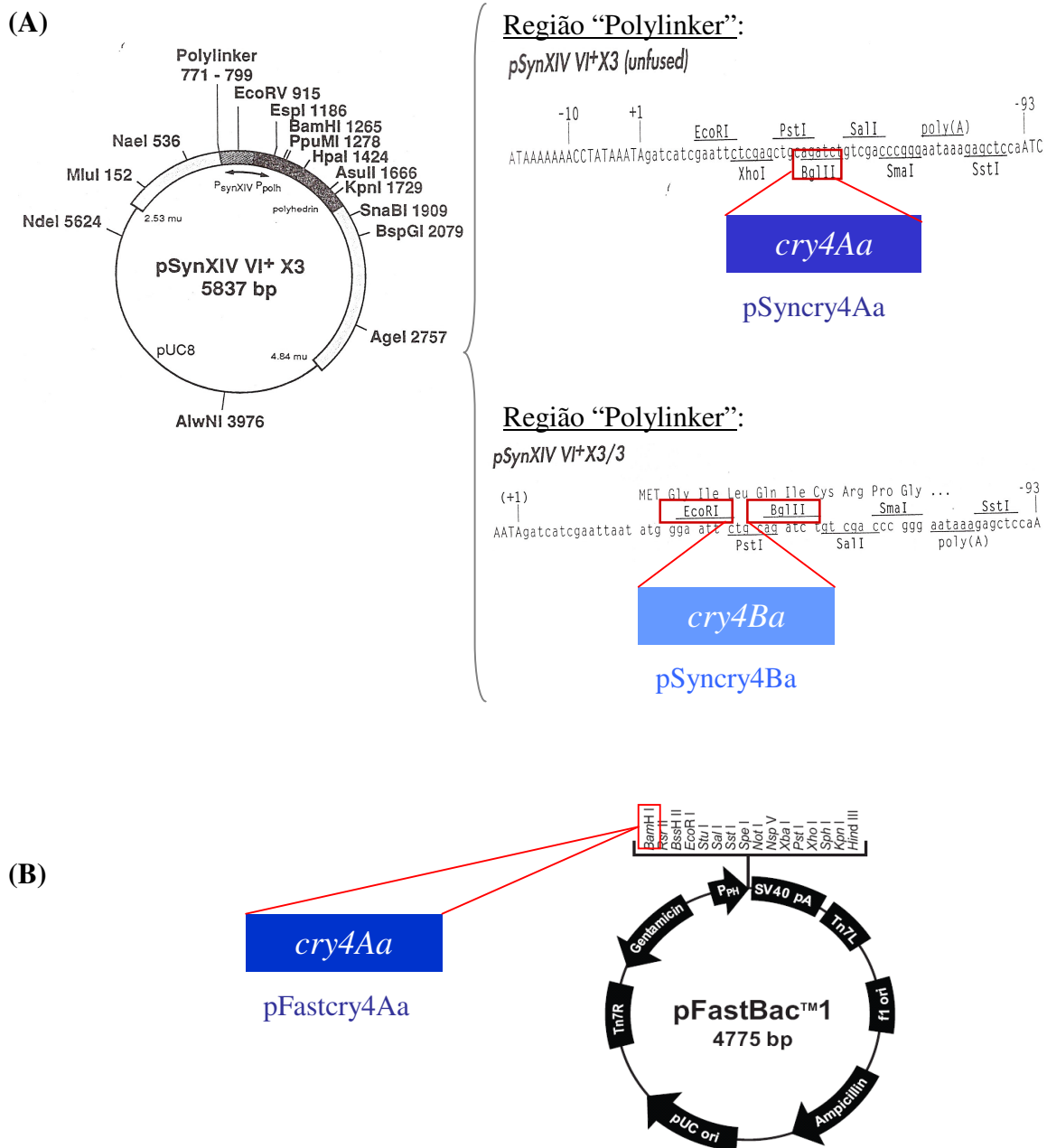


Figura 10. Construção dos vetores de transferência. **A**, Clonagem do gene *cry4Aa* no vetor pSynXIV VI+X3 digerido previamente com *Bgl* II, e do gene *cry4Ba* no vetor pSynXIV VI+X3/3 digerido previamente com *EcoR* I e *Bgl* II. **B**, Clonagem do gene *cry4Aa* no vetor pFastBac1® digerido previamente com *BamH* I.

10 µl de lipofectina (Cellfectin[®] Invitrogen). As diluições foram misturadas e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura da placa de células foi, posteriormente, substituído por 500 µl da mistura de DNA/lipofectina possibilitando a cobertura da monocamada de células. A placa foi incubada por 3 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado à placa 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C por sete dias. A recombinação homóloga ocorrida entre as regiões flanqueadoras do gene heterólogo dos vetores de transferência e regiões homólogas do DNA do vírus vSynVIgal, que flanqueiam o gene *lac Z* que codifica uma β-galactosidase, permitiram a recuperação do gene da poliedrina pelo vírus recombinante, já que o genoma do vSynVIgal possui o gene *lac Z* inserido no locus do gene da poliedrina (Figura 8). O genoma do vSynVIgal possui um único sítio de *Bsu* 36I dentro do gene *lac Z* e a linearização torna o vírus não infectivo (Kitts *et alli*, 1990), facilitando a purificação do vírus recombinante, já que a recombinação homóloga recupera a forma circular infectiva do genoma do vírus. Os sobrenadantes das placas foram coletados e usados para purificação dos vírus recombinantes, vSyncry4Aa e vSyncry4Ba, em diluições seriadas em placas de 96 poços (O'Reilly *et alli*, 1992). Foram realizados quatro ciclos de diluições seriadas, a partir de poços com formação de poliedros, para a purificação dos vírus recombinantes. A observação de poços contendo células que apresentavam a formação de poliedros foi realizada em um microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Zeiss). Os vírus recombinantes foram amplificados em células BTI-TN5B1-4, purificados e seus DNA extraídos e analisados por PCR, para confirmação da inserção dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, como descrito em O'Reilly *et alli*, (1992).

4.6 – Construção, por transposição, e isolamento de um baculovírus recombinante contendo o gene *cry4Aa*.

Células DH10BacTM foram transformadas com DNA do vetor de transferência pFastcry4Aa de acordo com as instruções do kit Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System, Invitrogen. As células foram incubadas em placa de Petri com IPTG e X-Gal a 37°C por 48 h e os clones positivos selecionados por apresentarem coloração branca devido à interrupção do gene *lac Z* pelo gene *cry4Aa*. Análise por PCR foi realizada para confirmação da inserção e orientação do gene *cry4Aa* no bacmídeo. Um µg do DNA do bacmídeo recombinante foi utilizado para transfectar células de inseto BTI-TN5B1-4 (10⁶ células). O bacmídeo foi diluído em 250 µl de meio de cultura TC-100 sem soro em uma placa de 35 mm. A mesma diluição foi realizada com 10 µl de lipofectina (Cellfectin[®], Invitrogen). As diluições foram misturadas e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. O meio de cultura da placa de células foi, posteriormente, substituído por 500 µl da mistura de DNA/lipofectina possibilitando a cobertura da monocamada de células. A placa foi incubada por 3 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado à placa 1,5 ml de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e as células incubadas a 27°C por sete dias. Seguindo-se este intervalo de tempo, o sobrenadante da placa foi utilizado para amplificação do vírus em nova placa de 100 mm contendo células BTI-TN5B1-4. Foi realizada visualização da placa por microscopia de luz invertida (Axiovert 100, Zeiss).

4.7 – Análise transcricional dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* em células de inseto

Duas placas de 100 mm de diâmetro (TPP) contendo 5 x 10⁶ células BTI-TN5B1-4, incubadas a 27°C, foram utilizadas para infecção com os vírus vSynCry4Aa e vBacCry4Aa

para extração do RNA total 72 h.p.i.. Após o período de incubação, as células foram coletadas e centrifugadas a 5.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em TRIzol[®] (Invitrogen) para extração do RNA total, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi produzido usando-se o oligonucleotídeo T1 (T1: 5'CCTGCAGGATCCTTAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') (Rodrigues *et alli*, 2001) em concentração inicial de 10mM e o Kit M-MLV-RT (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. Dois µl do cDNA correspondente ao mRNA do gene *cry4Aa*, obtido de cada placa foram utilizados para PCR, com um oligonucleotídeo específico para uma região interna do gene, o pCry4AaF3 (Tabela 2). Também foi utilizado, na reação de PCR, um outro oligonucleotídeo, T2 (concentração inicial de 10mM), que é idêntico aos primeiros 17 nucleotídeos do T1 (T2: 5' CCTGCAGGATCCTTAGGTT 3'). À reação foram adicionados dNTP em concentração inicial de 10mM, MgCl²⁺ (25mM) e tampão da *Taq* polimerase 1x (Invitrogen[®]). O programa de PCR para a amplificação dos genes, usando-se 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen[®]) foi composto dos seguintes passos: 94°C/5 min seguido por 30 ciclos de 94°C/1 min e 30 s, 57°C/1 min e 30 s, 72°C/2 min e uma extensão final a 72°C/7 min. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 0.8% e as bandas originadas pela reação de PCR foram eluídas do gel usando-se o kit GFX (Amersham) e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A confirmação do resultado procedeu-se por digestão enzimática com 1 U da enzima *EcoR* V (Promega), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. O produto da digestão foi utilizado para eletroforese em gel de agarose a 1,0%. A mesma metodologia descrita acima foi utilizada para a análise transcricional do gene *cry4Ba*. A reação de PCR a partir do cDNA do gene em questão, foi realizada empregando-se o oligonucleotídeo T2 juntamente com o oligo pCry4BaF5 que anela-se internamente ao gene *cry4Ba*. O programa utilizado para a PCR

foi composto pela seqüência: 94°C/5 min seguido por 30 ciclos de 94°C/1 min, 53°C/1min e 30 s, 72°C/1min e 30 s e uma extensão final a 72°C/7 min. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 0.8%.

4.8 – Expressão das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba ao longo da infecção por baculovírus recombinantes em células de inseto

Os vírus recombinantes, vSynCry4Aa, vBacCry4Aa e vSynCry4Ba foram utilizados, na concentração inicial de 10 pfu (unidade formadora de placa), para infectar, cada vírus, 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4 em três placas de 100 mm de diâmetro (TPP). As placas foram incubadas a 27°C e as células foram coletadas a 72, 96 e 120 h.p.i. e centrifugadas a 5.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado três vezes com PBS (136 mM NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH 7.4). O vírus vSynVIgal foi utilizado como controle para infectar 5×10^6 células em placa de 100 mm de diâmetro. Os extratos de células foram ressuspensos em 100 µl de PBS e estocados a -80°C. Foram utilizados 10 µl de cada amostra para análise em SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970) usando o aparato Mini-Protean II e de acordo com protocolo de instruções do fabricante (Bio-Rad).

4.9 – Expressão de proteínas Cry heterólogas em lagartas de terceiro instar de *Spodoptera frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes.

Duzentas larvas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram infectadas por injeção subcutânea com aproximadamente 30 µl (para cada lagarta) dos vírus recombinantes vBacCry4Aa (10^8 pfu/mL), vSynCry4Aa (10^7 pfu/mL) e vSynCry4Ba (10^7 pfu/mL).

