

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Vip3A E Cry1Ia10 DE *Bacillus
thuringiensis* COM ATIVIDADE INSETICIDA A
LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

**Suzana Cristina Marucci
Bióloga**

2015

**T
E
S
E**

/

**M
A
R
U
C
C
I**

**S.
C.**

2

0

1

5

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Vip3A E Cry1Ia10 DE *Bacillus thuringiensis* COM ATIVIDADE INSETICIDA A
LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

Suzana Cristina Marucci

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2015

Marucci, Suzana Cristina
M389i Interação de proteínas Vip3A e Cry1Ia10 de *Bacillus thuringiensis*
com atividade inseticida a lepidópteros-praga / Suzana Cristina
Marucci. -- Jaboticabal, 2015
iv, 68 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Janete Aparecida Desidério

Banca examinadora: Odair Aparecido Fernandes, Agda Paula
Facincani, Paula Cristina Brunini Crialesi Legori, Juliana Regina Rossi
Bibliografia

1. *Anticarsia gemmatalis*. 2. BBMV ("Brush Border Membrane
Vesicles"). 3. *Heliothis virescens*. 4. *Spodoptera frugiperda*. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação - Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SUZANA CRISTINA MARUCCI – nascida em 16 de agosto de 1983, na cidade de Jaboticabal – SP, é Bióloga, graduada no curso de Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado com ênfase em Ciências Ambientais) pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), Araraquara – SP, título este concedido em Janeiro de 2007. Realizou estágio no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal de 2006 a 2008, auxiliando no desenvolvimento de projetos de manejo de pragas com o uso de genes *cry* e *vip3A* da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, desenvolvendo a dissertação intitulada “Seleção e caracterização de novos genes *vip3A*: genes inseticidas de segunda geração de *Bacillus thuringiensis*” como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da tese como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo.
Quem acredita sempre alcança.”

Aos meus pais, Aparecida e Carlos, por todo amor, carinho e incentivo, imprescindíveis para minha formação. Com amor dedico este trabalho a eles.

Ao meu irmão Tiago por todo amor, carinho e alegria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela orientação e importante dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. A ela dedico meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela atenção e ajuda na realização deste trabalho.

À Eliane Cristina da Cunha Alves, por toda dedicação e ajuda nos experimentos realizados.

Aos Doutores Jackson Antônio Marcondes de Souza, Manoel Victor Franco Lemos, Ricardo Antônio Polanczyk, Sônia Marli Zingaretti, Agda Paula Facincani, Juliana Regina Rossi, Odair Aparecido Fernandes e Paula Cristina Brunini Crialesi Legori pela participação nas bancas examinadoras e valiosas sugestões científicas que muito contribuíram para esta tese.

A todos os colegas que fazem parte do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pelo convívio no dia-a-dia.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) e aos docentes desta instituição, pelas disciplinas ministradas, pelo conhecimento intelectual adquirido e pela oportunidade de realizar este trabalho.

A toda minha família e amigos queridos pelo incentivo e carinho durante a realização deste trabalho.

Em especial a Deus, por me dar o dom da vida e a possibilidade de vencer mais esta etapa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Heliothis virescens</i> ..	3
2.2. <i>B. thuringiensis</i> e as proteínas Cry e Vip.....	4
2.3. Resistência dos insetos às toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	9
2.4. Interação das proteínas Cry1 e Vip3A com os receptores presentes nas BBMV's ("Brush Border Membrane Vesicles") de lepidópteros-praga....	11
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Amplificação por PCR dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i>	16
4.2. Clonagem dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i> no vetor pET SUMO.....	18
4.2.1. Confirmação dos clones contendo os genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i> por PCR.....	20
4.3. Indução da expressão dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i> e obtenção dos lisados protéicos.....	21
4.3.1. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	22
4.4. Detecção das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 por "Western blotting"	23
4.5. Quantificação das proteínas por densitometria.....	24
4.6. Bioensaios com os lisados protéicos.....	25
4.7. Purificação das proteínas Vip3Aa e Cry1la10.....	27
4.8. Ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1la10 com tripsina pancreática bovina e suco intestinal de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i>	28
4.9. Marcação das proteínas ativadas com biotina.....	29
4.10. Retirada do intestino de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i> e preparação das BBMV's.....	30
4.11. Ensaios de ligação das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 à BBMV's de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i>	32
4.12. Ensaios de competição homóloga das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 as BBMV's de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i>	33
4.13. Ensaios de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 as BBMV's de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Amplificação por PCR dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i>	35
5.2. Clonagem dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i> no vetor pET SUMO e confirmação dos clones por PCR.....	35
5.3. Indução da expressão dos genes <i>vip3Aa</i> e <i>cry1la10</i> e obtenção dos lisados protéicos.....	37
5.4. Detecção das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 por "Western blotting"....	39
5.5. Bioensaios com os lisados protéicos	40
5.6. Purificação e ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1la10 com	

tripsina pancreática bovina e suco intestinal de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i>	44
5.7. Marcação das proteínas ativadas com biotina.....	47
5.8. Retirada do intestino de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i> e preparação das BBMV's.....	48
5.9. Ensaios de ligação e competição homóloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 às BBMV's de <i>S. frugiperda</i> , <i>A. gemmatalis</i> e <i>H. virescens</i>	49
5.10. Ensaios de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 as BBMV's de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i>	52
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Vip3A E Cry1Ia10 DE *Bacillus thuringiensis* COM ATIVIDADE INSETICIDA A LEPIDÓPTEROS-PRAGA

RESUMO – As proteínas Vip3Aa e Cry1Ia apresentam potencial no controle de lepidópteros-praga e surgem como alternativa promissora no manejo da resistência de pragas as proteínas Cry1A, que tem sido altamente utilizada na formulação de bioinseticidas comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e em plantas transgênicas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 em *Escherichia coli*, a fim de se analisar a correlação entre a união aos receptores por meio de análises de competição entre as diferentes toxinas Vip3Aa e a toxina Cry1Ia10, e a toxicidade a lepidópteros-praga, inferindo-se quais as combinações que poderiam ser utilizadas na produção de plantas transgênicas, contendo múltiplos genes, as quais vêm sendo empregadas para contornar a evolução da resistência dos insetos às toxinas Bt. Para tanto, os genes *vip3Aa* e *cry1Ia10* foram clonados no vetor pET SUMO, expressos em *E. coli* e a toxicidade das proteínas foram testadas em bioensaios com lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Heliothis virescens*. As BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles”) foram preparadas a partir dos intestinos das três espécies e ensaios de competição homóloga e heteróloga foram realizados. As proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 apresentaram toxicidade para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. Já a proteína Cry1Ia10 apresentou toxicidade apenas para *A. gemmatalis* e, as proteínas não se mostraram tóxicas para *H. virescens*. Os ensaios de ligação às BBMVs demonstraram que as proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 se unem aos receptores presentes no intestino médio de forma efetiva nas três espécies e que, portanto, houve correlação entre a toxicidade e a união aos receptores para as populações de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, porém para *H. virescens* não houve relação entre a toxicidade e a união aos receptores. Sendo assim, combinação das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa42 ou Vip3Aa43 é indicada para a produção de bioinseticidas, assim como para a produção de plantas piramidadas, visando contornar o surgimento de resistência de populações de *A. gemmatalis* às toxinas Bt.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*, BBMV (“Brush Border Membrane Vesicles”) *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*

INTERACTION OF Vip3A AND Cry1Ia10 PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* WITH INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST LEPIDOPTERAN PESTS

ABSTRACT - Vip3Aa and Cry1Ia proteins have potential in control of Lepidopteran pest and emerge as a promising alternative in the pest resistance management the Cry1A proteins, which has been highly used in the formulation of commercial insecticides based on *Bacillus thuringiensis* (Bt) and in transgenic plants. Therefore, this study aimed to cloning and expression of Vip3Aa42, Vip3Aa43 and Cry1Ia10 proteins in *Escherichia coli*, in order to analyze the correlation between the binding to receptors through competition assays between the different Vip3Aa toxins and toxin Cry1Ia10, and toxicity to lepidopteran pests inferring up which combinations that could be used to produce transgenic plants containing multiple genes, which have been used to circumvent the development of insects resistance to Bt toxins. Therefore, *vip3Aa* and *cry1Ia10* genes were cloned into the pET SUMO vector, expressed in *E. coli* and toxicity of proteins were tested in bioassays with neonate larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* and *Heliothis virescens*. The BBMVs (Brush Border Membrane Vesicles) were prepared from the gut of the three species, and homologous and heterologous competition assays were performed. The Vip3Aa42 and Vip3Aa43 proteins were toxic to *S. frugiperda* and *A. gemmatalis*. Already Cry1Ia10 protein showed toxicity only for *A. gemmatalis* and proteins were not toxic to *H. virescens*. Binding assays to BBMVs demonstrated that Vip3Aa42, Vip3Aa43 and Cry1Ia10 proteins binding effectively to receptors present in the midgut in three species and, therefore, was correlation between toxicity and the binding to receptors for the populations of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis*, but for *H. virescens* there was no relationship between toxicity and the binding to receptors. Thus, the combination of Cry1Ia10 and Vip3Aa42 or Vip3Aa43 proteins is indicated for the production of biological insecticidal, as well as for the production of transgenic plants to circumvent the emergence of resistance of *A. gemmatalis* population to Bt toxins.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*, BBMV (Brush Border Membrane Vesicles), *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a agricultura mundial é o ataque de pragas que, quando não controladas, podem reduzir drasticamente a produção. Entre os principais insetos-praga destacam-se as lagartas *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae) e *Heliothis virescens* (Fabrícus, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), importantes pragas da cultura do milho, soja e algodão, respectivamente.

Na tentativa de defender as plantações de pragas e doenças, e garantir índices de produtividade que proporcionem retornos econômicos, os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados, no entanto, seu uso abusivo tem causado grandes danos, levando à emergência de populações resistentes e à eliminação de inimigos naturais, além de contribuir para a contaminação do ambiente e prejuízo à saúde de agricultores e população em geral (RÜEGG et al., 1991).

Como alternativa aos agrotóxicos tem se destacado o uso do controle biológico de insetos. O controle biológico pode ser definido como um fenômeno natural que consiste na regulação populacional de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica do ecossistema (PARRA et al., 2002), sendo uma alternativa viável e extremamente racional, especialmente em países em desenvolvimento, carentes de recursos financeiros e possuidores de vastas áreas agricultáveis, como é o caso do Brasil, além de ser uma estratégia muito utilizada em sistemas agroecológicos, assim como na agricultura convencional que se vale do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (MELO; AZEVEDO, 2000).

O controle biológico de pragas reduz os riscos ambientais e de saúde, provenientes do uso de produtos químicos, podendo ser utilizados em plantações para que os níveis populacionais de pragas não atinjam níveis danosos. O uso de bioinseticidas proporciona alta especificidade, ou seja, somente causa danos a praga alvo, não afetando outros insetos, plantas ou até mesmo animais.