Também foi utilizado o vírus selvagem AcMNPV como controle para infecção de larvas de *S. frugiperda*. Após 120 h.p.i, as lagartas foram coletadas e homogeneizadas em 1 mL de água para cada 10 lagartas. O homogeneizado foi filtrado em lã de vidro e submetido à centrifugação a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e o sedimento ressuspensionado em uma solução contendo 0.5 M de SDS para nova centrifugação a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em uma solução contendo 0.5 M de NaCl e mais uma centrifugação foi feita a 10.000 x g por 10 min. O sedimento foi mantido e, posteriormente, ressuspensionado em uma solução de 100 mM de EDTA, 40 mM de EGTA e 1,0 mM de PMSF. As amostras resultantes, contendo cristais das proteínas Cry heterólogas e outras proteínas, foram analisadas em microscopia de luz (Axiovert 100, Zeiss), fotografadas, e posteriormente armazenadas a -80 °C. As amostras também foram analisadas em SDS-PAGE a 12% para quantificação das proteínas de interesse através do programa Image Phoretix 2D (Pharmacia), que calculou as concentrações das proteínas Cry recombinantes para 1 mL de cada homogeneizado.

4.10 – Purificação de cristais de *Bacillus thuringiensis* por gradiente de sacarose

Esporos de *B. thuringiensis* da estirpe S2036 do banco de *Bacillus* da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, expressando a toxina Cry4Aa, foram inoculados em 600 mL de meio de cultura HCT a 30°C. Após 72 h, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min e o sobrenadante eliminado. O sedimento foi ressuspensionado e lavado em 30 mL de uma solução contendo 0,3M de NaCl, 0,01M de EDTA pH 8,0 e submetido à centrifugação a 12.000 x g por 10 min. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 30 mL de PMSF a 1,0 mM ao final da terceira centrifugação. A amostra foi novamente lavada três vezes com o

mesmo volume de PMSF a 1,0 mM por centrifugação a 12.000 x g por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em tampão TTN (20mM de Tris HCl, 300mM de NaCl, 0,1% de Triton x-100 pH 7,2. A amostra foi submetida a centrifugação a 25.000 x g por 30 min em gradiente de sacarose contendo soluções a 84%, 79%, 72% e 67%. As duas bandas superiores, correspondentes à toxina Cry4A, foram coletadas e adicionadas à solução de Triton x-100 a 0,1%. Três centrifugações foram realizadas, sendo as amostras ressuscitadas em solução de Triton x 100 a 0,1% previamente às centrifugações. O sedimento foi mantido e lavado duas vezes com PMSF a 1mM.

4.11 – Bioensaios

Os bioensaios contra larvas de *A. aegypti* foram realizados utilizando-se as amostras de proteínas Cry heterólogas expressas em baculovírus obtidas do processo de homogeneização de lagartas de *S. frugiperda*, descrito no item 4.9, e a amostra de proteína Cry nativa, obtida de *B. thuringiensis* da estirpe S-2036 como descrito no item 4.10.

Larvas de segundo instar de *A. aegypti*, pertencentes à colônia brasileira Dival, adquiridas junto ao insetário da Zoonose-DF e mantidas segundo o protocolo de criação de mosquitos da instituição, foram separadas em grupos de 25 larvas, em copos de plástico contendo 100 mL de água destilada.

Sete doses das amostras contendo as proteínas Cry4Aa, derivadas dos vírus recombinantes vBacCry4Aa, vSynCry4Aa, Cry4Aa derivada de *Bt* e Cry4Ba derivada do vírus recombinante vSynCry4Ba, além de um controle positivo à base de *Bti* liofilizado foram testadas (Tabela 3). Cada dose foi aplicada em um copo contendo água e larvas de mosquitos mantido a temperatura ambiente por 24 h. Este procedimento foi feito em triplicata para cada dose de cada amostra. Após esse período, fez-se a leitura dos bioensaios

e os dados coletados foram submetidos à análise de Próbitos (Finney, 1971) para se determinar as CL_{50} das amostras testadas. Também foram realizadas análises de variância não-paramétrica usando-se o programa Sigma Stat 3.1 para comparação estatística entre as amostras.

Tabela 3 – Concentração final do bioensaio de dose com as proteínas Cry4Aa, expressa em vBacCry4Aa e vSyncry4Aa, Cry4Aa, expressa por *Bt* e Cry4Ba, expressa em vSyncry4Ba, contra larvas de segundo instar de *Aedes aegypti*.

Dose	Número de larvas no copo	Volume de água em mL no copo	Concentração final (ng/mL)
1	25	100	350
2	25	100	280
3	25	100	225
4	25	100	175
5	25	100	105
6	25	100	70
7	25	100	17

Tabela 4 – Concentração final do bioensaio de dose com o controle positivo à base de *Bti*.

Dose	Número de larvas no copo	Volume de água em mL no copo	Concentração final (ng/mL)
1	25	100	10
2	25	100	8
3	25	100	6
4	25	100	4
5	25	100	2
6	25	100	1
7	25	100	0,5

5 – RESULTADOS

5.1 – Clonagem dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* e seqüenciamento do gene *cry4Aa*.

A amplificação dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* por PCR, com oligonucleotídeos específicos já descritos, gerou fragmentos de 3.557 pb e 3.439 pb, respectivamente. Estes foram clonados no vetor de clonagem pGEM[®]-Teasy (Promega), resultando na construção dos plasmídeos pGemcry4Aa e pGemcry4Ba (figura 12 A e B). A confirmação das clonagens foi realizada por ensaios de restrição, a partir de 300 ng do DNA plasmidial dos clones positivos, com a enzima *BamH* I para o gene *cry4Aa* e *EcoR* I e *BamH* I (Promega) para o gene *cry4Ba* (figura 12 C). Análise seqüencial dos clones positivos, inicialmente com os oligonucleotídeos SP6 e T7 e, posteriormente com os oligonucleotídeos internos do gene *cry4Aa* e descritos na tabela 2, resultou em uma ORF de 3543 pb correspondente a 1180 aminoácidos. A análise por BLAST do seqüenciamento obtido revelou alterações em onze nucleotídeos, o que resultou na mudança de oito aminoácidos S16T, E32G, T301P, F569L, H572R, D980N, F1168V, I1170K (figura 13). A análise por BLAST revelou ainda, que o gene *cry4Aa* possui 98% de identidade com o gene *cry4Aa1* descrito por Ward & Ellar, 1987, depositado no Genbank acesso n°Y00423.

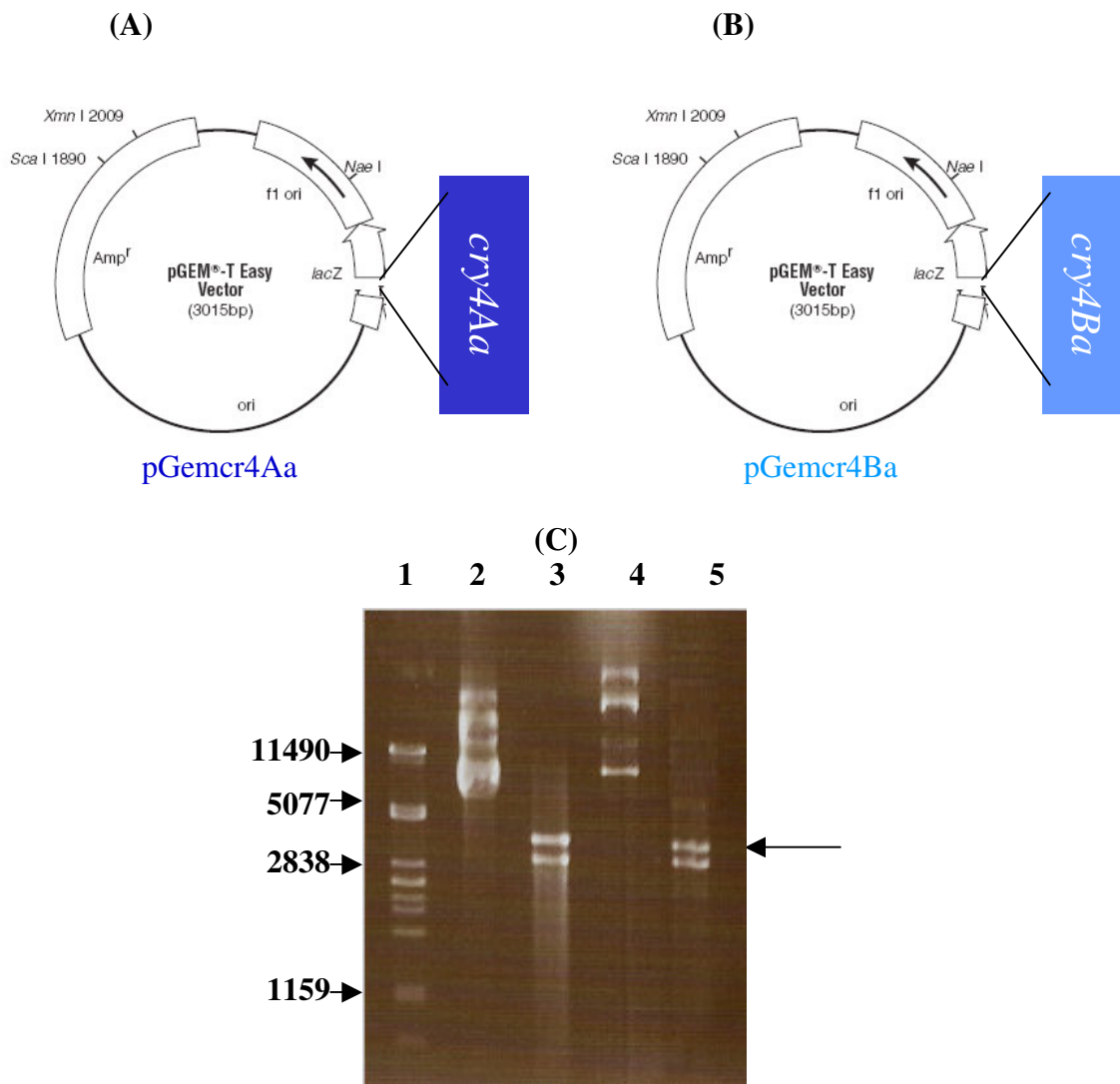


Figura 11. Clonagem dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* no vetor de clonagem pGem[®]-Teasy. **A e B**, esquema da clonagem dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*. **C**, gel de agarose a 0,8% mostrando as digestões dos vetores de clonagem pGem[®]cry4Aa e pGem[®]cry4Ba. 1, marcador Lambda/*Pst*I (Promega); 2, DNA do plasmídeo pGem[®]cry4Aa (não digerido); 3, digestão do plasmídeo pGem[®]cry4Aa com a enzima de restrição *Bam*H I para liberação do fragmento de aproximadamente 3,5 kb correspondente ao gene *cry4Aa*; 4, DNA do plasmídeo pGem[®]cry4Ba (não digerido); 5, digestão do plasmídeo pGem[®]cry4Ba com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Eco*R I para liberação do fragmento de aproximadamente 3,4 kb correspondente ao gene *cry4Ba*. A seta indica os genes liberados pelas digestões logo acima da banda de 3,0 kb, correspondente ao plasmídeo pGem[®]-Teasy (Promega).