Entre os micro-organismos utilizados no controle biológico de insetos-praga, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner, 1915) (Bacillales: Bacillaceae) é considerada a espécie de maior interesse sendo caracterizada pela produção de

proteínas com atividade inseticida que exibem especificidade contra larvas de insetos de várias ordens, incluindo dípteros vetores de doenças humanas (DE MAAGD et al., 2003). Entre as proteínas produzidas por *B. thuringiensis*, destacam-se as Cry1 e Vip3A, que apresentam especificidade a insetos da ordem Lepidoptera (SENA et al., 2009; GUO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; CRIALESI-LEGORI et al., 2014).

O mecanismo de ação desta bactéria baseia-se na solubilização das proteínas inseticidas no meio alcalino do intestino dos insetos. As protoxinas são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação de enzimas digestivas dos insetos suscetíveis e, posteriormente, se ligam a receptores específicos na borda da membrana epitelial, induzindo lesões que destroem as células e matam o inseto.

As proteínas Cry1 e Vip3A não possuem similaridade em suas sequências de aminoácidos podendo se ligar a distintos receptores na membrana epitelial do intestino médio dos insetos-praga (SENA et al., 2009; GOUFFON et al., 2011), fato este, que as tornam excelentes candidatas a serem utilizadas na produção de plantas transgênicas piramidadas que expressam duas ou mais toxinas inseticidas para uma mesma praga, e que estão sendo desenvolvidas na tentativa de evitar a evolução da resistência destes insetos.

No entanto, para o sucesso desta tecnologia é necessário entender os mecanismos de ação destas toxinas. Neste sentido, estudos envolvendo diferentes proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* e suas interações com os receptores de membrana do epitélio intestinal de insetos alvo tornam-se de grande importância, visto que, buscam avaliar estratégias que venham a adiar a evolução da resistência por estas pragas às referidas proteínas.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 em *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), a fim de se analisar a correlação entre a união aos receptores por meio de análises de competição homóloga e heteróloga entre as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10, e a toxicidade a *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, inferindo-se quais as combinações que poderiam ser utilizadas na produção de plantas transgênicas, contendo múltiplos genes de Bt.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Heliothis virescens*

A agricultura brasileira é considerada mundialmente como uma das mais eficientes na produção de alimentos e também o principal setor da economia nacional. No entanto, o ataque de insetos-praga é um dos principais entraves para a produtividade, pois exige numerosas aplicações de inseticidas, o que aumenta os custos da produção, prejudica o meio ambiente e a saúde humana.

Entre as principais pragas agrícolas destacam-se *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, importantes pragas da cultura do milho, soja e algodão, respectivamente.

S. frugiperda é uma praga polífaga que ataca diversas espécies vegetais de diferentes famílias botânicas sendo considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil (LIMA JR, 2012). Estas lagartas podem ser observadas desde a emergência da plântula pelo ataque às folhas, até próximo à maturação fisiológica pelo ataque aos grãos em formação (FIGUEIREDO et al., 2006).

Por não apresentar diapausa, *S. frugiperda* possui ocorrência sazonal nas áreas de clima temperado e, sob temperaturas mais elevadas, pode ocorrer até 13 gerações por ano na cultura do milho (AFONSO et al., 2009). Historicamente, a principal medida de manejo de *S. frugiperda* no Brasil tem sido o controle químico (COSTA et al., 2005). Contudo, o comportamento larval de *S. frugiperda*, que se alimenta e se protege no cartucho das plantas de milho, limita significativamente a eficiência desse método de controle (WAQUIL, 2007).

A. gemmatalis é uma das principais desfolhadoras da soja no Brasil, sendo considerada um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). O inseto em seu estágio larval alimenta-se das folhas jovens provocando grandes danos à lavoura de soja, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta (PRAÇA et al., 2006).

Para o controle desta praga utilizam-se, predominantemente, inseticidas químicos, com até três aplicações por safra, ocasionando enormes prejuízos ambientais e elevados custos aos produtores (PRAÇA et al., 2006).

H. virescens é considerada a mais severa praga do algodoeiro, uma vez que provoca danos irreversíveis, alimentando-se de grande quantidade de estruturas reprodutivas da planta hospedeira, propiciando, ainda, a penetração de micro-organismos, os quais incrementam as perdas (GOULD, 1995).

As lagartas atacam o botão floral e maçãs pequenas, vindo em seguida, as maçãs médias e grandes, reduzindo a produtividade da cultura (ALMEIDA et al., 2008). Uma das principais medidas de controle de *H. virescens* é o emprego de inseticidas químicos (GIOLO et al., 2006), os quais nem sempre são eficientes, além de reduzirem a população de inimigos naturais e causarem danos à saúde humana.

2.2. *B. thuringiensis* e as proteínas Cry e Vip

A bactéria *B. thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica, Gram-positiva, aeróbia ou facultativamente anaeróbia, quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de cultivo é de 30°C. Possui forma de bastonete e quando em condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolve um ciclo de esporulação típico dos bacilos. Essa bactéria é encontrada naturalmente no solo além de outros substratos como superfícies de plantas, produtos armazenados e insetos (BRAVO et al., 1998; AZEVEDO et al., 2000).

No início de sua esporulação são sintetizadas grandes quantidades de proteínas que possuem atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pela qual elas são denominadas Cry (YAMAMOTO; DEAN, 2000). Esta inclusão protéica é o fator que caracteriza a espécie de *B. thuringiensis* e confere a muitas linhagens o potencial entomopatogênico.

Além das proteínas Cry, a bactéria *B. thuringiensis* sintetiza, durante a sua fase de crescimento vegetativo, as proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), que têm demonstrado especificidade a insetos da ordem Lepidoptera (ESTRUCH et al., 1996) e as proteínas Cyt, que possuem atividade citolítica *in vitro* e especificidade *in vivo* aos dípteros (DE MAAGD et al., 2003), podendo seu modo de ação também estar relacionado a um sinergismo com outras toxinas produzidas pelos isolados.

O entomopatógeno também produz outros fatores de virulência, como as β -exotoxinas, α -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HÖFTE; WHITELEY, 1989; DE MAAGD et al., 2001). Esses autores declaram desconhecida a exata contribuição de cada fator na virulência da bactéria, sendo uma dificuldade determinar o espectro tóxico de um isolado que sintetiza mais de uma proteína. Isso porque, quando os fragmentos tóxicos vão se ligar aos receptores da membrana do intestino médio do inseto, ocorre uma competição pelos sítios de ligação, que pode interferir na toxicidade do isolado.

Guttman e Ellar (2000) identificaram isolados de *B. thuringiensis* com a presença de hemolisinas, quitinases, lecitinases e presença do gene que codifica a enterotoxina, uma toxina produzida por diferentes cepas de *B. thuringiensis*, com peso molecular em torno de 45 kDa, e que pode ser tóxica a vertebrados, uma vez que é análoga à toxina produzida por *Bacillus cereus* (Frankland & Frankland, 1887) (Bacillales: Bacillaceae).

No entanto, entre as proteínas produzidas pela bactéria *B. thuringiensis*, Cry1 e Vip3A são as mais estudadas, visto que possuem atividade inseticida a lepidópteros-praga de diversas culturas de importância econômica (SENA et al., 2009; CHAKROUN; FERRÉ, 2014; CRIALESI-LEGORI et al., 2014)

As proteínas Cry1 apresentam peso molecular entre 130 e 140 kDa e são armazenadas em cristais bipiramidais, estes genes são os mais frequentes na natureza, representando mais de 43% dos genes *cry* caracterizados (HÖFTE; WHITELEY, 1989).

Em relação ao seu modo de ação, pesquisadores em todo o mundo tentam desvendar o mecanismo complexo no qual as proteínas Bt matam os insetos, no entanto, alguns aspectos continuam não esclarecidos. De modo geral é aceito que as proteínas cristal (Cry) são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação de enzimas digestivas dos insetos suscetíveis e, posteriormente, se ligam a receptores específicos na borda da membrana epitelial, induzindo lesões que destroem as células e matam o inseto (DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2005).

Em lepidópteros são propostos dois modelos de ação das proteínas Cry. De acordo com o modelo de formação de poros (SOBERÓN et al., 2009), as proteínas Cry que são produzidas como inclusões cristalinas de 70 a 140 kDa, após a ingestão

pelos insetos, são solubilizadas no lúmen do intestino devido ao alto pH. Após a solubilização as protoxinas são clivadas pelas proteases do intestino médio nas porções N e C-terminal tornando-se uma toxina ativa de 60 kDa com a estrutura de três domínios. O domínio I, N-terminal, consiste em sete alfa-hélices e participa da inserção na membrana intestinal e formação do poro. O domínio II, ou beta-prisma, apresenta três folhas dobradas simétricas, formando as beta-folhas. O domínio III C-terminal consiste em duas beta-folhas antiparalelas. Estes dois domínios estão envolvidos no reconhecimento dos receptores e ligação, além do domínio III também ter sido associado à formação de poros (DE MAAGD et al., 2001).

As toxinas ativas se ligam aos receptores que estão presentes nas células do intestino médio das larvas. No caso das proteínas Cry1A a caderina (CAD) funciona como receptor primário (GÓMEZ et al., 2002; XIE et al., 2005), a ligação com a caderina facilita a clivagem por proteases da região N-terminal da toxina eliminando a hélice α -1 do domínio I.

Essa clivagem induz a montagem da forma oligomérica da toxina. Os oligômeros possuem afinidade por receptores secundários como aminopeptidases-N (APN) e fosfatase alcalina (ALP), que estão ancorados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BRAVO et al., 2004). Depois dos oligômeros se ligarem aos receptores secundários, eles criam poros na membrana apical das células do intestino médio, causando choque osmótico, rompendo as células do intestino médio e, finalmente terminando com a morte do inseto (ZHANG et al., 2006; BRAVO et al., 2004).

No modelo de transdução de sinais a toxicidade das proteínas Cry é devido à ativação de uma cascata de sinais dependentes de Mg^{2+} que é ativada pela interação da toxina com o receptor primário caderina. Essa interação ativa a proteína G a qual torna ativa uma adenilil ciclase promovendo a produção de AMP cíclico intracelular. O aumento nos níveis de AMP cíclico ativa uma proteína quinase A, a qual ativa uma via intracelular resultando na morte do inseto (ZHANG et al., 2006).

Neste modelo a morte das células do inseto ocorre sem a participação da estrutura oligomérica da proteína que forma poros ou a participação de outros receptores como as proteínas ancoradas a GPI (ZHANG et al., 2006; BRAVO et al., 2004).

Entre as proteínas Cry, a proteína Cry1Ia10 (gb: [AY262167.1]) merece destaque uma vez que esta foi isolada e teve sua sequência de nucleotídeos obtida por Espindola (2003). Em estudos desenvolvidos por Bergamasco et al. (2011), a toxicidade desta proteína foi avaliada e demonstrou ser dotada de especificidade tanto para insetos da ordem Lepidoptera quanto Coleoptera o que a coloca como uma promissora proteína para o controle de pragas.

Os genes *cry1I* codificam proteínas em torno de 70 a 81 kDa que não são acumuladas em cristal (CHOI et al., 2000; SONG et al., 2003), sendo classificadas como proteínas Cry1I devido à similaridade com o grupo Cry1 (CRICKMORE et al., 1998). Estas proteínas possuem uma ampla gama de hospedeiro, incluindo espécies importantes de lepidópteros e coleópteros (TAILOR et al., 1992). Por não se acumularem em cristais estas proteínas não são incluídas como ingrediente ativo em inseticidas a base de Bt. No entanto, sua eficácia na proteção de plantas contra o ataque de pragas tem sido demonstrada (LAGNAOUI et al., 2001; LIU et al., 2004).