BamHI
pCry4AaF →
-7 cggatcc

1 atgaatccttatcaaaataa^aaatgaatatgaaacattaatgctt^acacaaaaaaaaattaaatatatctaataattatacaagatatccaatag^gaaaatagt 102
M N P Y Q N K N E Y E T L N A S>T Q K K L N I S N N Y T R Y P I E>G N S
103 ccaaaacaattattacaaagtacaaattataaagattggctcaatatgtgtcaacagaatcagcagtatgggtggagattttgaaacttttattgatagtggt 204
P K Q L L Q S T N Y K D W L N M C Q Q N Q Q Y G G D F E T F I D S G
205 gaactcagtgctatactattgtagttgggaccgtactgactggtttcggggttcacaacacccttaggacttgctttaataggttttggtacattaatacca 306
E L S A Y T I V V G T V L T G F G F T T P L G L A L I G F G T L I P
307 gttctttttccagcccaagaccaatctaacacatggagtgactttataacacaaaactaaaaatattataaaaaaagaaatagcatcaacatatataagtaat 408
V L F P A Q D Q S N T W S D F I T Q T K N I I K K E I A S T Y I S N
409 gctaataaaaattttaaacaggtcgtttaatggttatcagcacttatcataatcaccttaaaacatg^aggagaataatccaaccacaaaataactcaggatgta 510
A N K I L N R S F N V I S T Y H N H L K T W E N N P N P Q N T Q D V
511 aggacacaaaatccagctagttcattaccattttcaaaatgtcattccagagcttgtaaactcttgctcctcctaatacctagtgattgcgactactataacata 612
R T Q I Q L V H Y H F Q N V I P E L V N S C P P N P S D C D Y Y N I
613 ctagtattatctagttatgcacaagcagcaaaacttacatctgactgtattaaatcaagccgtcaaat^attgaagcgtatttaaaaaacaatcgacaattcgat 714
L V L S S Y A Q A A N L H L T V L N Q A V K F E A Y L K N N R Q F D
pCry4AaF1 →
715 tattta^agagcctttgccaacagcaattgattattatccagattgactaaagctatagaagattacactaattattgtgtaacaacttataaaaaaggatta 816
Y L E P L P T A I D Y Y P V L T K A I E D Y T N Y C V T T Y K K G L
817 aatttaattaaacgcagcctgatagtaaatcttgatggaaatataaaactggaacacatacaatacgtatcgaca^aaaaatgactcctgctgtattagatcctt 918
N L I K T T P D S N L D G N I N W N T Y N T Y R T K M T T>P A V L D L
919 gttgcaactctttcctaattatgatgtaggtaaataccaatagggtgtccaatctgaacttactcgagaaaatttatcagggtacttaacttcgaagaaagcccc 1020
V A L F P N Y D V G K Y P I G V Q S E L T R E I Y Q V L N F E E S P
1021 tataaatattatgactttcaatatcaagaggattcacttacacgtagaccgcat^attttacttggcttgattctttgaa^atttttatgaaaaagcgcaaaact 1122
Y K Y Y D F Q Y Q E D S L T R R P H L F T W L D S L N F Y E K A Q T
1123 actcctaataattttttaccagccattataaatg^atttcattacacacttgataatataatcccaaaaatctagtg^atttttggaa^aatcacaatgtaactgat 1224
T P N N F F T S H Y N M F H Y T L D N I S Q K S S V F G N H N V T D
1225 aaattaaaatctcttgg^atttggcaacaatatttatatttttttattaaatgtcataagcttagataaataaatatcta^aatgattataataatattagtaaa 1326
K L K S L G L A T N I Y I F L L N V I S L D N K Y L N D Y N N I S K
1327 atggatttttttataactaatgg^atactagacttttggagaaaagaacttacagcaggatctgggcaaaataacttatgatgta^aataaaaaatattttcgggtta 1428
M D F F I T N G T R L L E K E L T A G S G Q I T Y D V N K N I F G L
1429 ccaattcttaaacgaagagagaatcaaggaaaaccctaccctttttccaacatatgataactatagtcata^attttatcatttataaaagtcttagtatccct 1530
P I L K R R E N Q G N P T L F P T Y D N Y S H I L S F I K S L S I P
1531 gcaacatataaaaactcaagtgat^aacg^atttggacacactctagtg^attgatcctaaaaatacaatttatacacatttaactacc^aaaattccagctgta 1632
A T Y K T Q V Y T F A W T H S S V D P K N T I Y T H L T T Q I P A V

pCry4AaF3

c g

1633 aaagcgaattcacttgggactgcttctaaggttggtcaaggacctgggtcatacaggaaggggatttaattgatttcaaaagatcatttcaaaattacatgtcaa 1734
K A N S L G T A S K V V Q G P G H T G G D L I D F>L K D H>R F K I T C Q

1735 cactcaaatTTTcaacaatcgtatTTTataagaattcgttatgcttcaaatggaagcgcaaatactcgagctgttataaatcttagtatcccaggggtagca 1836
H S N F Q Q S Y F I R I R Y A S N G S A N T R A V I N L S I P G V A

1837 gaactgggtatggcactcaacccactTTTTctggtacagattatacgaattTaaatataaagattttcagtacttagaattttctaacgaggtgaaattt 1938
E L G M A L N P T F S G T D Y T N L K Y K D F Q Y L E F S N E V K F

1939 gctccaaatcaaaacatatctcttgtgtttaaTcgttcggatgtatatacaaacacacagtacttattgataaaattgaattttctgccaattactcgttct 2040
A P N Q N I S L V F N R S D V Y T N T T V L I D K I E F L P I T R S

2041 ataagagaggatagagagaaacaaaaattagaacagtacaacaaataattaatacattttatgcaaatcctataaaaaaacactttacaatcagaacttaca 2142
I R E D R E K Q K L E T V Q Q I I N T F Y A N P I K N T L Q S E L T

2143 gattatgacatagatcaagccgcaaatcttTgtggaatgattttctgaagaattatTcaaaaagaaaaatgctgttattagatgaagTtaaaaatgcgaaa 2244
D Y D I D Q A A N L V E C I S E E L Y P K E K M L L D E V K N A K

2245 caacttagtcaatctcgaaatgtacttcaaacggggattttgaatcggctacgcttggtTggacaacagtgataaatTcacaattcaagaagatgatcct 2346
Q L S Q S R N V L Q N G D F E S A T L G W T T S D N I T I Q E D D P

2347 atTTTTaaagggcattacctTcatatgtctggggcgagagacattgatggTacgatattTccgacctatattTccaaaaattgatgaatcaaaattaaa 2448
I F K G H Y L H M S G A R D I D G T I F P T Y I F Q K I D E S K L K

← pCry4AaR2

2449 ccgtatacacgTtacctagTaaagggattTgttaggaagtagTaaagatgtagaactagTggTttcacgctatggggaagaaattgatgccatcatgaatgTt 2550
P Y T R Y L V R G F V G S S K D V E L V V S R Y G E E I D A I M N V

2551 ccagctgattTaaactatctgtatcctTctacctTtgattTgtgaagggTctaactcgtTgtgagacgtccgctgtgccggTtaacattgggaaactTctgat 2652
P A D L N Y L Y P S T F D C E G S N R C E T S A V P A N I G N T S D

2653 atgtTgattTcatgccaatatgatacagggaaaaagcatgtcgtatgtcaggattcccTcaatttagTttcactattgatacaggggcattagatacaaat 2754
M L Y S C Q Y D T G K K H V V C Q D S H Q F S F T I D T G A L D T N

2755 gaaaaataggggTttgggtcatgtTaaaatattctTccagatggatacgcatcattagataattTtagaagTaatTgaagaagggccaatagatggggaa 2856
E N I G V W V M F K I S S P D G Y A S L D N L E V I E E G P I D G E

← pCry4AaR1

g a

2857 gcactgtcacgcgtgaaacacatggagaagaaatggaacgatcaaatggaagcaaaacgTtcggaTaaacaacaagcatatgatTtagcgTaaacaagccatt 2958
A L S R V K H M E K K W N D Q M E A K R S E T Q Q A Y D>N V A K Q A I

2959 gatgctTtattTcaacaatgtacaagatgaggctTtacagTttgatacgcactcgctcaaattcagTactgctgagTattTggtacaatcgattccatattgtg 3060
D A L F T N V Q D E A L Q F D T T L A Q I Q Y A E Y L V Q S I P Y V

3061 tacaatgattggTtTgtcagatgtTccaggtatgaattatgatatctatgtagagTtggatgcacgagTggcacaagcgctTattTgtatgatacaagaaat 3162
Y N D W L S D V P G M N Y D I Y V E L D A R V A Q A R Y L Y D T R N

3163 attattaaaaatggTgattTtacacaagggTtaattggggTggcatgTaaactggaaatgcagacgtacaacaaatagatggTgtTctgtattggTtctatct 3264
I I K N G D F T Q G V M G W H V T G N A D V Q Q I D G V S V L V L S

3265 aattggagTgctggcgtatctcaaaatgtccatctccaacataatcatgggtatgtctTactgTtattTgcaaaaaagaaggacctggaaatgggtatgtc 3366
N W S A G V S Q N V H L Q H N H G Y V L R V I A K K E G P G N G Y V

```

3367 acgcttatggattgtgaggagaatcaagaaaaattgacgtttacgtcttgtgaagaaggatatattacgaagacagtagatgtattcccagatacagatcgt 3468
    T L M D C E E N Q E K L T F T S C E E G Y I T K T V D V F P D T D R
                                     g      aa
                                     BamHI
3469 gtacgaattgagataggcgaaccgaaggttcgttttatatcgaagcattgaattaatttgcacgaacgagtgacctaggc 3550
    V R I E I G E T E G S F>V Y I>K E S I E L I C M N E *
                                     pCry4AaR

```

Figura 12. Análise da seqüência do gene *cry4Aa*. Os oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento (Tabela 2) estão em destaque. Em azul, são mostrados os oligos (“forward”) pCry4AaF, pCry4AaF1, pCry4AaF2 e pCry4AaF3. Em vermelho são mostrados os oligos (“reverse”) pCry4AaR, pCry4AaR1, e pCry4AaR2. Em marrom, estão demarcados os nucleotídeos e aminoácidos que diferem em relação à seqüência do gene *cry4Aa* descrita por Ward & Ellar (1987), depositado no Genbank acesso nº Y00423. Em roxo, aparecem as seqüências correspondentes ao sítio de restrição da enzima *BamH* 1. A seqüência de aminoácidos é mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. Os sítios de início (*atg*) e término da tradução (*tga*) são mostrados em itálico.

pCry4BaF1 →
atgggaggaataaat

Eco RI

1 atgaattcaggctatccgtagcgaatgacttacaagggtcaatgaaaaacacgaactataaagattggctagccatgtgtgaaaataaccaacagtatggc 102
M N S G Y P L A N D L Q G S M K N T N Y K D W L A M C E N N Q Q Y G

103 gttaatccagctgcgattaattcttcttcagtttagtaccgctttaaagtagctggagctatccttaaatttgtaaaccacctgcaggtagtcttaacc 204
V N P A A I N S S S V S T A L K V A G A I L K F V N P P A G T V L T

205 gtacttagcgcggtgcttcctattctttggccgactaatactccaacgcctgaaagagtttggaatgatttcatgaccaatacaggggaatcttattgatcaa 306
V L S A V L P I L W P T N T P T P E R V W N D F M T N T G N L I D Q

307 actgtaacagcttatgtacgaacagatgcaaatgcaaaaatgacggttgtgaaagattaattagatcaatatacaactaaatttaacacttggaaaagagag 408
T V T A Y V R T D A N A K M T V V K D Y L D Q Y T T K F N T W K R E

← pCry4BaR1

409 cctaataaccagtcctatagaacagcagtaataactcaatttaacttaaccagtgccaaacttcgagagaccgcagtttatttttagcaacttagtagttat 510
P N N Q S Y R T A V I T Q F N L T S A K L R E T A V Y F S N L V G Y

511 gaattattgttattaccaatatacgcacaagtagcaaatttcaatttacttttaataagagatggcctcataaatgcacaagaatggcttttagcacgtagt 612
E L L L L P I Y A Q V A N F N L L L I R D G L I N A Q E W S L A R S

613 gctggtagaccaactatataacactatggtgcagtacactaaagaatatattgcacatagcattacatgggtataataaaggtttagatgtacttagaaaataaa 714
A G D Q L Y N T M V Q Y T K E Y I A H S I T W Y N K G L D V L R N K

715 tctaattggacaatggattacgtttaatgattataaaaagagagatgactattcaagtattagatatactcgctctttttgccagttatgatccacgtcgatac 816
S N G Q W I T F N D Y K R E M T I Q V L D I L A L F A S Y D P R R Y

817 cctgcggacaaaatagataatacgaactatcaaaaacagaatttacaagagagatttatacagcttttagtagaatctccttctagtaaatctatagcagca 918
P A D K I D N T K L S K T E F T R E I Y T A L V E S P S S K S I A A

pCry4BaF3 →

← pCry4BaR2

919 ctggaggcagcacttacacgagatgttcatttattcacttggctaaagagagtagattttctggaccaatactatataatcaagatttaagatttttatctgcc 1020
L E A A L T R D V H L F T W L K R V D F W T N T I Y Q D L R F L S A

1021 aataaaaattgggttttcatatacaaatcttctgcaatgcaagaaaagtggaatttatggaagttctggttttggttcaaatcttactcatcaaatcaactt 1122
N K I G F S Y T N S S A M Q E S G I Y G S S G F G S N L T H Q I Q L

1123 aattctaattgtttataaaaacttctatcacagatactagctcccctctaactcgagttacaaaatggattttctacaaaattgatggtagcttctgcctcttat 1224
N S N V Y K T S I T D T S S P S N R V T K M D F Y K I D G T L A S Y

1225 aattcaaatataacaccaactcctgaaggtttaaggaccacattttttggattttcaacaaatgagaacacacacatcaaccaactgtaaatgattatac 1326
N S N I T P T P E G L R T T F F G F S T N E N T P N Q P T V N D Y T

pCry4BaF4 →

← pCry4BaR3

1327 catattttaagctatataaaaactgatgttatagattataacagtaaacagggtttcatttgcctggacacataagattgttgaccctaataatcaaatatac 1428
H I L S Y I K T D V I D Y N S N R V S F A W T H K I V D P N N Q I Y

1429 acagatgctatcacacaagttccggccgtaaaatctaacttcttgaatgcaacagctaaaagtaatacaaggacctggtcatacaggggggggatctagttgct 1530
 T D A I T Q V P A V K S N F L N A T A K V I K G P G H T G G D L V A

1531 cttacaagcaatggactctatcaggcagaatggagattcaatgtaaaacaagatatttttaaatgatcctacaagaagttacggattacgcatacgttatgct 1632
 L T S N G T L S G R M E I Q C K T S I F N D P T R S Y G L R I R Y A

1633 gcaaatagtccaattgtattgaatgtatcatatgtattacaaggagtttctagaggaacaacgattagtagacaagaatctacgttttcaagacctaataatata 1734
 A N S P I V L N V S Y V L Q G V S R G T T I S T E S T F S R P N N I

1735 atacctacagatttaaaatgaagagtttagatacaaagatccttttgatgcaattgtaccgatgagattatcttctaatacaactgataactatagctatt 1836
 I P T D L K Y E E F R Y K D P F D A I V P M R L S S N Q L I T I A I

1837 caaccattaacatgacttcaaataatcaagtgattattgacagaatcgaaattaattccaatcactcaatctgtatttagatgagacagagaacccaaaattta 1938
 Q P L N M T S N N Q V I I D R I E I I P I T Q S V L D E T E N Q N L

1939 gaatcagaacgagaagttgtgaatgcaactgtttacaatgacgcgaaagatgcattaaacattggaacgcagattatgacatagatcaagccgcaaatctt 2040
 E S E R E V V N A L F T N D A K D A L N I G T T D Y D I D Q A A N L

2041 gtggaatgtatttctgaagaattatatacctaaagaaaaaatgctgttattagatgaagttaaaatgcaaacacacttagtcaatctcgaaatgtacttcaa 2142
 V E C I S E E L Y P K E K M L L L D E V K N A K Q L S Q S R N V L Q

2143 aacgggggattttgaatcggtctacgcttgggttgacaacaagtgataatatcacaattcaagaagatgatcctatttttaagggcattaccttcatatgtct 2244
 N G D F E S A T L G W T T S D N I T I Q E D D P I F K G H Y L H M S

2245 ggggcgagagacattgatggtacgatatttccgacctatataattccaaaaaattgatgaatcaaaaataaaaccgtatacacgttacctagtaaggggattt 2346
 G A R D I D G T I F P T Y I F Q K I D E S K L K P Y T R Y L V R G F

2347 gtaggaagtagtaagatgtagaaactagtggtttcacgctatggggaagaaattgatgccatcatgaatgttccagctgatttaactatctgtatccttct 2448
 V G S S K D V E L V V S R Y G E E I D A I M N V P A D L N Y L Y P S

2449 acctttgattgtgaagggctaatcgttgtgagacgtccgctgtgccggctaacattgggaacacttctgatatggttattcatgccaatatgatacaggg 2550
 T F D C E G S N R C E T S A V P A N I G N T S D M L Y S C Q Y D T G

2551 aaaaagcatgtcgtatgtcaggattcccattcaatttagtttcaactattgatagagggggcattagatacaaatgaaaataggggtttgggtcatgtttaa 2652
 K K H V V C Q D S H Q F S F T I D T G A L D T N E N I G V W V M F K

2653 atatcttctccagatggatacgcattagataatttagaagtaattgaagaagggccaatagatggggaagcactgtcacgcgtgaaacacatggagaag 2754
 I S S P D G Y A S L D N L E V I E E G P I D G E A L S R V K H M E K

2755 aaatggaacgatcaaatggaagcaaacggttcggaacacacaagcatatgatgtagcgaacaagccattgatgctttattcacaatgtacaagatgag 2856
 K W N D Q M E A K R S E T Q Q A Y D V A K Q A I D A L F T N V Q D E

2857 gctttacagtttgatacgcactcgtcaaattcagtacgctgagtatttgtaaatcgattccatattgtgtacaatgattggttgtcagatgttccaggt 2958
 A L Q F D T T L A Q I Q Y A E Y L V Q S I P Y V Y N D W L S D V P G

2959 atgaattatgatctatgtagagttggatgcacgagtgccacaagcgcgttatttggatgatacaagaatattattaaaaatggtgattttacacaaggg 3060
 M N Y D I Y V E L D A R V A Q A R Y L Y D T R N I I K N G D F T Q G

3061 gtaatgggggtggcatgtaactggaaaatgcagacgtacaacaaatagatggtgtttctgtattggttctatctaattggagtgctggcgtatctcaaaatgct 3162
 V M G W H V T G N A D V Q Q I D G V S V L V L S N W S A G V S Q N V

```

3163 catctccaacataatcatgggtatgtcttacgtgttattgccaaaaaagaaggacctggaaatgggtatgtcacgcttatggattgtgaggagaatcaagaa 3264
    H L Q H N H G Y V L R V I A K K E G P G N G Y V T L M D C E E N Q E
3265 aaattgacgtttacgtcttgtgaagaaggatatattacgaagacagtagatgtattcccagatacagatcgtgtacgaattgagataggcgaaaccgaaggt 3366
    K L T F T S C E E G Y I T K T V D V F P D T D R V R I E I G E T E G
                                     ← pCry4BaR      BamHI
3367 tcgttttatatcgaaagcattgaattaatttgcatgaacgagtgacctaggc 3419
    S F Y I E S I E L I C M N E *

```

Figura 13. Análise da seqüência do gene *cry4Ba*. Os oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento (Tabela 2) estão em destaque. Em azul, são mostrados os oligos (“forward”) pCry4BaF, pCry4BaF1, pCry4BaF2, pCry4BaF3, pCry4BaF4, pCry4BaF5 e pCry4BaF6. Em vermelho são mostrados os oligos (“reverse”) pCry4BaR, pCry4BaR1, pCry4BaR2, pCry4BaR3, pCry4BaR4, pCry4BaR5, pCry4BaR6. Em verde escuro, está mostrado o nucleotídeo que difere em relação à seqüência do gene *cry4Ba1* descrita por Chungjatpornchai *et alli*, 1988 e depositada no GeneBank acesso nº X00423.. Em verde claro é mostrada a seqüência do sítio de restrição da enzima *EcoR* I. Em roxo, aparecem as seqüências correspondentes ao sítio de restrição da enzima *Bam* HI. A seqüência de aminoácidos é mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. Os sítios de início (*atg*) e término da tradução (*tga*) são mostrados em itálico.

5.2 – Construção dos vetores de transferência e dos baculovírus recombinantes

Após digestão dos plasmídeos pGemcry4Aa e pGemcry4Ba para liberação dos genes clonados, os mesmos foram, respectivamente, inseridos nos vetores de transferência pSynXIV VI+X3, previamente digerido e linearizado com *Bgl*III, e pSynXIV VI+X3/3, previamente digerido com as enzimas *Eco*R I e *Bgl* II. As novas construções deram origem aos plasmídeos pSyncry4Aa e pSyncry4Ba. O gene liberado do pGemcry4Aa também foi clonado, para comparação, no vetor de transferência pFastBac1[®], previamente digerido com a enzima *Bam*H I, originando o plasmídeo pFastcry4Aa.

A confirmação das inserções gênicas nos plasmídeos vetores se deu por PCR com o oligonucleotídeo ORF 603 que anela-se entre os nucleotídeos +8 e -11 relativos ao códon de início da ORF 603, específico para o pSynXIV VI+X3 e oligos específicos para os genes *cry4Aa* e *cry4Ba* (Figura 14). Para o plasmídeo pFastcry4Aa o oligonucleotídeo polhR, específico para o promotor da poliedrina no pFastBac1[®] foi utilizado juntamente com um oligo específico para o gene *cry4Aa* (Figura 14).

Os vetores pSyncry4Aa e pSyncry4Ba foram co-transfectados com o DNA do baculovírus vSynVIgal em células de inseto BTI-TN5B1-4 para assim, gerar os vírus vSyncry4Aa e vSyncry4Ba por recombinação homóloga. Este evento permite a expressão do gene exógeno sob o comando do promotor alterado da poliedrina, o PXIV (Wang *et alli*, 1991). Ainda, os vírus recombinantes recuperaram o gene da poliedrina que é expresso sob o comando do promotor da poliedrina. Após isolamento em placas de diluição de 96 poços, a confirmação das inserções gênicas, no genoma dos baculovírus parentais, foi realizada por PCR com oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse, *cry4Aa* e *cry4Ba*, que produziu fragmentos correspondentes a esses dois genes (Figura 14).

O vetor pFastcry4Aa deu origem ao vírus recombinante vBacCry4Aa por transposição, em células de *E. coli* DH10BacTM. A confirmação da inserção do gene *cry4Aa* no genoma do baculovírus foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos M13F, específico para o Bacmídeo e o oligo pCry4AaR (Figura 14).