Desta forma, as proteínas Cry1I têm se tornado excelentes candidatas para o controle de pragas de interesse econômico, e uma alternativa ao manejo da resistência das pragas às proteínas Cry1A, que têm sido extensivamente utilizadas como inseticida biológico e em plantas transgênicas, uma vez que estudos apontam que a proteínas Cry1I não compartilham os mesmo receptores das proteínas Cry1A, no intestino médio dos insetos-praga (ESCUADERO et al., 2006).

As proteínas Vip pertencem a uma classe de proteínas produzidas por algumas linhagens de *B. thuringiensis*, durante o estágio vegetativo de seu crescimento, sendo secretada no meio de cultura como proteína solúvel (ESTRUCH et al., 1996).

De acordo com Estruch et al. (1996) o gene *vip3A* codificador da proteína Vip3A inicia sua expressão durante a fase de crescimento vegetativo e continua ativamente expresso em culturas esporulantes. Altos níveis de expressão em combinação com alta estabilidade da proteína favorecem a produção de grandes somas de proteína nos sobrenadantes de culturas esporulantes.

As proteínas Vip não têm homologia de sequência ou estrutura com as proteínas Cry (RANG et al., 2005), e são classificadas em quatro classes diferentes (CRICKMORE et al., 2014). As classes Vip1 e Vip2 formam uma proteína binária

com atividade inseticida contra larvas de coleópteros (WARREN, 1997; LEUBER et al., 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009). A proteína Vip3 possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos-praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera e revela alta bioatividade para: *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda*, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *H. virescens*, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera Noctuidae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (ESTRUCH et al., 1996; DOSS et al., 2002; LIU et al., 2007). Quanto à proteína Vip4, até o momento, não existem trabalhos relatando sua especificidade.

Sobre o modo de ação das proteínas Vip3 pouco se sabe, mas é descrito que elas atuam por meio de formação de poros nas células epiteliais do intestino médio. As proteínas Vip são ingeridas como protoxinas, com massa molecular de 88,5 kDa, e são processadas pelas proteases do intestino do inseto, tornando-se proteínas ativas com aproximadamente 62 kDa, estas se ligam a receptores específicos e causam a lise das células do intestino do inseto (LEE et al., 2003).

Em estudos realizados por Schnepf et al. (1998), verificou-se que a extensão C-terminal, encontrada nas proteínas Cry mais longas, não faz parte da toxina ativa, pois é digerida pelas proteases no intestino dos insetos, mas pode ter ação na formação do cristal.

Por outro lado, estudos realizados por Selvapandiyan et al. (2001) demonstraram diferenças no modo de ação da proteína Vip3Aa9 contra diferentes pragas, quando realizadas deleções nas regiões N-terminal e C-terminal da proteína. Para determinar a atividade do fragmento tóxico, estas deleções foram construídas, expressas em *E. coli* e avaliadas em ensaios com larvas de *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae). Verificou-se que a deleção de 39 aminoácidos da região N-terminal não alterou a toxicidade contra larvas de *C. partellus*, por outro lado, foi observada uma redução da atividade tóxica contra larvas de *S. litura*. Já a deleção de até 154 aminoácidos na região C-terminal, causou uma leve redução na mortalidade de larvas de *C. partellus* e aboliu totalmente a atividade tóxica contra *S. litura*.

Estes resultados sugerem que a toxicidade contra duas diferentes pragas é mediada possivelmente por diferentes mecanismos, porém devido à ausência de

informações sobre os receptores das toxinas Vip, não é possível especular sobre os fatores responsáveis pela diferença de toxicidade observada com a deleção da região C-terminal da proteína (SELVAPANDIYAN et al., 2001).

Entre as proteínas Vip3A, as proteínas Vip3Aa42 (gb: [HQ587048]) e Vip3Aa43 (gb: [HQ594534]) merecem destaque, uma vez que foram isoladas e tiveram suas sequências de nucleotídeos obtidas por Marucci (2010).

Foi realizado o alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43, demonstrando similaridade de 99% entre elas, com onze substituições de aminoácidos, embora estas proteínas apresentem alta similaridade, análises da toxicidade destas para as lagartas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* são necessárias, visto que, alterações mínimas nas sequências de aminoácidos podem alterar a toxicidade e especificidade da proteína (LIU et al., 2007; SHEN et al., 2009).

Sendo assim, a expressão destas proteínas em sistemas heterólogos e estudos envolvendo a toxicidade e o modo de ação destas proteínas, sobre diferentes espécies de lepidópteros-praga tornam-se de extrema importância, uma vez que poderão ser utilizadas na produção de eventos piramidados, para postergar a resistência de populações de insetos a cultivos de *B. thuringiensis*, contribuindo para o manejo da resistência.

2.3. Resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis*

O desenvolvimento de resistência caracteriza-se pela redução da suscetibilidade de uma população de insetos a uma toxina (TABASHNIK, 1994). Uma grande quantidade de fatores fisiológicos pode proporcionar o surgimento de resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis*. Estes fatores incluem dificuldades na solubilização das proteínas no intestino do inseto, defeito na clivagem proteolítica das toxinas, degradação das toxinas por proteases intestinais, dificuldade na ligação das toxinas aos receptores intestinais, defeito na formação do poro e reparação do tecido epitelial (FERRÉ et al., 1991; GRIFITTS; AROIAN, 2005; GUNNING et al., 2005).

A ativação das proteínas Cry e Vip por proteases é um passo fundamental no modo de ação dessas toxinas. Em trabalhos realizados por Forcada et al. (1996) e Forcada et al. (1999) com populações resistentes de *H. virescens* os autores demonstraram haver resistência moderada dessa lagarta às proteínas Cry1Ab e Cry2Aa. Os resultados apresentaram um perfil protéico para a população resistente e outro para a população suscetível quando as proteínas foram ativadas com proteases intestinais.

Casos de evolução da resistência de insetos a proteínas Bt restringiam-se a inseticidas biológicos de Bt aplicados em pulverização ou devido à seleção de linhagens resistentes em condições de laboratório (VAN RIE; FERRÉ, 2000; NEPPL, 2001). No entanto, a partir de 2007 casos de evolução de resistência a campo, de pragas alvo de plantas Bt, começaram a ser reportados, como por exemplo, a evolução da resistência de *H. zea* à proteína Cry1Ac expressa em algodão nos EUA (TABASHNIK et al., 2008), *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho em Porto Rico (STORER et al., 2010) e *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae) à proteína Cry1Ac expressa em algodão na Índia (DUHRUA; GUJAR, 2011) e, também foi reportado o primeiro caso de evolução de resistência de um coleóptero, *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte, 1868) (Coleoptera: Chrysomelidae), à proteína Cry3Bb1 expressa em milho nos EUA (GASSMANN et al., 2011).

A evidência de evolução de resistência destas pragas às proteínas Cry ocorreram em menos de 10 anos de uso da tecnologia, já a evolução da resistência de *S. frugiperda* ocorreu apenas quatro anos após a liberação comercial do milho Bt, tornando-se este, o caso mais rápido de evolução de resistência a campo para uma cultura Bt (STORER et al., 2010).

Trabalhos também relatam o surgimento de populações resistentes de *P. xylostella*, *Trichoplusia ni* (Hübner, 1800-1803) (Lepidoptera: Noctuidae), *P. gossypiella* e *H. virescens* (VAN RIE; FERRÉ, 2000; TABASHNIK et al., 2008; BRAVO; SOBERÓN, 2008). Estas lagartas apresentam altos níveis de resistência a, pelo menos, uma toxina da família Cry1A, demonstrando redução na ligação de, ao menos, uma proteína desta família aos receptores específicos das células epiteliais

do intestino, no entanto, possuem nenhuma ou pouca resistência cruzada à proteína Cry1C (TABASHNIK, 1994).

A resistência cruzada é definida como a resistência adquirida por uma população de inseto a uma determinada proteína inseticida e conseqüentemente essa população torna-se resistente à outra proteína, sem necessariamente, sofrer uma exposição excessiva à mesma (GRIFITTS; AROIAN, 2005).

Para a maioria dos casos de evolução da resistência em laboratório, os insetos apresentam mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em qualquer uma das etapas do modo de ação (HECKEL et al., 2007). No entanto, para os insetos que desenvolveram resistência em campo, apenas a alteração do sítio de ligação tem sido detectada (FERRÉ; VAN RIE, 2002; WANG et al., 2007; TABASHNIK et al., 2011).

Análises de ligação das proteínas purificadas aos receptores localizados nas vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMV – “Brush Border Membrane Vesicles”) preparadas a partir do intestino de larvas demonstram que a presença de receptores para uma toxina *Bt* específica é essencial para a toxicidade, e que, diferentes receptores para diferentes toxinas podem estar presentes (BRAVO et al., 2007; ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009; DOSS, 2009; SENA et al., 2009; ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011). A importância dos receptores da membrana epitelial torna-se mais evidente quando se observa que insetos, os quais se tornaram resistentes a uma ou várias toxinas, apresentaram perda na capacidade de ligação específica às toxinas, devido à perda ou modificação dos receptores no epitélio intestinal (FERRÉ et al., 1991; FERRÉ et al., 1994).

2.4. Interação das proteínas Cry1 e Vip3A com os receptores presentes nas BBMVs (“Brush Border Membrane Vesicles”) de lepidópteros-praga

Mediante o estudo da interação entre toxinas Cry e Vip, e BBMVs preparadas a partir do intestino médio de diferentes insetos, tem-se conseguido determinar a especificidade das toxinas.

Estudos realizados por Lee et al. (2003), Abdelkefi-Mesrati et al. (2009) e Sena et al. (2009), compararam o modo de ação da proteína Vip3A com Cry1 em

experimentos de ativação proteolítica, ligação à BBMV e habilidade para formar poros em diferentes ensaios *in vitro*. Os autores verificaram que a proteína Vip3A difere em várias etapas quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparados à proteína Cry1.

Em ensaios de ligação das proteínas Vip3Aa16 e Cry1Ac à BBMV de *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermüller, 1755) (Lepidoptera: Noctuidae), Hamadou-Charfi et al. (2013) demonstraram que a proteína Vip3Aa16 se liga especificamente aos receptores presentes na BBMV deste inseto, não impedindo a ligação da proteína Cry1Ac, indicando assim que estas proteínas se ligam a receptores distintos na BBMV deste inseto.

Com base no trabalho realizado por Sena et al. (2009), a proteína Cry1Fa ocupa o mesmo sítio de união que Cry1Ab em *S. frugiperda*, já que esta reduziu efetivamente a união de Cry1Fa marcada à BBMV deste inseto, ao mesmo tempo em que a união da proteína Cry1Fa não foi reduzida pelas proteínas Vip3Af1 e Vip3Aa1 não marcadas, o que indica que estas toxinas ocupam outro sítio de união em *S. frugiperda*. Sendo assim, estes resultados indicam que *S. frugiperda* apresenta um sítio de união para Cry1Fa compartilhado por Cry1Ab e outro sítio diferente compartilhado por Vip3Af1 e Vip3Aa1.

Desse modo, as toxinas Cry1Fa e Cry1Ab não devem estar numa mesma planta transgênica por permitirem a possibilidade de ocorrência de resistência cruzada. Já as propriedades distintas de união das proteínas Vip3A com proteínas Cry a receptores de *H. virescens*, *H. zea* e *S. frugiperda*, indicam um potencial muito baixo de resistência cruzada (LEE et al., 2006; JACKSON et al., 2007; SENA et al., 2009). Portanto, estas toxinas podem ser usadas em conjunto ou em rotação em estratégias efetivas de controle de pragas e de manejo de resistência (JACKSON et al., 2007).

Estudos realizados por Gouffon et al. (2011) demonstraram a especificidade de ligação da proteína Cry2Ae aos receptores do intestino médio das lagartas *H. virescens*, *H. zea* e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae). E em ensaios de competição utilizando as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Vip3A e Cry2Ab eles observaram que a proteína Cry2Ae compartilha o mesmo sítio receptor da proteína Cry2Ab, mas não com as proteínas Cry1 ou Vip3A, sugerindo

assim, que a proteína Cry2Ae poderia ser utilizada em estratégias de manejo de resistência das lagartas testadas, em combinação com as proteínas Cry1 e Vip3A.

São conhecidos quatro tipos de receptores envolvidos no complexo processo de ligação das proteínas Cry1 às microvilosidades da membrana apical das larvas de lepidópteros. Uma aminopeptidase-N (APN) e uma fosfatase alcalina (ALP), estando ambas ligadas à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina (CAD) e um glicoconjugado (GCR) de 270 kDa (VALAITIS et al., 2001; BRAVO et al., 2007; PIGOTT; ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009).

As proteínas caderinas são glicoproteínas de 210 kDa envolvidas no contato intracelular. Enquanto as caderinas clássicas encontram-se principalmente dentro de junções envolvidas na adesão célula-célula (ANGST et al., 2001), as proteínas caderinas de lepidópteros foram identificadas na membrana apical das células colunares do epitélio do intestino médio local alvo das toxinas Cry (CHEN et al., 2003).

Os receptores do tipo APN e ALP são proteínas ancoradas a GPI e estão localizados no interior de plataformas de lipídeos ("Lipid Rafts") que constituem pequenos domínios na membrana celular (GRIFFITS et al., 2005). As aminopeptidases-N (APN) são exopeptidases e atuam no intestino larval de lepidópteros e têm sido amplamente estudadas como receptores das toxinas Cry de *B. thuringiensis*. Diferentes de APNs dos vários grupos de insetos foram isoladas e caracterizadas, sendo classificadas dentro de cinco grupos: APN1, APN2, APN3, APN4 e APN5 (HERRERO et al., 2005).

Vários estudos têm relatado que as ALPs também funcionam como receptores das toxinas Cry, no qual foi demonstrado que a proteína ALP pode atuar como um receptor de Cry1Ac em *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae) e *H. virescens* (McNALL; ADANG, 2003; JURANT-FUENTES; ADANG, 2004) e como um receptor Cry11Aa em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) (FERNANDEZ et al., 2006).

Até o momento não existem receptores descritos para as proteínas Vip3A, no entanto, alguns receptores putativos têm sido identificados. Em *M. sexta*, a toxina Vip3A se liga às proteínas de 80 e 100 kDa na BBMV deste inseto (LEE et al., 2003).

Ao passo que no intestino médio de *Prays oleae* (Bernard, 1788) (Lepidoptera: Praydidae) a toxina Vip3Aa16 reconhece um receptor putativo em torno 65 kDa (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009) e no intestino médio de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) esta proteína se liga a receptores putativos em torno de 55 e 100 kDa (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011). As diferenças encontradas entre os possíveis receptores para as proteínas Vip3A sugerem que o modo de ação desta toxina pode ser diferente de um inseto para outro (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011).

Estudos realizados por Singh et al. (2010) demonstraram que a proteína ribossomal S2 é parceira na ligação da proteína Vip3A, e que a inibição da expressão dessa proteína ribossomal S2 reduziu a toxicidade da proteína Vip3A, em células Sf21 e larvas de *S. litura*, no entanto, estudos são necessários para a identificação do receptor principal.

Diferentes toxinas se ligam a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a sua especificidade. A união das toxinas à membrana epitelial das células do intestino médio, ainda que necessária, não é suficiente para determinar que uma proteína Cry ou Vip seja tóxica contra um determinado inseto. Em ensaios de ligação de proteínas Vip3A marcadas radioativamente com ¹²⁵I à BBMV de *S. frugiperda*, Chakroun e Ferré (2014), observaram que a proteína Vip3Ad, embora não tenha sido tóxica para *S. frugiperda*, ligou-se aos receptores presentes na BBMV deste inseto.

Assim sendo, as análises de ligação das novas toxinas Vip3Aa42, Vip3Aa43 de *B. thuringiensis*, aos receptores da membrana do epitélio intestinal dos insetos-praga, *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* poderão demonstrar correlação entre ligação e toxicidade e, por meio de análises de competição com a toxina Cry11a10, poderá se inferir quais combinações resultariam no manejo da resistência destes insetos. Desta forma, as diferentes combinações poderiam ser utilizadas na construção de plantas piramidadas, com mais de um transgene de *B. thuringiensis*, diminuindo as chances do inseto se tornar resistente, além de se determinar padrões plausíveis de resistência cruzada.

3. OBJETIVOS

- Analisar a toxicidade das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 para lagartas neonatas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* a partir do lisado protéico de *E. coli*.

- Realizar ensaios de competição *in vitro* com BBMs (“Brush Border Membrane Vesicles”) de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* utilizando-se das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 marcadas com biotina a fim de se indicar as melhores combinações para a produção de plantas piramidadas visando o manejo da resistência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amplificação por PCR dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10*

Os genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1Ia10*, previamente clonados no vetor pGEM T-Easy (Promega) foram amplificados por PCR utilizando-se do DNA plasmidial dos clones de interesse. As reações de amplificação foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores específicos, sendo utilizado para os genes *vip3Aa* os iniciadores Vip5-Vip6 (Tabela 1), descritos por Loguercio et al. (2002). Estes iniciadores foram descritos baseados na sequência do gene *vip3Aa1* (gb: [AAC37036]) e possibilitam a amplificação dos genes *vip3Aa* completos com 2370 pb, partindo do códon de iniciação até o códon de terminação, estes foram utilizados por Marucci (2010), para o isolamento do gene *vip3Aa42* a partir da linhagem bacteriana *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e do gene *vip3Aa43* a partir da linhagem bacteriana *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1.

Para a amplificação do gene *cry1Ia10* foram utilizados os iniciadores CryF-CryR (Tabela 1), estes foram elaborados baseados na sequência do gene *cry1Ia10* (gb: [AY262167.1]) e possibilitam a amplificação do gene *cry1Ia10* completo com 2160 pb, partindo do códon de iniciação até o códon de terminação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1Ia10*.

Iniciador	Sequência
¹ Vip5	5' <u>ATGAACAAGAATAACTAAATTAAGC</u> 3' (d)
¹ Vip6	5' G <u>ATCTTACTTAATAGAGACAT</u> 3' (r)
² CryF	5' <u>ATGAAACTAAAGAATCAA</u> 3' (d)
² CryR	5' <u>CTACATGTTACGCTCAATATGGAG</u> 3' (r)

¹ Loguercio et al. (2002); ² Elaborados neste trabalho - (d): direto; (r): reverso. Os códons de iniciação e terminação apresentam-se sublinhados.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 25 µL para cada amostra partindo-se do DNA plasmidial de cada clone e utilizando a enzima “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen). Os componentes da reação e seus volumes estão descritos na Tabela 2. Em todas as reações de

amplificação foi adotado um controle negativo, substituindo-se o volume de DNA usado por água Milli-Q autoclavada.

Tabela 2. Reagentes utilizados nas reações de amplificação por PCR.

Reagentes	Volume
DNA (50 ng/ μ L)	3,0 μ L
DNTP (10 mM)	0,5 μ L
MgSO ₄ (50 mM)	1,0 μ L
10X High Fidelity Buffer	2,5 μ L
Oligonucleotídeos (10 pmoles)	1,0 μ L
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/ μ L)	0,1 μ L
Água (q.s.p)	25,0 μ L

O programa de termociclagem foi otimizado de acordo com a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores. As reações de amplificação foram transferidas para um aparelho termociclador programado para 30 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min e cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 68°C por 2 min. Ao término dos ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 68°C por 5 min.

Posteriormente, as amostras foram visualizadas e analisadas em géis de agarose 0,8%, utilizando-se de 5 μ L do produto da PCR e 3 μ L de tampão de carregamento de DNA (0,1 M de Tris-HCl, pH 6,8; 0,02% de Azul de Bromofenol; 50% de Glicerol). O gel, contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), foi submetido à eletroforese horizontal a 70 V por 2 h, conduzida em tampão TEB (0,4 M de Tris; 0,1 M de EDTA; 0,01 M de Ácido Bórico, pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 μ g/mL). O produto da amplificação foi comparado com o marcador molecular “1kb DNA Ladder” (Thermo Scientific), o qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação do tamanho dos fragmentos. Os géis de agarose foram visualizados sob fonte de luz UV e registrado por meio de um sistema de fotodocumentação digital em equipamento GEL DOC 2000 (Bio-Rad), por meio do programa Quantity-One.

Após verificar a amplificação dos fragmentos, o produto de PCR restante (20 μ L) foi purificado utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”

(Promega) conforme as recomendações do fabricante, sendo o produto final ressuspenso em 30 µL de água livre de nucleases e mantido a 4°C por cerca de 4 h. Após este período realizou-se a quantificação do produto de PCR purificado no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.2. Clonagem dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10* no vetor pET SUMO

O kit para clonagem “Champion™ pET SUMO Expression System” (Invitrogen) possibilita uma clonagem rápida por meio da inserção de um produto de PCR no vetor. Este vetor permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada a uma cauda com seis histidinas (6XHis), o que facilita a purificação da proteína por meio de colunas de purificação por afinidade, carregadas com níquel, e a uma proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. A estrutura terciária da proteína SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease, presente no kit. Quando essa proteína está fusionada à região N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na produção da proteína nativa.

A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen, 1883) (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae), que faz parte da família da proteína “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares. No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessária a liberação da T7 RNA polimerase para as células pela indução da expressão desta, cujo gene T7 RNA polimerase é fornecido pela célula hospedeira *E. coli* BL21 (DE3) One Shot de maneira regulada e que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 do vetor e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990) (Figura 1).



Figura 1. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

Para a clonagem dos genes *vip3Aa* e *cry11a10* no vetor pET SUMO inicialmente foram realizadas as reações de ligação utilizando-se de 150 ng de inserto, 50 ng de vetor pET SUMO, 1 μ L de tampão de ligação 10X, 1 μ L de enzima T4 ligase e água estéril (q.s.p) 10 μ L. A reação foi incubada a 15°C durante 16 h.