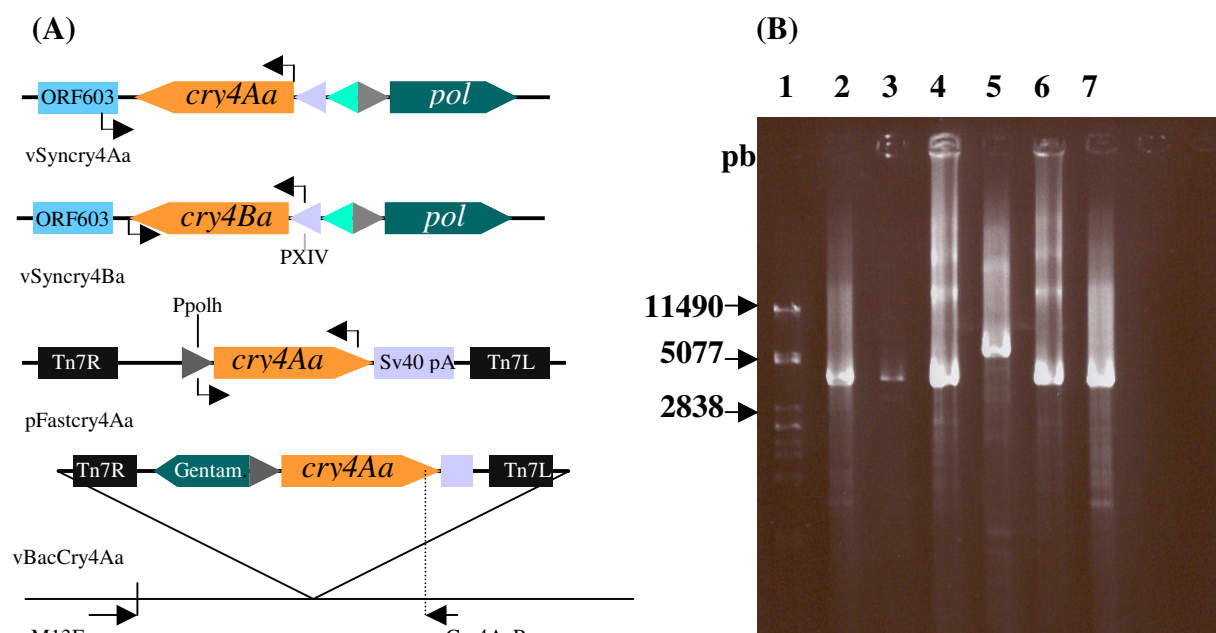


Figura 14. Análise da inserção correta dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* nos vetores pSynXIV VI+X3, PSynXIV VI+X3/3 e pFastBac1[®] e vírus recombinantes. **A**, esquema mostrando a posição dos genes clonados no lócus do gene da poliedrina nos diferentes vírus recombinantes. **B**, gel de agarose a 0,8% para confirmação das construções plasmidiais e dos vírus recombinantes. 1, marcador Lambda/*Pst*I (Promega); 2, PCR do vetor pSyncry4Ba com os oligos polhF/pCry4BaR produzindo um fragmento de aproximadamente 3.6 kb; 3, PCR do vetor pFastcry4Aa com os oligos polhF/ pCry4AaR produzindo um fragmento de aproximadamente 3,6 kb; 4, PCR do vetor pSyncry4Aa com os oligos pCry4AaF/ORF603 produzindo um fragmento de aproximadamente 3,6 kb; 5, PCR do vírus recombinante vBacCry4Aa com os oligos M13F/pCry4AaR produzindo um fragmento de aproximadamente 5.0 kb; 6, PCR do vírus recombinante vSynCry4Aa com os oligos pCry4AaF/ORF603; 7, PCR do vírus recombinante vSynCry4Ba com os oligos pPolhF/pCry4BaR.

Células de inseto BTI-TN5B1-4, infectadas em placas individuais com os vírus recombinantes vSynCry4Aa, vSynCry4Ba e vBacCry4Aa, foram visualizadas por microscopia de luz invertida, após sete dias de infecção, para identificação de possíveis cristais constituídos pelas proteínas recombinantes dos vírus construídos (Figura 15).

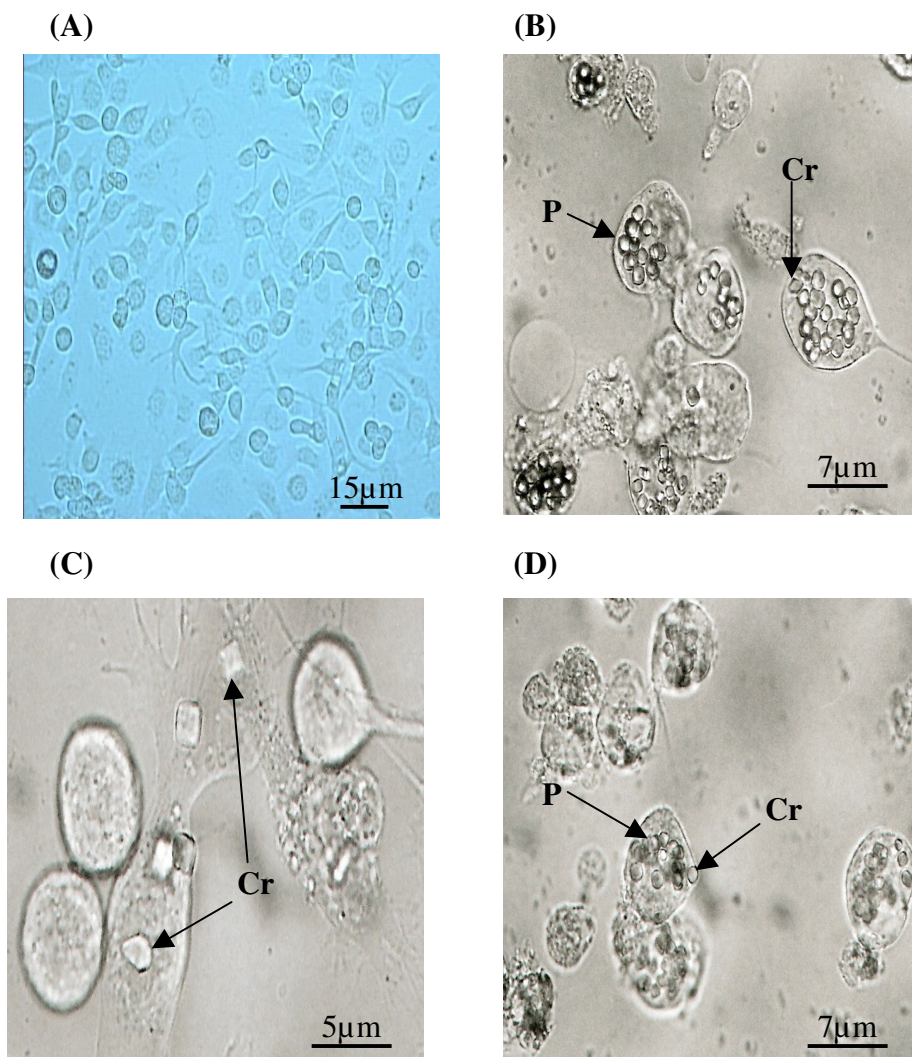


Figura 15. Microscopia de luz invertida de células de inseto BTI-TN5B1-4 infectadas com baculovírus recombinantes após sete dias de infecção. A, células não infectadas (mock); B, Células infectadas com o vírus vSynCry4Aa; C, Células infectadas com o vírus vBacCry4Aa; (D) – Células infectadas com o vírus vSynCry4Ba; (Cr) – possíveis cristais das proteínas recombinantes; (P) – poliedro.

5.3 – Análise transcricional dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*

A transcrição dos genes exógenos inseridos nos baculovírus recombinantes construídos neste trabalho, se fez por RT-PCR a partir do mRNA isolado de placas de 100 mm (TPP) contendo 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4, infectadas com os baculovírus recombinantes vBacCry4Aa, vSynCry4Aa e vSynCry4Ba a 72 h.p.i.. O oligonucleotídeo pCry4AaF3, específico para a região interna do gene *cry4Aa*, e que anela-se na posição 1669 a 1680 em relação ao início do gene, produziu um fragmento esperado de aproximadamente 2.000 pb ao final da reação com as amostras dos vírus vBacCry4Aa e vSynCry4Aa. O produto obtido pela RT-PCR foi submetida a uma digestão com a enzima de restrição *EcoR* V (Promega), que corta o gene na posição 3.102, em relação ao sítio de início do gene. A digestão produziu um fragmento de cerca de 500 pb e outro de aproximadamente 1500 pb, conforme esperado (Figura 16 A). O cDNA produzido a partir da amostra do vírus vSynCry4Ba, foi gerado com o oligonucleotídeo pCry4BaF5, específico para a região interna do gene *cry4Ba*. O fragmento obtido, ao final da RT-PCR correspondeu a aproximadamente 1.700 pb e não a 1000 pb como esperado, já que o oligonucleotídeo pCry4BaF5 anela-se na posição +2548 a +2565 em relação ao sítio de início do gene. Sendo assim, foi realizada, para confirmação, outra reação de PCR com os oligonucleotídeos pCry4BaF5 e pCry4BaR6, sendo que este último anela-se na posição 3.067 a 3.084 em relação ao sítio de início do gene (Figura 16 B).

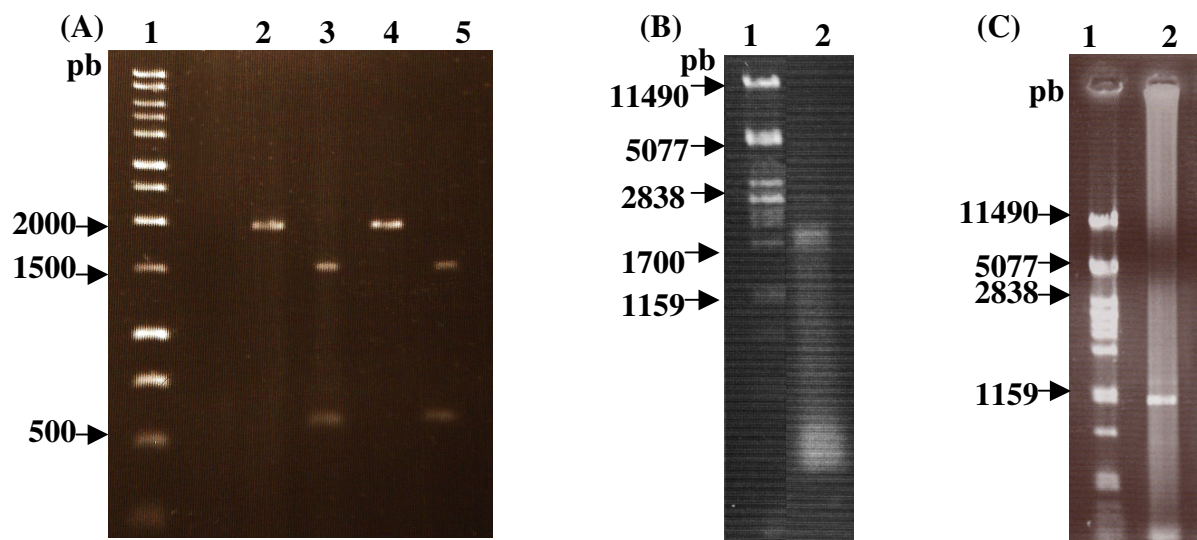


Figura 16. Análise transcricional dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* em células de inseto com os baculovírus recombinantes. Gel de agarose a 0,8%, evidenciando a transcrição por RT-PCR dos genes heterólogos *cry4Aa* (A) e *cry4Ba* (B e C). A, 1, marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 2, RT-PCR a partir de células infectadas com vBacCry4Aa; 3, digestão do RT-PCR de células infectadas com o vBacCry4Aa com *EcoR* I; 4, RT-PCR a partir de células infectadas com vSynCry4Aa; 5, digestão do RT-PCR de células infectadas com o vSynCry4Aa com *EcoR* I. B, 1, marcador Lambda/*Pst*I (Promega); 2, RT-PCR de células infectadas com o vSynCry4Ba. C, PCR com os oligos pCry4BaF5/pCry4BaR6, a partir do RT-PCR realizado com células infectadas com vSynCry4Ba.

5.4 – Análise da expressão das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba de baculovírus recombinantes em células de inseto

A expressão das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba, em células de inseto, foi analisada nos intervalos de 72, 96 e 120 horas, a partir do momento da infecção de placas de 100 mm contendo células BTI-TN5B1-4, com os vírus recombinantes vBacCry4Aa, vSynCry4Aa e vSynCry4Ba. Extratos das células infectadas foram analisados em SDS-PAGE para detecção das proteínas recombinantes em torno de 130 kDa. Uma banda apresentando cerca de 29 kDa, correspondente à poliedrina, também foi identificada nas amostras derivadas de

células infectadas com os vírus vSynCry4Aa e vSynCry4Ba. A amostra de extrato de células infectadas com o vírus parental, vSynVTgal, apresentou uma banda de 116 kDa correspondente à β -galactosidase, um produto do gene *lac Z*, enquanto a amostra de células não infectadas (mock) produziu um perfil de proteínas diferente das demais amostras (Figura 17).

5.5 – Análise da expressão de proteínas Cry recombinantes em lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*.

Amostras de extrato de lagartas infectadas com os vírus recombinantes vBacCry4Aa, vSynCry4Aa e vSynCry4Ba, 120 h.p.i., foram aplicadas em SDS-PAGE a 12% para análise do conjunto de proteínas obtidas da preparação dos extratos. Foram identificadas, no gel, bandas de 130 kDa nas três amostras, correspondentes às proteínas Cry recombinantes. As amostras dos extratos de lagartas infectadas com o vírus selvagem, AcMNPV, apresentou uma banda de destaque, de 29 kDa, correspondente à poliedrina, enquanto a amostra de lagartas não infectadas (mock) produziu um perfil de proteínas diferente das demais amostras (figura 18 A). As amostras dos extratos de lagartas infectadas pelos vírus recombinantes, foram ainda, utilizadas para visualização em microscopia de luz invertida (Axiovert 100, Zeiss). Todas as amostras apresentaram cristais de tamanhos variados, mas predominantemente na forma bipiramidal (Figura 18 B, C e D).

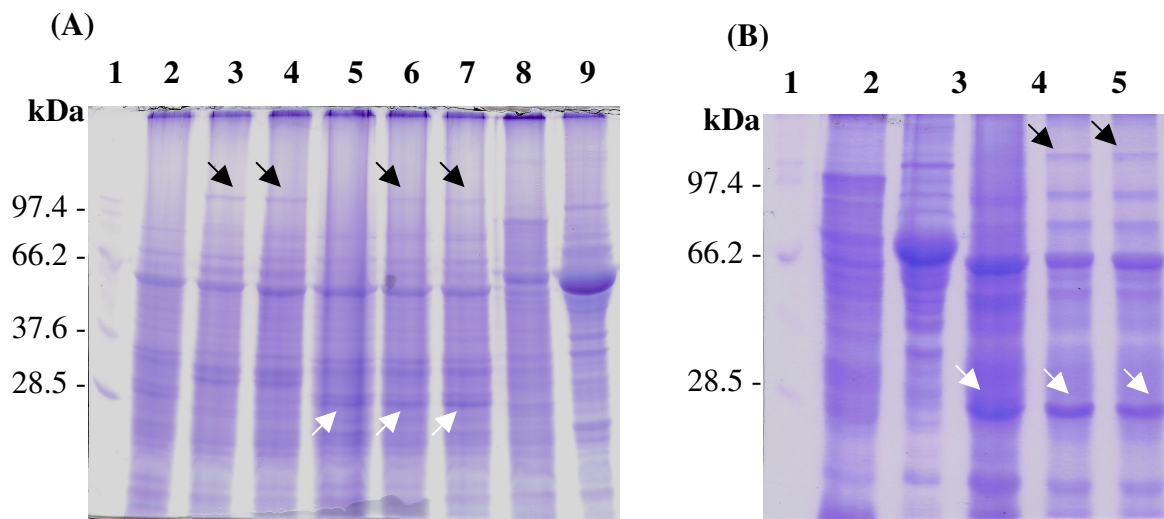


Figura 17. Análise da expressão das proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry4Ba em células de inseto infectadas com os baculovírus recombinantes. SDS-PAGE a 12% mostrando em **A**, 1, marcador de massa molecular (Jena Bioscience); 2, 3 e 4, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vBacCry4Aa a 72, 96 e 120 h.p.i.; 5, 6 e 7, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynCry4Aa a 72, 96 e 120 h.p.i.; 8, extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas; 9, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynVIgal 120 h.p.i. **B**, 1, Marcador de massa molecular (Jena Bioscience); 2, mock; 3, extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynVIgal 120 h.p.i.; 4, 5 e 6, extrato de células extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com vSynCry4Ba a 72, 96 e 120 h.p.i.. As setas pretas indicam as proteínas Cry recombinantes de 130 kDa. As setas brancas indicam bandas correspondentes à proteína poliedrina.

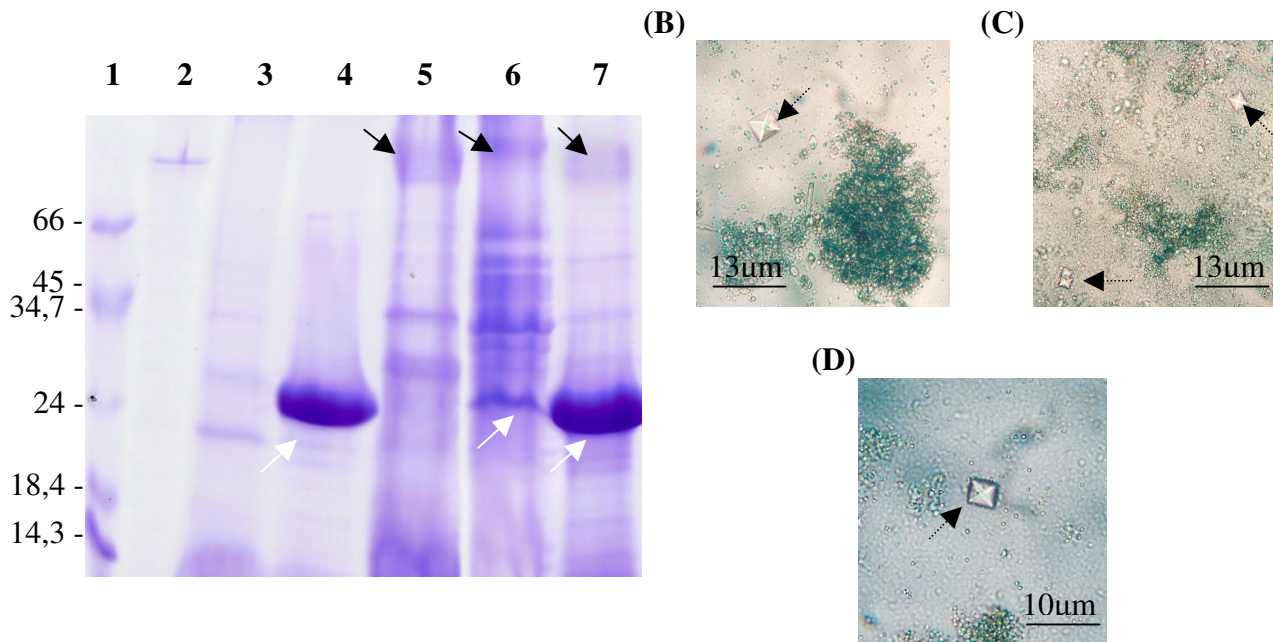
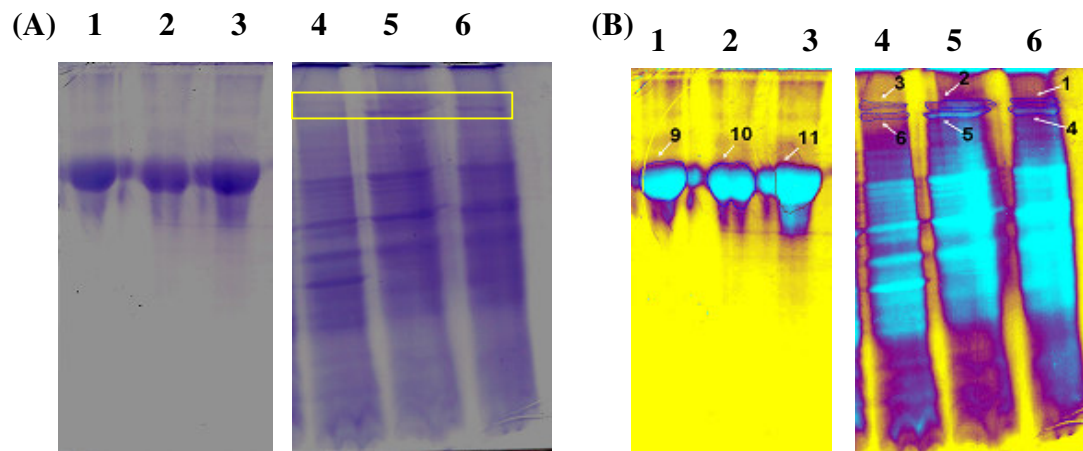


Figura 18. Análise da expressão das proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry4Ba em lagartas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes. **A**, SDS-PAGE a 12 % mostrando em 1, marcador de massa molecular; 2, proteína Cry1Ab, de 130 kDa, utilizada como marcador; 3, extrato de lagartas não infectadas; 4, extrato de lagartas infectadas com o vírus selvagem AcMNPV; 5, extrato de lagartas infectadas com vBacCry4Aa; 6, extrato de lagartas infectadas com vSynCry4Ba; 7, extrato de lagartas infectadas com vSynCry4Aa. As setas pretas indicam as proteínas Cry heterólogas. As setas brancas indicam bandas correspondentes à proteína poliedrina. **B**, **C** e **D** mostram possíveis cristais (setas) das proteínas Cry heterólogas em extratos de insetos infectados com os vírus recombinantes vBacCry4Aa (**B**), vSynCry4Aa (**C**) e vSynCry4Ba (**D**) vistos ao microscópio de luz.

5.6 – Bioensaios

Grupos de larvas de *S. frugiperda* infectadas separadamente com os vírus recombinantes vSynCry4Aa, vBacCry4Aa e vSynCry4Ba foram homogeneizadas para obtenção dos respectivos extratos como descrito anteriormente. Estas amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12% e quantificadas, através de cálculos proporcionais, com o auxílio do programa Image Phoretix 2D (Pharmacia) (Figura 19 A, B e C). Também foram purificados cristais da proteína Cry4Aa de *B. thuringiensis* da estirpe S2036 e quantificados pelo mesmo método citado acima. Foram feitos ensaios de dose tanto com os extratos de lagartas como com os cristais purificados de *Bt*, além da utilização da amostra de *Bti* da estirpe IPS-82 do Instituto Pasteur, liofilizada como controle positivo. As CL_{50} das proteínas recombinantes como também da proteína nativa purificada de *Bt* e da amostra de *Bti* são mostradas na tabela 5.