Após este período, 2 μ L do produto de cada reação de ligação foram adicionados em tubos contendo 50 μ L de células de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot (Invitrogen), as quais foram utilizadas para a transformação por meio do método de choque térmico e selecionadas em placas com meio LB (10 g de triptona/L; 0,5 g de extrato de levedura/L e 10 g de NaCl/L, adicionada de 1,5% de ágar), contendo 50 μ g canamicina/mL (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Os clones resultantes foram transferidos, de forma organizada, para tubos de polipropileno tipo Falcon contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com 50 μ g canamicina/mL e as células foram multiplicadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm por 12 h. Posteriormente, uma alíquota de 700 μ L foi assepticamente estocada em glicerol (100%) estéril e armazenada em ultra-freezer a -80° C.

Após o período de multiplicação, 2 mL das células foram utilizados para a extração do DNA plasmidial por meio da Lise Alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), inicialmente a solução de células foi centrifugada a 17.949 x g por 5 min e o sobrenadante foi descartado, 200 µL da solução I (25 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de EDTA; 50 mM de D-glicose), previamente resfriados, foram adicionados às amostras, agitados até a completa solubilização das células e mantidos a temperatura ambiente por 5 min.

Em seguida, 200 µL da solução II (0,2 N de NaOH; 0,5% de SDS) foram adicionados às amostras. A solução foi gentilmente misturada por meio da inversão dos tubos e mantida no gelo por 5 min. Decorrido este período, 150 µL da solução III (3 M de Acetato de Potássio, pH 4,8) foram acrescentados à amostra. Os tubos foram gentilmente invertidos a fim de misturar a solução e mantidos no gelo por 5 min. Após este período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 5 min.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionados à suspensão. Após 2 min de homogeneização, procedeu-se a centrifugação das amostras a 17.949 x g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado por meio da adição de 875 µL de etanol absoluto gelado à solução. As amostras foram misturadas e mantidas no gelo por 5 min. Logo em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, secado sob temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de TE (10 mM de Tris-HCl e 0,1 M de EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 µg/mL).

4.2.1. Confirmação dos clones contendo os genes *vip3Aa* e *cry1la10* por PCR

O DNA plasmidial dos clones foram então quantificados em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e utilizados em reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos permitindo visualizar presença ou ausência do inserto através do produto amplificado. As reações de amplificação estão descritas na Tabela 2, estas foram transferidas para um aparelho termociclador programado para

30 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min e cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 68°C por 2 min. Ao término dos ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 68°C por 5 min.

Além dos oligonucleotídeos já descritos para os genes de interesse (Tabela 1), foi utilizado, também para cada gene, o oligonucleotídeo SUMO F, cuja sequência está presente no vetor pET SUMO, o que permitiu verificar se o gene clonado estava na fase de leitura correta com o promotor.

4.3. Indução da expressão dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10* e obtenção dos lisados proteicos

Para a indução dos genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1Ia10* foram realizados cultivos em placas de Petri contendo meio de cultura LB suplementado com 50 µg canamicina/mL. Para isto, 12 µL da cultura dos clones em células de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, assepticamente estocado em glicerol (100%) estéril e armazenado em ultra-freezer a - 80° C foram utilizados. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h.

Em seguida foi preparado um pré-inóculo em tubos de polipropileno tipo Falcon com capacidade para 50 mL, contendo 10 mL de meio LB e 50 µg canamicina/mL. Uma colônia do material cultivado na placa de Petri foi transferida para esse tubo e as culturas foram incubadas a 37°C e 250 rpm por 16 h.

Após esse período, 4 mL do pré-inóculo foram transferidos para um erlenmeyer com capacidade de 1000 mL contendo 400 mL de meio LB e 50 µg canamicina/mL e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até que a D.O. a 600 nm estivesse entre 0.5 e 0.8. Em seguida as culturas foram induzidas adicionando-se IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) na concentração final de 0,4 mM e mantidas sob agitação de 200 rpm por 5 h.

Inicialmente as culturas foram incubadas em quatro temperaturas diferentes, 16°C, 22°C, 30°C e 37°C, para verificar qual a melhor temperatura para a expressão das proteínas de interesse, sendo isto realizado para todas as proteínas em estudo. Este teste de temperaturas também serviu para analisar se as proteínas estavam

sendo expressas de forma solúvel no sobrenadante ou se estavam formando corpos de inclusão e sendo retidas na forma insolúvel no precipitado.

Sendo assim, após a indução por 5 h nas diferentes temperaturas, as culturas que tiveram a indução (I) com IPTG assim como a cultura controle não induzida (NI), tiveram as células coletadas por centrifugação em tubos plásticos em centrífuga Beckman® a 17.400 x g por 30 min e os “pellets” obtidos foram mantidos em gelo. Para o início da lise celular foram adicionados aos “pellets” bacterianos 20 mL de tampão de lise (50 mM de Fosfato de Potássio, pH 7,8; 400 mM de NaCl; 100 mM de KCl; 10% de Glicerol; 0,5% de Triton X-100; 10 mM de Imidazol) e estes foram ressuspensos por agitação vigorosa em aparelho do tipo “vortex”. Após, adicionou-se 600 µL de lisozima (100 mg/mL), 200 µL de DNase I (1 mg/mL) e 20 µL de PMSF (0,1 M), em seguida as amostras foram incubadas a 37°C sob agitação de 140 rpm por 30 min.

Para o total rompimento das células, as amostras foram mantidas em gelo picado e submetidas à sonicação (Power 40% e Pulser 40) em aparelho “Omni Sonic Ruptor 400” (Omni International) por 60 s com intervalo de 15 s, sendo este passo repetido três vezes. Em seguida, foram centrifugadas a 17.400 x g por 30 min a 4°C e os sobrenadantes transferidos para tubos de polipropileno tipo Falcon estéreis de 15 mL. Os precipitados foram ressuspensos em 2 mL de tampão de lise sob agitação vigorosa em aparelho do tipo “vortex”. Tanto os precipitados quanto os sobrenadantes foram analisados em gel de poliacrilamida para verificar a eficiência da expressão.

4.3.1. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando o sistema “Mini-PROTEAN® 3 Cell” (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 30:0,8%) e 1% de SDS e o gel de empilhamento na concentração de 5% de poliacrilamida e 0,5% de SDS. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50 mM de Tris, pH 8,6; 1,92 M de Glicina e 1% de SDS), a 30 mA e 200 V em temperatura ambiente por 90 min.

As amostras foram preparadas contendo: 20 µL de cada lisado proteico e 10 µL de tampão de carregamento de proteína [0,187 M de Tris, pH 7,0; 2,0% de SDS (m/v); 1,0% de Azul de Bromofenol (m/v); 27% de Glicerol (v/v) e 5,0% de β-mercaptoetanol (v/v)]. Essas amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min e uma alíquota de 20 µL foi aplicada no gel. Em todos os géis, utilizou-se do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) para monitorar a separação das proteínas durante a eletroforese e o peso molecular das mesmas.

Após a eletroforese, os géis foram imersos em recipientes plásticos contendo 30 mL de solução de coloração (0,1% de Coomassie-Brilliant Blue R-250 (m/v); 50% de Metanol e 10% de Ácido Acético) por 15 min. Em seguida foi realizada uma lavagem com solução descorante (10% de Metanol e 10% de Ácido Acético), sob agitação constante por 12 h. Os géis foram colocados em filme plástico e as imagens foram digitalizadas em aparelho de scanner.

4.4. Detecção das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 por “Western blotting”

Para a realização da técnica de “Western blotting”, o gel de poliacrilamida foi preparado conforme descrito no item anterior e não corado. As amostras aplicadas no gel foram as alíquotas das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 induzidas com IPTG e não induzidas e o marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific). Após a corrida eletroforética as amostras foram eletrotransferidas em cuba de transferência úmida “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad) para uma membrana “Amersham Hybond-P PVDF” (GE Healthcare), utilizando-se de tampão CAPS 1X (10 mM de CAPS, pH 11,0) sendo o processo realizado a 100 V a 4°C por 1 h.

Após ser removida do cassete, a membrana foi umedecida com Metanol 100% e lavada em água destilada por 5 min. O bloqueio de ligações inespecíficas na membrana foi realizado utilizando 10 mL de tampão PBS-T (1 mM de KH₂PO₄; 10 mM de Na₂HPO₄; 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl, pH 7,4 e 0,1% de Tween-20) adicionado de 5% (m/v) de leite em pó desnatado e, mantido em agitação suave por

1 h. Após este período a membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão PBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 5 min.

Em seguida, a membrana foi colocada em uma solução contendo o anticorpo primário: “Anticorpo Monoclonal Anti-polyHistidine, Clone HIS-1” (Sigma-Aldrich) e PBS-T na proporção de 1:5.000, e mantida em temperatura ambiente sob agitação suave por 1 h.

Após lavagens com PBS-T, a membrana foi colocada em uma solução contendo o anticorpo secundário: “Amersham ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep)” (GE Healthcare) e PBS-T na proporção de 1:5.000, e mantida em temperatura ambiente sob agitação suave por 1 h. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com PBS-T.

O sistema de detecção da marcação foi por meio da mistura do cromógeno mais substrato específico “SIGMAFAST™ DAB With Metal Enhancer Tablet Set” (Sigma-Aldrich) e para a interrupção da reação, a membrana foi lavada com água deionizada, sendo posteriormente dessecada em temperatura ambiente e, ao final, guardada ao abrigo da luz (TOWBIN et al., 1979).

4.5. Quantificação das proteínas por densitometria

A quantificação da banda referente à expressão da proteína de interesse foi realizada utilizando-se do “software ImageQuant TL 8.1” (GE Healthcare) por meio do qual a densidade óptica das bandas foi medida e relacionada com as quantidades conhecidas de uma curva padrão de proteína construída com cinco diferentes concentrações de Soroalbumina Bovina (BSA) sendo elas de 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg/mL. Para tanto, géis de poliacrilamida foram preparados e as amostras dos lisados protéicos de interesse foram aplicadas no gel, junto com as cinco diferentes concentrações de BSA. Depois de descorados, os géis foram digitalizados em aparelho scanner “HP scanjet G4050” e a quantificação da banda referente à expressão da proteína de interesse foi realizada.

4.6. Bioensaios com os lisados protéicos

Os bioensaios foram realizados utilizando-se de lagartas neonatas de *S. frugiperda* e *H. virescens* (cedidas gentilmente pela empresa SGS Gravena Ltda / Jaboticabal – SP), e *A. gemmatalis* (cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ de Piracicaba-SP).

Para a determinação da concentração letal para 50% e 90% das lagartas (CL_{50} e CL_{90}), diferentes concentrações das protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 foram diluídas em solução de lise (pET SUMO) utilizando-se para os testes de toxicidade as seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 ng/cm² para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. Já para a lagarta *H. virescens* foram utilizadas as concentrações de: 100; 500; 1.500; 2.000; 5.000; 10.000 ng/cm². Estas concentrações foram baseadas em ensaios realizados previamente no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), assim como no banco de dados “Toxin Specificity Database” disponível em: <http://www.glfrc.forestry.ca/bacillus/>.

Para a realização dos bioensaios foi utilizada uma dieta artificial específica para as espécies estudadas (GREENE et al., 1976), conforme descrito na Tabela 3. Os ingredientes listados foram triturados em aparelho de liquidificador e a dieta foi individualizada com o auxílio de um erlenmeyer nas células das placas de poliestireno de 128 poços (Bio-Assay Tray – Bio-Serv) utilizadas.