Os resultados de CL_{50} obtidos revelaram que as amostras testadas possuem atividade tóxica para larvas de segundo instar de *A. aegypti*, sendo que o *Bti* liofilizado apresentou a maior atividade, seguido em ordem decrescente, pela proteína Cry4A nativa purificada de *Bt*, extrato de vSynCry4Ba, vSynCry4Aa e vBacCry4Aa. Foi testada ainda, a atividade do vírus selvagem AcMNPV (dados não mostrados), que não apresentou atividade contra larvas de *A. aegypti*.



(C)

Concentração (µg)								
1	2	3	4	5	6	9	10	11
0.3063333	1.452	0.2913333	1.1186666	1.4856666	0.4013333	20.758	19.153333	22.617

Figura 19. Análise da expressão das proteínas heterólogas Cry4Aa e Cry4Ba em lagartas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes (A) e quantificação das proteínas recombinantes pelo programa Image Phoretix 2D (Pharmacia) (B) e (C). A e B, SDS-PAGE a 12 % mostrando nos poços 1, 2 e 3, dois µl de BSA correspondentes a aproximadamente 20 µg da proteína. Nos poços 4, 5 e 6, sete µl dos extratos de lagartas infectadas com os vírus vSynCry4Ba, vBacCry4Aa e vSynCry4Aa, respectivamente. C, valores da quantificação, em µg, das bandas indicadas em (B).

Tabela 5 – Resultado da CL_{50} das proteínas heterólogas Cry4Aa, Cry4Ba expressas em baculovírus, Cry4Aa expressa em *Bt* e *Bti* liofilizado contra larvas de segundo instar de *A. aegypti*.

Amostra	n ^a	CL ₅₀ (ng/ml)	σ
<i>Bti</i>	75	2,20 (0,93 – 3,39) ^b	0,411
Cry4Aa de <i>Bt</i>	75	33,72 (13,47 – 57,25) ^b	9,512
vSyncry4Ba	75	57,87 (28,60 – 87,30) ^b	9,810
vSynCry4Aa	75	83,31 (34,01 – 123,49) ^b	2,673
vBacCry4Aa	75	92,24 (55,64 – 123,58) ^b	15,961

^a n representa o somatório de larvas usadas em três diferentes ensaios com 25 larvas.

^b intervalo de confiança de 95%.

CL₅₀ representa a concentração letal para 50% da população

σ representa o desvio-padrão

6 – DISCUSSÃO

Neste trabalho, os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, obtidos respectivamente, a partir das estirpes S1806 e S1989 de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram inseridos individualmente no genoma dos baculovírus vSynVIgal e Bacmid (kit Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System, Invitrogen), derivados do vírus selvagem AcMNPV para obtenção de vírus recombinantes capazes de expressar as proteínas mencionadas em células de inseto.

A expressão de genes *cry* em células de inseto utilizando o sistema de expressão em baculovírus pode ser um método alternativo para o estudo de proteínas Cry individuais já que altos níveis de proteínas recombinantes podem ser obtidas (Luckow & Summers, 1988).

Alguns trabalhos mostraram que apesar das toxinas Cry terem sido expressas em altos níveis em células de insetos, pela infecção com baculovírus recombinantes, a patogenicidade dos vírus recombinantes não foi significativamente aumentada pela presença de outra proteína cristal (Merryweather *et alli*, 1990; Ribeiro & Crook, 1993).

Entretanto, Chang *et alli* (2003), construíram um baculovírus recombinante contendo o gene da proteína Cry1Ac fusionado ao gene da proteína do corpo de oclusão do baculovírus AcMNPV (poliedrina) e demonstraram que a patogenicidade do vírus recombinante, expressando a proteína de fusão Cry1Ac, foi significativamente aumentada, quando comparados ao vírus selvagem no controle de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).

Aguiar *et alli* (2006), utilizaram um baculovírus recombinante para expressar uma versão truncada da proteína Cry1Ca em células de inseto. Atividade tóxica desta proteína foi verificada quando testada em larvas de *S. frugiperda*. A formação de grandes cristais citoplasmáticos também foi constatada em células infectadas com o baculovírus recombinante para a proteína Cry1Ca.

Em seu trabalho, Pang *et alli* (1992), descrevem a construção de um AcMNPV recombinante expressando a proteína CryIVD (Cry11Aa) intacta ou truncada em células de *S. frugiperda* e em larvas de *Trichoplusia ni*. A expressão resultou na síntese das proteínas heterólogas com tamanhos e cristalizações esperados. Inclusões purificadas de células com o vírus AcCryIVD, expressando a proteína intacta, mostraram-se altamente tóxicas para larvas de mosquitos. A proteólise com tripsina das proteínas CryIVD de *Bt* e do AcMNPV recombinante produziu peptídeos com tamanhos correspondentes, demonstrando que a síntese de proteínas de *Bt* tóxicas para mosquitos ocorre em células de lepidópteros. No presente trabalho, o gene *cry4Aa* foi inserido, por recombinação homóloga, no genoma do baculovírus vSynVI-gal (Wang *et alli*, 1991), derivado do vírus selvagem AcMNPV, sob o comando de dois promotores: um sintético - Psyn e outro derivado do promotor da polierina (PXIV) e arranjados em seqüência (Wang *et alli*, 1991). O gene da poliedrina foi recuperado pelo vírus recombinante vSynCry4Aa (Figuras 17 e 18). O gene *cry4Aa* também foi inserido, sob o comando do promotor Ppolh, dentro do gene *lac Z*, por transposição sítio específica, no genoma do AcMNPV (Bacmídeo). Para tanto, foi utilizado o sistema Bac-to-Bac[®] (Invitrogen), dando origem ao vírus vBacCry4Aa. O gene *lac Z* está inserido no *locus* do gene da poliedrina no Bacmídeo e, portanto o vírus vBacCry4Aa não expressa poliedrina (Figuras 17 e 18). A justificativa para a construção dos dois vírus recombinantes vSynCry4Aa e vBacCry4Aa, usando-se duas metodologias de construção

distintas, foi a possibilidade de comparação de expressão e atividade da proteína exógena Cry4Aa pelos vírus recombinantes construídos. O gene *cry4Ba* foi inserido por recombinação homóloga no genoma do baculovírus vSynVIgal, como descrito para o gene *cry4Aa*, dando origem ao vírus recombinante vSynCry4Ba que recuperou o gene da poliedrina.

O seqüenciamento do gene *cry4Aa* utilizado neste trabalho revelou que o mesmo gene possui 98% de identidade com a seqüência do gene *cry4Aa1* depositada no Genbank (acesso n.º Y00423), Ward & Ellar (1987). As onze alterações nucleotídicas demonstradas no seqüenciamento do gene *cry4Aa* podem resultar de modificações genéticas da estirpe de *Bt* S1806, utilizada neste trabalho, como também podem ser fruto de modificações resultantes da amplificação do gene *cry4Aa* por PCR com a enzima *Taq* polimerase.

O seqüenciamento do gene *cry4Ba* utilizado neste trabalho apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene *cry4Ba1* depositada no Genbank (acesso n.º X07423), Chungjatpornchai *et alli*, 1988. Foi constatada apenas uma alteração nucleotídica que não resultou em mudança de aminoácido.

A análise por RT-PCR confirmou a transcrição dos genes recombinantes pelos vírus vSynCry4Aa, vBacCry4Aa e vSynCry4Ba, na fase muito tardia (*very late*) da infecção de células de inseto BTI-TN5B1-4. O promotor Ppolh e seu derivado PXIV, contêm a seqüência TAAG que lhes confere a habilidade de comandar a alta taxa de expressão de genes e produção de grande quantidade de mRNA na fase muito tardia da infecção (Blissard & Rohrmann, 1990; O`Reilley *et alli*, 1992) com um pico de produção a 72 h.p.i.. A RT-PCR do gene *cry4Ba* inserido em baculovírus resultou em uma banda maior que o esperado, com cerca de 1,700 pb (Figura 16 B). Uma provável explicação para tal fato reside na transcrição de mRNA a partir do gene *cry4Ba* com o sítio de terminação da ORF

603 (Figura 14 A). Foram, portanto, utilizados os oligonucleotídeos pCry4BaF5 e pCry4BaR6 (Tabela 2) para a realização de uma PCR a partir do fragmento de 1,700 obtido pela RT-PCR, produzindo um novo fragmento de aproximadamente 1,000 pb como esperado (Figura 16 C). Os cristais derivados das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba obtidos de larvas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes construídos neste trabalho, apresentaram predominantemente a forma bipiramidal, em contraste com a forma esférica descrita em outros trabalhos (Schnepf *et alli*, 1998). Além disso, os cristais obtidos e visualizados em microscopia de luz apresentaram-se muito maiores que os cristais formados de proteínas nativas de *Bt*, sugerindo que o tamanho dos cristais produzidos em *Bt* é limitado pelo tamanho da célula bacteriana (Ribeiro & Crook, 1998). Também foi demonstrado, em trabalhos anteriores, que a formação de cristais derivados de algumas proteínas Cry está intimamente relacionada com a presença de proteínas auxiliares (Ge *et alli*, 1998). A diferença morfológica apresentada pelos cristais produzidos no citoplasma de células de inseto, pode dever-se a interações das proteínas Cry com proteínas próprias das células infectadas.

Os bioensaios realizados neste trabalho revelaram que as proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de baculovírus recombinantes, expressas em larvas de *S. frugiperda* possuem atividade tóxica para larvas de *Aedes aegypti*. A CL₅₀, determinada por análise de Probits, das amostras usadas nos bioensaios com os extratos de lagartas infectadas com os vírus vSynCry4Ba (57,87 ng/mL), vSynCry4Aa (83,31 ng/mL), vBacCry4Aa (92,24 ng/mL), foi cerca de 150 vezes menor para a proteína Cry4Aa e 2 vezes menor para a proteína Cry4Ba, comparadas às CL₅₀ obtidas nos bioensaios com a proteína Cry4Aa e Cry4Ba nativas no trabalho realizado por Beltrão & Silva-Filha (2006). A maior atividade das proteínas usadas neste presente trabalho, pode ter acontecido devido ao uso de larvas de segundo instar de *A.*

aegypti em contraste com as larvas de quarto instar testadas por Beltrão & Silva-Filha (2006). Não é possível estabelecer alguma relação do aumento da atividade das proteínas Cry recombinantes com a presença de outras proteínas virais contidas nos extratos utilizados, visto que o extrato de lagartas infectadas com o vírus selvagem AcMNPV não demonstrou atividade contra larvas de *A. aegypti*. A amostra da proteína Cry4Aa expressa e purificada de *Bt* apresentou maior atividade ($CL_{50} = 33,72$ ng/mL) em relação à proteína Cry4Aa recombinante produzidas pela infecção de larvas de *S. frugiperda* com os vírus recombinantes vSynCry4Aa (83,31 ng/mL) e vBacCry4Aa (92,24 ng/mL), mas não representou diferença estatística significativa. Este resultado pode ter como possível justificativa, o fato de a proteína Cry4Aa nativa ter sido submetida ao gradiente de sacarose, conferindo um alto grau de pureza à proteína testada. Os extratos de lagartas infectadas com os vírus recombinantes para a proteína Cry4Aa contêm impurezas e outras proteínas que poderiam influenciar negativamente nos resultados dos bioensaios. A amostra liofilizada de *Bti* da estirpe IPS82 revelou a maior atividade dentre todas as amostras testadas, o que já era esperado uma vez que o *Bti* expressa quatro proteínas Cry e duas proteínas Cyt (Berry *et alli*, 2002) com atividade tóxica para larvas de mosquito que podem estar atuando sinergicamente. As CL_{50} das amostras testadas foram submetidas a um teste de análise de variância não-paramétrico pelo método de Holm-Sidak, usando o programa Sigam Stat 3.1. A análise revelou que existe diferença estatística entre todas as amostras testadas, exceto entre vBacCry4Aa e vSynCry4Aa, sendo este resultado já esperado por se tratar do mesmo gene expresso em sistemas diferentes.

A crescente demanda pelo uso inseticidas alternativos não poluentes em detrimento dos inseticidas químicos tradicionais torna o uso do *Bacillus thuringiensis* e/ou de proteínas

com atividade entomopatogênica, expressas por este organismo, bastante atraente para o controle de insetos-praga ou insetos vetores de doenças humanas.

O uso do sistema de expressão baseado em baculovírus permite que sejam estudadas proteínas Cry isoladamente ou em conjunto, o que pode ser de grande relevância para o desenvolvimento de bioinseticidas mais potentes no futuro e menos suscetíveis ao aparecimento de resistência nos insetos-alvo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O sistema de expressão baseado em baculovírus mostrou-se bastante confiável para a correta expressão dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* em células e larvas de insetos da ordem lepidóptera.
- Não houve diferença significativa aparente na expressão da proteína Cry4Aa, entre os vírus recombinantes contendo o gene *cry4Aa*, construídos a partir de duas metodologias distintas.
- O gene *cry4Aa*, amplificado da estirpe de *Bt* S-1806, apresentou 98% de identidade com a seqüência do gene *cry4Aa* descrita por Ward & Ellar (1987) e depositada no GeneBank acesso nº Y00423.
- Onze alterações nucleotídicas foram constatadas na análise da seqüência do gene *cry4Aa* descrito neste trabalho, o que determinou a mudança de oito aminoácidos da proteína Cry4Aa. Entretanto, tais alterações não podem ser creditadas, com confiança, a mudanças genéticas da estirpe utilizada, ou a alterações geradas pela amplificação do gene, por PCR, com a enzima *Taq* polimerase, já que esta não possui alta capacidade de *proof reading*.
- O gene *cry4Ba*, amplificado da estirpe de *Bt* S1989, apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene *cry4Ba1* descrita por Chungjatpornchai *et alli*, 1988 e depositada no GeneBank acesso nº X00423. Houve apenas uma alteração nucleotídica na seqüência do gene *cry4Ba* utilizado neste trabalho, não resultando em mudanças de aminoácidos.

- O ambiente celular eucariótico pode, de algum modo, influenciar na forma e tamanho dos possíveis cristais das proteínas recombinantes Cry4Aa e Cry4Ba, que, quando visualizados em microscopia de luz, apresentaram, predominantemente, a forma bipiramidal, em contraste com a forma esférica descrita em outros trabalhos.
- As proteínas recombinantes Cry4Aa e Cry4Ba, apresentaram atividade tóxica para larvas de segundo instar de *Aedes aegypti*, confirmando a confiabilidade do sistema de expressão utilizado.
- O sistema de expressão baseado em baculovírus pode ser usado para o estudo de proteínas Cry, de forma individual, ou em conjunto, colaborando para um melhor entendimento de possíveis interações sinérgicas entre essas proteínas, o que futuramente, pode resultar em bioinseticidas mais potentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, L. F.; BROWN, K. L.; WHITELEY, H. R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **J. Bacteriol.**, v.173, p.3846-3854, 1991.

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

AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, E. S.; VALICENTE, F. H.; CARNEIRO, F. P.; BATISTA, A. C.; MELATTI, V. M.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. A recombinant truncated Cry1Ac is toxic to lepidopteran and forms large cuboidal crystals in insect cells. **Curr. Microbiol.**, v.53, p.287-293, 2006.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; UAWITHIA, P.; LEETACHEWA, S.; PORNWIROON, W.; OUNJAI, P.; KERDCHAROEN, T.; KATZENMEIER G.; PANYIM, S. *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model an implication for toxin activity. **J. Biochem. and Mol. Biol.**, v.37, p.204-213, 2004.

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

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, v.50, p.1-24, 1986.

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

BARRETT, J. W.; BROWNRIGHT, A.J.; PRIMAVERA, M. J.; RETNAKARAN, A., AND PALLI, S. R. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Tiss. Cell**, v.30, n.6, p.602-616, 1998.

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

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvar midgut. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.266, p.163-169, 2006.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOVE, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T.; HARRIS, D.; ZARITISKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.5082-5095, 2002.

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Ann. Rev. Entomopathol.**, v.35, p.127-155, 1990.

BOOSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **J. Mol. Biol.**, v.348, p.363-382, 2005.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C. H.; LESCAR, J.; Structural of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8 Å resolution. **J. Bacteriol.**, v.188, p. 3391-3401, 2006.

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/Technol.**, v.12, p.915-918, 1994.

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

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

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

CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30:279-285, 1997.

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. and Molec. Biol. Rev.**, v.62, p.807-813, 1998.

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

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

DENOLF, P.; HENDRICKX, K.; VAN DAMME, J.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, 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. **Eur. J. Biochem.**, v.248, p.748-761, 1997.

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

DU, C.; NICKERSON, K. W. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.2932-2939, 1996.

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

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

ENGELHARD, E. D.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN – VOLKMAN, L. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa Californica* nuclear polydrosis virus. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.91, p.3224-3227, 1994.

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

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

FAUST, R. M.; BULLA, A. L. JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: *Kurstaki*, E., ed. **Microbiol. and Viral Pest.** New York: Marcel Dekker, p.75-206, 1982.

FEDERICI, B. A.; PARK, H. -W.; BIDESHI, B. K.; WIRTH, M. C.; JOHNSON, J. J. Recombinant bacteria for mosquito control. **J. Exp. Biol.**, v.206, p.3877-3885, 2003.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J AND KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technol.**, v.10, p.271-275, 1992.

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

FRANCO, O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 1976.

FINNEY, D.J. **Probit anal.**. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1971.

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

GAZIT, E.; LA ROCCA, P.; SANSOM, M. S. P. And SHAI, Y. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.12289-12294, 1998.

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 Microbiol. Lett.**, v.165, p.35-41, 1998.

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

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

GONZÁLES, J. M. JR.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal protein production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**, v.11, p.28-38, 1984.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K.A. *In vivo* infection and replication of baculovirus In: **The biol. of Baculov.** Granados, R. R., Federici, B. A., eds. CRC press, Boca Raton, Florida, p.89-108, 1986.

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

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

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Control. Microb. de Inset.** Ed. Alves, S. B., FEALQ, Piracicaba, p.383-446, 1998.

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

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

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

KALMAKOFF, J.; WARD, V. K.;. 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 recombinante virus expression vector. **Nucleic Acid Res.**, v.18, p.5667-5672, 1990.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. in insect Physiol.**, 24: 275-308, 1994.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. **Biochem. Biophys. Acta.** V.924, p.509-518, 1987.

KRIEG, A. Is the potencial pathology of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **J. Invert. Pathol.**, v.18, p.425-426, 1971.

KRYWUNCZYK, J.; FAST P.G. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **J. Invert. Pathol.**, 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.; PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.2536-2542, 1992.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET. M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: **Regul. of prokaryotic develop.**, eds. Issar Smith, R., Slepecky, A., Setlow, P., Washington: American Society for Microbiology, p.71-88, 1989.

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

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ***Bacillus thuringiensis, An Environmental biopesticide: Theory and practice***. Enwistle P. F., Cory J. S., Bailey M. J. and Higgs S. Eds., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, p.37-69, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

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

MARQUES, A. C. Sobre a viabilidade atual de erradicação do *Aedes aegypti* no controle da febre amarela no Brasil. **Rev. Brasil. de Malariol. e Doenças Tropicais**, v.37, p.37-46, 1985.

MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. A Catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks. 4.ed. Portland, OR: **USDA-Forest Service**, (USDA. PNW-195), 51p., 1986.

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

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

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

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

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I. S., Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v.3, p.163-200, 2000.

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

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

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

NEVES, V. L. F. C.; PINHO, L. A. C. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Município de São Paulo - SP, 1991 a 1995. **Rev. da Socied. Brasil. de Medic. Tropical**, 29(Sup.):55, 1996.

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

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculov. Expr. Vectors: A Laboratory Manual**, Freeman, New York, 1992.

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

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

PENNOCK, G. D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Mol. Cell. Biol.**, 4: 399-406, 1984.

PÉRES, V. J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A., CERON, J. (Eds) **Bacillus thuringiensis en el control biológico**. Colombia, Bogotá, p.207-232, 2004.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, v.7, n.2, p.1-10, 2003.

PONCET, S.; DELECLUSE, A.; KILLER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of the synergistic interaction among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **J. Invert. Pathol.**, 66:131-135, 1995.

PUNTHERANURAK, T.; UAWITHYA, P.; POTVIN, L.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; SCHWARTZ, J.; -L. Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its α 1- α 5 fragment. **Mol. Membr. Biol.**, v.21, p.67-74, 2004.

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

REBELO, José Manuel Macário *et al.* Distribution of *Aedes aegypti* and dengue in the State of Maranhão, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, July/Sept. 1999, v.15, n.3, p.477-486. ISSN 0102-311X.

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

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

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 gemmantalis nucleopolyhedrovirus*. **Virus genes**, v.22, p.103-113. 2001.

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Mol. cloning: a laboratory manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

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

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

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

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

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

TAPANEEYAKORN, S.; PORNWIROON, W.; KATZENMEIER G.; ANGSUTHANASOMBAT, C. Structural requirements of the unique disulphide bond and the proline-rich motif within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop for larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Biochem. Biophys. Research Comunic.**, v.330, p.519-525, 2005.

VADLAMUDI, R. K.; WEBER E.; JI, T. H.; BULLA, L. A. JR. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.5490-5494, 1995.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA M. T.; SIHLER W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: **Controle biológico**, eds. Melo I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, SP, Embrapa, p.102-225, 1998.

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 taxon. classif. nomenc. of virus**, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San diego, 2000.

VLAK, J. M.; KLINKENBERG, F. A.; ZAAL, K. J. M.; USMANY, M.; KLINGERODE, E. C.; GEERVLIT, J. B. F.; ROOSIEN, J.; VAN LENT, J. W. M. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene. **J. Gen. Virol.**, v.69, p.725-776, 1998.

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

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.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Assignment of the δ -toxin gene in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS, Lett.**, v.158, p.45-49, 1983.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130kDa delta-endotoxin. **Nucleic Acids Res.** v.15, n.17, 7195p., 1987.

WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. **J. Bacteriol.**, v.170, p.727-735, 1988.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg, A., Huger, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlen Heft**, Berlim, Paul Parey, 37-50, 1986.

WEYER, U.; KNIGHT, S.; POSSEE, R. D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.1525-1534, 1990.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.40, p.549-576, 1986.

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

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

WU, S. J., KOLLER, C. N., MILLER, D. L., BAUER, L. S., DEAN, D. H. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor bindin loop. **FEBS Lett.**, v.473, p.227-232, 2000.

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

cry4

pol

cry4

pol
pol