Tabela 3. Ingredientes necessários para a preparação da dieta artificial utilizada nos bioensaios e manutenção das lagartas para a retirada dos intestinos.

Ingredientes	Quantidade
Gérmen de trigo	100 g
Feijão carioca	400 g
Ácido ascórbico	6 g
Ácido sórbico	3 g
Farelo de soja	5 g
Levedura de cerveja	62,5 g
Caseína	37,5 g
Carragenina	32,5
Formaldeído	6,5 mL
Solução Vitamínica	30 mL
Tetraciclina	1 cápsula
Nipagin	5,75 g
Água destilada	1700 mL

Após a individualização da dieta nas células, as placas foram colocadas em fluxo laminar e deixadas expostas à luz ultravioleta por aproximadamente 15 min para a secagem. Os bioensaios consistiram de tratamentos de superfície onde, 50 μ L dos lisados protéicos foram distribuídos em cada célula da bandeja. Dois controles negativos foram utilizados no experimento: 1) dieta artificial banhada com 50 μ L de extrato protéico de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, sem a presença do vetor pET SUMO + gene de interesse; 2) dieta artificial banhada com 50 μ L de tampão de lise utilizado na obtenção dos lisados proteícos.

Posteriormente, as bandejas com a dieta banhada pelas proteínas inseticidas foram mantidas em fluxo laminar por aproximadamente 1 h e, após a absorção das proteínas na dieta, lagartas neonatas foram cuidadosamente colocadas diretamente sobre a dieta com o auxílio de um pincel fino, sendo uma lagarta por célula. Logo após, as bandejas foram vedadas e levadas a uma sala climatizada, com temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar 70%, $\pm 10\%$ e luminosidade

14 h de luz: 10 h de escuro (MONNERAT et al., 2007). Na Figura 2 é possível observar algumas etapas realizadas durante o preparo dos bioensaios.

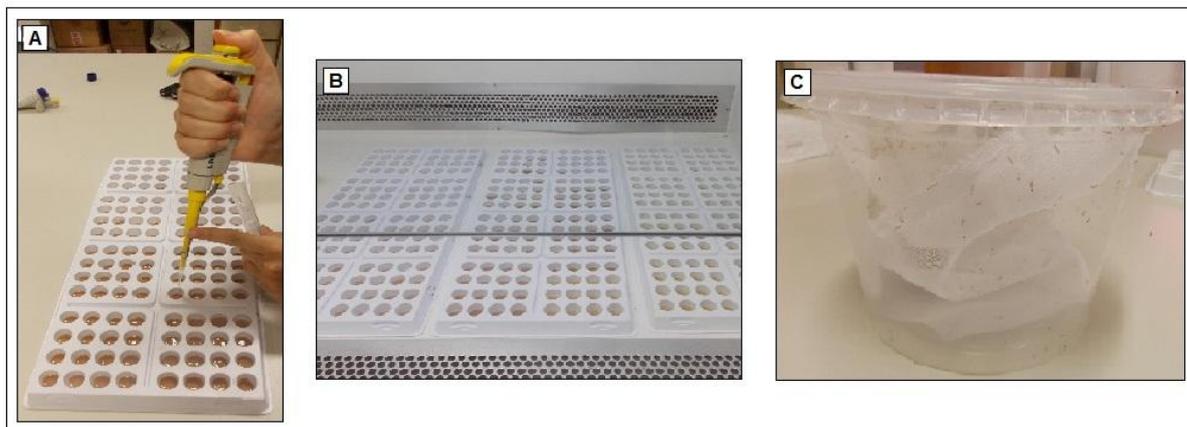


Figura 2. Etapas realizadas durante o preparo dos bioensaios. A - Adição de 50 μL do lisado protéico em cada célula; B - Bandejas com a dieta banhada pelas proteínas mantidas em fluxo laminar; C – Pote plástico onde os ovos estavam acondicionados para a eclosão das lagartas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em quadruplicata, com 16 lagartas por repetição. A mortalidade foi avaliada no sétimo dia após a exposição das lagartas à dieta com proteína inseticida. A CL_{50} e a CL_{90} foram calculadas por meio da análise *probit* utilizando o programa de estatística POLO-PC (LeOra Software, Berkeley, CA).

4.7. Purificação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10

A coluna utilizada para a purificação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 foi a “HisTrap™ HP Columns” de 1 mL (GE Healthcare). Estas colunas permitem a purificação por cromatografia de afinidade uma vez que são preparadas com “Ni Sepharose” o que possibilita uma alta purificação de proteínas marcadas com histidina. Como no caso das proteínas em estudo, que estão fusionadas a uma cauda com seis histidinas (6XHis).

A coluna foi encaixada em uma seringa descartável de 50 mL e colocada em um suporte. Todas as soluções usadas para a purificação, assim como os lisados protéicos, foram cuidadosamente preparados e filtrados em filtros de 0,22 μm . Para

a purificação das proteínas as seguintes etapas foram realizadas, nas quais foram passadas pela coluna as soluções e quantidades descritas.

- 1- 5 mL de H₂O Milli-Q autoclavada
- 2- 5 mL de tampão de equilíbrio (20 mM de Tampão Fosfato; 0,5 M de NaCl, pH 7,4, contendo 50 mM de Imidazol)
- 3- 5 mL do lisado protéico (aproximadamente 40 mg de proteína)
- 4- 10 mL de tampão de equilíbrio
- 5- 5 mL de tampão de eluição (20 mM de Tampão Fosfato; 0,5 M de NaCl, pH 7,4, contendo 300 mM de Imidazol)
- 6- Frações de aproximadamente 500 µL foram coletadas em microtubos
- 7- 5 mL de tampão de equilíbrio
- 8- 10 mL de tampão de eluição
- 9- 3 mL de etanol 20%

Após a purificação, as frações coletas foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12%.

4.8. Ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 com tripsina pancreática bovina e suco intestinal de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*

A concentração das proteínas purificadas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) usando BSA como padrão. As proteínas purificadas foram ativadas por proteólise utilizando tripsina pancreática bovina (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:10 de tripsina:protoxina e incubadas sob agitação de 140 rpm a 37°C por 1:30 h. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 15 min e analisadas em gel de poliacrilamida a 12% para verificar a eficiência da digestão.

Para os ensaios de proteólise com suco intestinal, lagartas de último instar, de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, alimentadas em dieta artificial foram imobilizadas em gelo por 5 min e dissecadas longitudinalmente para coletar a membrana peritrófica junto com o bolo alimentar. Para cada amostra, cinco membranas peritróficas com seu conteúdo alimentar foram colocadas em microtubos, centrifugadas a 13.000 x g por 20 min e o sobrenadante coletado. A

concentração protéica do suco intestinal foi determinada pelo método de Bradford adotando-se a proporção de 1:10 de suco intestinal:protoxina. A mistura foi incubada sob agitação de 140 rpm a 37°C por 1:30 h e, após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 15 min e analisadas em gel de poliacrilamida a 12%.

4.9. Marcação das proteínas ativadas com biotina

As toxinas purificadas e ativadas com tripsina pancreática bovina foram quantificadas pelo método de Bradford e tratadas com biotina “Amersham ECL Protein Biotinylation Module” (GE Healthcare), para isso foi adicionado 40 µL de biotina para cada 1 mg de proteína. A mistura foi incubada sob agitação constante e 110 rpm em temperatura ambiente por 1 h.

Em seguida, a coluna Sephadex G-25 (Amersham) foi bloqueada com 5 mL de tampão PBS 1X (1 mM de KH_2PO_4 ; 10 mM de Na_2HPO_4 ; 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,4), contendo BSA 1% (m/v) e lavada com 20 mL de tampão PBS 1X. As proteínas ligadas com a biotina foram adicionadas à coluna e eluídas pela adição de 10 mL de tampão PBS 1X. Frações contendo aproximadamente 1 mL de solução foram coletadas.

As frações coletadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 9% e este não foi corado. As amostras foram eletrotransferidas em cuba de transferência úmida “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad) para membrana de nitrocelulose “Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane” (GE Healthcare) utilizando-se de tampão CAPS (10 mM de CAPS, pH 11,0) sendo o processo realizado a 100 V por 1 h e a 4°C.

Após ser removida do cassete, a membrana foi lavada em Tampão TBS (50 mM de Tris e 150 mM de NaCl, pH 7,6) por 5 min. O bloqueio de ligações inespecíficas na membrana foi realizado utilizando 10 mL de tampão TBS-T (50 mM de Tris; 150 mM de NaCl, pH 7,6 e 0,1% Tween-20) adicionado de 5% (m/v) de leite em pó desnatado e, mantido em agitação suave por 1 h. Após este período a membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão TBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 5 min.

Em seguida, a membrana foi colocada em uma solução contendo o conjugado “Streptavidin-AP Conjugate” (Roche) e TBS-T na proporção de 1:2.000, e mantida em agitação suave por 1 h, a temperatura ambiente. Após este período a membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão TBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 3 vezes de 10 min. A revelação foi realizada utilizando o substrato “BCIP/NBT Liquid Substrat System” (Sigma-Aldrich).

4.10. Retirada do intestino de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* e preparação das BBMV

Lagartas de último ínstar de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, alimentadas em dieta artificial (Tabela 3) foram utilizadas para a retirada dos intestinos e posterior preparação das BBMV. Estas lagartas foram imobilizadas em gelo por 5 min, dissecadas longitudinalmente e o intestino foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pinça. Após a retirada dos intestinos estes foram colocados em placas de Petri e lavados em tampão MET gelado (250 mM de Manitol; 17 mM de Tris-HCl e 5 mM de EGTA, pH 7,5).

A estocagem foi realizada em microtubos, onde os intestinos limpos foram colocados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80°C. Na Figura 3 é possível observar um esquema demonstrando o processo de retirada do intestino das lagartas.

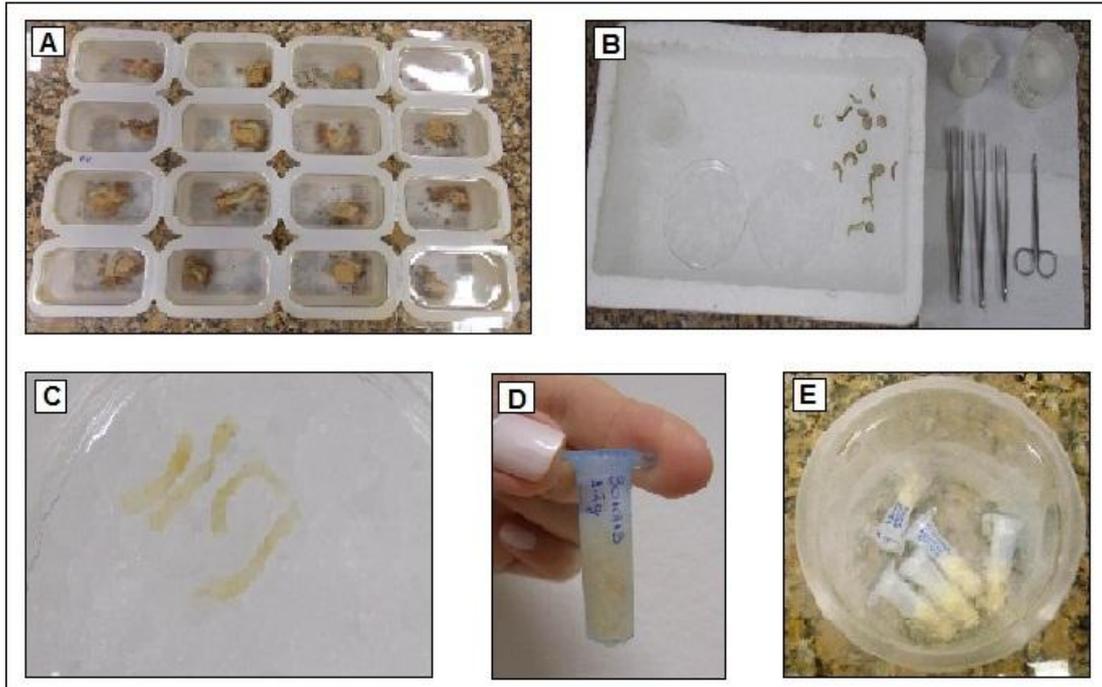


Figura 3. Esquema demonstrando o processo de retirada do intestino das lagartas em estudo. A – Manutenção das lagartas em placas de poliestireno de 16 células contendo dieta artificial; B – Lagartas de último instar imobilizadas em gelo; C – Placa de Petri com os intestinos e tampão MET; D – Microtubo de 2 mL com intestinos limpos e pesados; E – Congelamento em nitrogênio líquido dos intestinos contido nos microtubos.

As BBMV's foram preparadas pelo método de precipitação de diferencial de magnésio descrito por Wolfersberger et al. (1987) com algumas modificações. Para tanto, dois grama dos intestinos previamente limpos e congelados foram colocados em um tubo plástico para centrifuga Beckman®. Adicionou-se a estes intestinos 10 mL de tampão de homogeneização gelado (300 mM de Manitol; 17 mM de Tris-HCl; 10 mM de Hepes; 5 mM de EGTA; 2 mM de DTT; 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF, pH 7,4) e estes foram submetidos à trituração em aparelho homogeneizador tipo Turrax (GLH Omini Internacional) de 9 pulsos de 30 s com 30 s de pausa, na velocidade de 3.000 rpm, sempre mantendo os tubos em gelo. Após isso, adicionou-se 10 mL de $MgCl_2$ a 24 mM e incubou-se a mistura em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada por 15 min a 2.000 x g e 4°C e o sobrenadante foi transferido rapidamente a outro tubo plástico para centrifuga gelado. Este sobrenadante foi centrifugado a 16.000 x g por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

sedimento foi ressuspensionado em 2,5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de $MgCl_2$ a 24 mM, incubado no gelo por 15 min e centrifugado por 15 min a 2.000 x g e 4°C. O sobrenadante coletado foi novamente centrifugado a 16.000 x g por 45 min a 4°C e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de tampão de homogeneização. As BBMV's purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford, analisadas em gel de poliacrilamida a 12% para verificar a integridade do perfil protéico, divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a - 80°C.

4.11. Ensaio de ligação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 à BBMV's de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*

Os ensaios de ligação foram realizados como descrito por Abdelkefi-Mesrati et al. (2011) com algumas modificações e caracterizaram-se pela ligação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 às BBMV's extraídas do intestino médio de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Cada proteína biotinizada (100 ng) foi incubada com 10 µg de BBMV's em 100 µL de tampão PBS 1X, a 28°C durante 1 h. As proteínas não ligadas à BBMV's foram removidas no processo de centrifugação por 15 min a 13.000 x g. As BBMV's foram lavadas duas vezes em tampão PBS 1X e ressuspensionadas em 20 µL de tampão PBS 1X e 10 µL de tampão de carregamento de proteína. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 9% e este não foi corado.

As amostras foram eletrotransferidas em cuba de transferência úmida "Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad) para membrana de nitrocelulose "Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane" (GE Healthcare) utilizando-se de tampão CAPS (10 mM de CAPS, pH 11,0) sendo o processo realizado a 100 V por 1 h e a 4°C.

Após ser removida do cassete, a membrana foi lavada em Tampão TBS (50 mM de Tris e 150 mM de NaCl, pH 7,6) por 5 min. O bloqueio de ligações inespecíficas na membrana foi realizado utilizando 10 mL de tampão TBS-T (50 mM de Tris; 150 mM de NaCl, pH 7,6 e 0,1% Tween-20) adicionado de 5% (m/v) de leite em pó desnatado e, mantido em agitação suave por 1 h. Após este período a

membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão TBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 5 min.

Em seguida, a membrana foi colocada em uma solução contendo o conjugado “Streptavidin-AP Conjugate” (Roche) e TBS-T na proporção de 1:2.000, e mantida em agitação suave por 1 h, a temperatura ambiente. Após este período a membrana foi enxaguada por 2 vezes em tampão TBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 3 vezes de 10 min. A revelação foi realizada utilizando o substrato “BCIP/NBT Liquid Substrat System” (Sigma-Aldrich).

4.12. Ensaio de competição homóloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 as BBMV de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*

Os ensaios de competição homóloga foram realizados como descrito por Abdelkefi-Mesrati et al. (2011) com algumas modificações e caracterizaram-se pela ligação e competição das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 aos receptores extraídos do intestino médio de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Uma proteína biotinizada (100 ng) foi incubada com 10 µg de BBMV em 100 µL de tampão PBS 1X a 28°C por 1 h, na presença da mesma proteína tripsinizada não marcada com biotina em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes.

As proteínas não ligadas à BBMV foram removidas no processo de centrifugação por 15 min a 13.000 x g. As BBMV foram lavadas duas vezes em tampão PBS 1X e ressuspensas em 20 µL de tampão PBS 1X e 10 µL de tampão de carregamento de proteína. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 9% e este não foi corado. As amostras foram eletrotransferidas e reveladas conforme descrito no item 4.11.

4.13. Ensaio de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 as BBMV de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*

Os ensaios de competição heteróloga foram realizados baseados nos resultados de mortalidade estimados, sendo realizados como descrito por Hamadou-Charfi et al. (2013) com algumas modificações e caracterizaram-se pela ligação e

competição das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 aos receptores extraídos do intestino médio de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*.

Nos ensaios realizados utilizando BBMVs de *S. frugiperda* a proteína biotinizada Vip3Aa42 (100 ng) foi incubada com 10 µg de BBMVs em 100 µL de tampão PBS 1X a 28°C por 1 h, na presença da proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes.

Já nos ensaios realizados utilizando BBMVs de *A. gemmatalis*, a proteína biotinizada Cry1Ia10 (100 ng) foi incubada com 10 µg de BBMVs em 100 µL tampão PBS 1X a 28°C por 1 h, primeiramente na presença da proteína Vip3Aa42 tripsinizada não marcada com biotina em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes. Após isso, o mesmo ensaio foi realizado, utilizando como competidora a proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes.

Também foi realizado um ensaio de competição heteróloga utilizando BBMVs de *A. gemmatalis* no qual, a proteína biotinizada Vip3Aa42 (100 ng) foi incubada com 10 µg de BBMVs em 100 µL tampão PBS 1X a 28°C por 1 h na presença da proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes.

As proteínas não ligadas à BBMVs foram removidas no processo de centrifugação por 15 min a 13.000 x g. As BBMVs foram lavadas duas vezes em tampão PBS 1X e ressuspendidas em 20 µL de tampão PBS 1X e 10 µL de tampão de carregamento de proteína. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 9% e este não foi corado. As amostras foram eletrotransferidas e reveladas conforme descrito no item 4.11.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação por PCR dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10*

Os oligonucleotídeos iniciadores Vip5-Vip6 (Tabela 1) foram utilizados nas reações de PCR permitindo a amplificação dos genes *vip3Aa42* e *vip3Aa43* completos com 2370 pb. Para a amplificação do gene *cry1Ia10* foram utilizados os oligonucleotídeos CryF-CryR (Tabela 1) possibilitando a amplificação do gene *cry1Ia10* completo com 2160 pb (Figura 4).

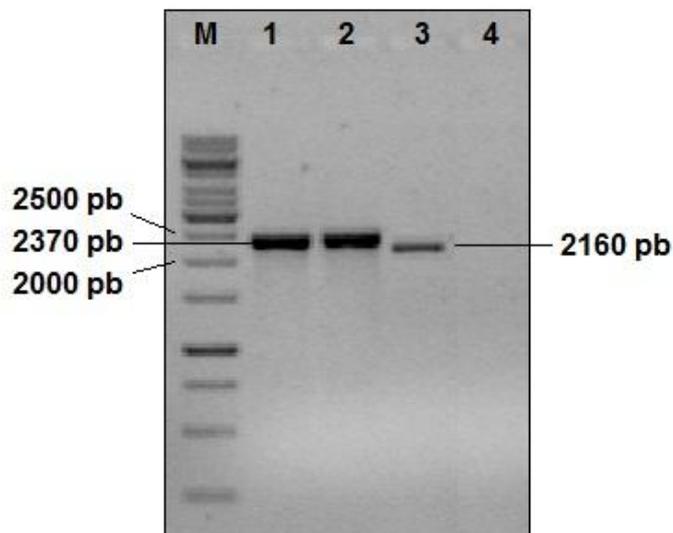


Figura 4. Eletroforograma evidenciando a amplificação dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10*: M – Marcador Molecular “1 Kb DNA Ladder” (Thermo Scientific); 1 - *vip3Aa42*; 2 - *vip3Aa43*; 3 - *cry1Ia10*; 4 - Controle negativo da reação.

5.2. Clonagem dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia10* no vetor pET SUMO e confirmação dos clones por PCR

As subclonagens dos genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1Ia10* a partir do vetor pGEM T-Easy para o vetor de expressão pET SUMO, foram realizadas com sucesso.

Clones positivos foram obtidos para os genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1Ia10*, no entanto, só foram selecionados os clones que amplificaram utilizando, tanto os

oligonucleotídeos específicos para os genes (Tabela 1) quanto utilizando o oligonucleotídeo SUMO F. Este oligonucleotídeo está presente no vetor pET SUMO, amplificando uma pequena porção, cerca de 100 pb, referente à proteína SUMO que está fusionada à região N-terminal do gene de interesse. As ampliações com este oligonucleotídeo permitiram verificar se o gene clonado estava na fase de leitura correta com o promotor.

Utilizando-se os oligonucleotídeos Vip5-Vip6 (Figura 5 – A) houve a amplificação do produto correspondente a 2370 pb, referente ao gene *vip3Aa42* (clones de 1 a 5) e gene *vip3Aa43* (clones de 6 a 10), nos 5 clones obtidos de cada gene. No entanto, quando utilizado os oligonucleotídeos SUMO F-Vip6 (Figura 5 – B), apenas os clones 2, 3, 4, e 5 amplificaram o produto de 2470 pb para o gene *vip3Aa42* e os clones 6, 8, 9 e 10 amplificaram o produto de 2470 pb para o gene *vip3Aa43*.

Os clones obtidos a partir do gene *cry1Ia10* foram amplificados utilizando-se dos oligonucleotídeos CryF-CryR (Figura 5 – C). Dos 5 clones obtidos, houve a amplificação do produto de 2160 pb referente ao gene nos clones 1, 2, 4 e 5. No entanto, quando utilizado os oligonucleotídeos SUMO F-CryR (Figura 5 – D), apenas os clones 1, 2 e 4 amplificaram o produto de 2260 pb referente ao gene.

Após analisar os resultados da amplificação por PCR dos clones, somente os que apresentaram amplificação utilizando o oligonucleotídeo SUMO F foram selecionados para os testes de expressão.

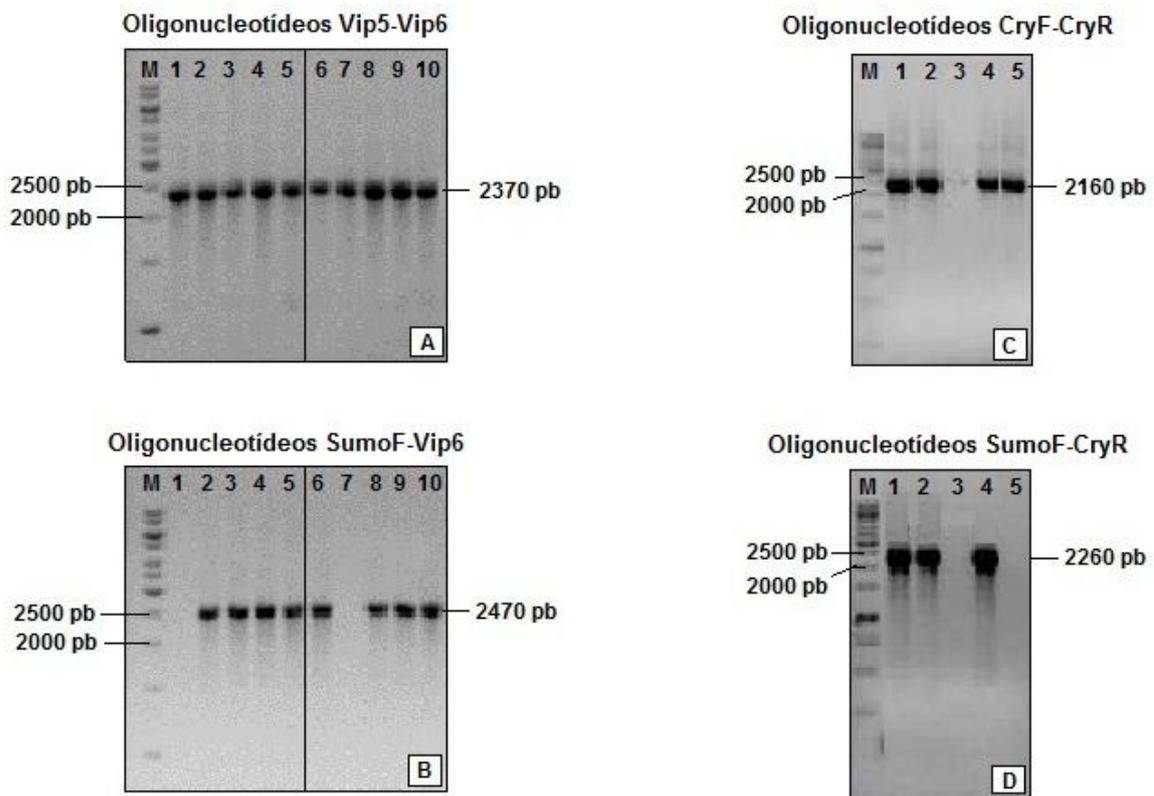


Figura 5. Eletroforogramas evidenciando a amplificação dos clones com os genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1la10* (A e C) e orientação correta de clonagem (B e D). M – Marcador Molecular “1 Kb DNA Ladder” (Thermo Scientific); A: 1 a 5 clones com o gene *vip3Aa42*; 6 a 10 clones com o gene *vip3Aa43*. B: 1 a 5 clones com o gene *vip3Aa42*; 6 a 10 clones com o gene *vip3Aa43*. C: 1 a 5 clones com o gene *cry1la10*. D: 1 a 5 clones com o gene *cry1la10*.

5.3. Indução da expressão dos genes *vip3Aa* e *cry1la10* e obtenção dos lisados proteicos

O teste de expressão foi realizado em quatro temperaturas diferentes, 16°C, 22°C, 30°C e 37°C. Foi possível observar a expressão das proteínas Vip3Aa em aproximadamente 101,5 kDa e a expressão da proteína Cry1la10 em 94 kDa em todas as temperaturas testadas, no entanto, as proteínas apresentaram maior expressão no sobrenadante, de forma solúvel na temperatura de 22°C, sendo esta temperatura selecionada para todas as induções da expressão realizadas posteriormente.

Como o objetivo do trabalho era testar a toxicidade destas novas proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 para lagartas de lepidópteros-praga, o interesse era que estas proteínas estivessem sendo expressas na forma solúvel, pois caso se apresentassem em corpos de inclusão, a proteína poderia estar inativa, uma vez que estes corpos de inclusão são agregados densos de polipeptídeos sem conformação ou com conformação parcial. Isto seria indesejado no estudo, pois as proteínas de interesse teriam que ser renaturadas para apresentarem a conformação nativa, o que requer um extensivo processo de tentativa e erro (MIDDELBERG, 2002).

A expressão das proteínas recombinantes Vip3Aa42 e Vip3Aa43 foi confirmada pela presença de uma banda de massa molecular de 101,5 kDa, sendo 88,5 kDa da proteína Vip3Aa e 13 kDa referente à fusão na região N-terminal de um peptídeo contendo uma cauda com 6 histidinas (6XHis) e uma proteína SUMO, presente no vetor de expressão pET SUMO. A expressão da proteína recombinante Cry1Ia10 foi confirmada pela presença de uma banda de massa molecular de 94 kDa, sendo 81 kDa da proteína Cry1Ia10 e 13 kDa referente a um peptídeo contendo uma cauda com 6 histidinas e uma proteína SUMO (Figura 6).

Além dos genes de interesse, foi realizada também a indução de células de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot não transformadas, isto é, sem a presença do vetor pET SUMO + gene de interesse, nas mesmas condições de indução e extração das proteínas, sendo esta utilizada como controle negativo nos bioensaios.

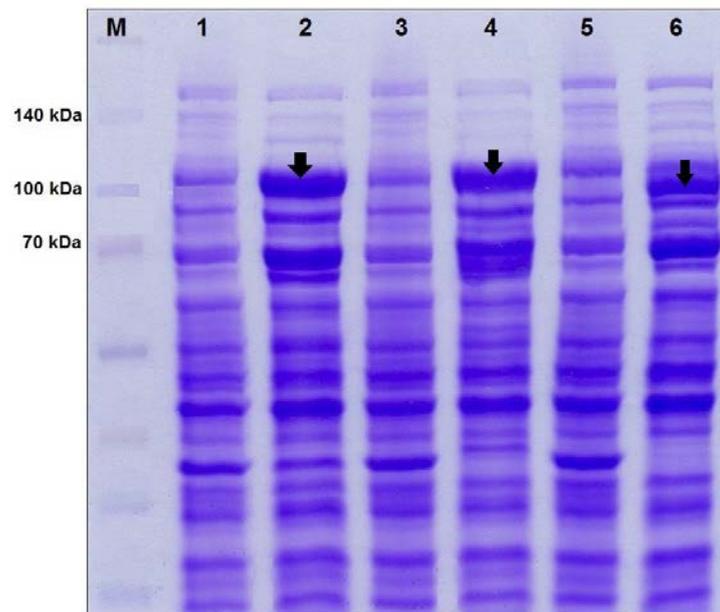


Figura 6. Gel de poli-acrilamida do lisado protéico dos clones de *E. coli*, portadores do vetor pET-SUMO com os genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1la10*, evidenciando a expressão das respectivas proteínas (indicada pelas setas). M - Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) em kDa; 1 - Gene *vip3Aa42* não induzido; 2 - Gene *vip3Aa42* induzido; 3 - Gene *vip3Aa43* não induzido; 4 - Gene *vip3Aa43* induzido; 5 - Gene *cry1la10* não induzido; 6 - Gene *cry1la10* induzido.

Autores analisando a expressão de genes relatam a presença de uma banda de 88,5 kDa referente à proteína Vip3A (ESTRUCH et al., 1996; ZHU et al., 2006; ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011) e de 81 kDa referente à proteína Cry1la (TOUNSI et al., 2003; ESCUDERO et al., 2006; DAMMAK et al., 2010), confirmando a correta expressão das proteínas em estudo.

5.4. Detecção das proteínas Vip3Aa e Cry1la10 por “Western blotting”

A técnica de “Western blotting” realizada confirmou a expressão das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1la10 recombinantes por meio do reconhecimento da cauda de histidina (6XHis) fusionada a região N-terminal da proteína, o que permitiu a reação com o “Anticorpo Monoclonal Anti-polyHistidine, Clone HIS-1” (Sigma-Aldrich). A expressão, evidenciada pela presença da banda, foi observada tanto nos lisados de *E. coli* portadores dos genes que foram induzidos com IPTG, quanto nos

lisados de *E. coli* portadores dos genes que não foram induzidos (Figura 7). A expressão basal dos genes na cultura não induzida se justifica pelo fato de ocorrer, mesmo na ausência de IPTG, uma indução ocasionada pela expressão da T7 RNA polimerase a partir do promotor *lacUV5*, presente na cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, utilizada como hospedeira para a expressão das proteínas (STUDIER; MOFFATT, 1986).

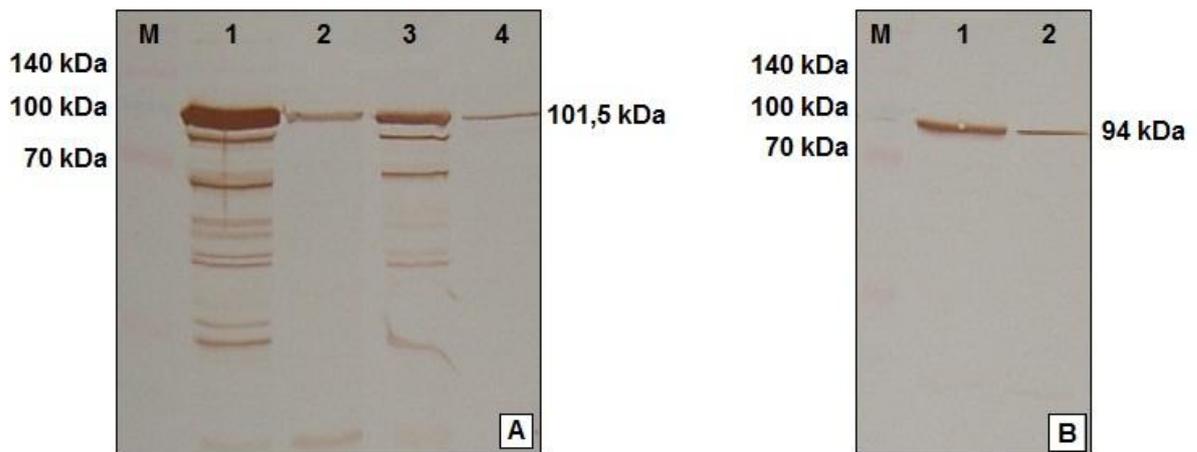


Figura 7. “Western blotting” dos lisados protéicos dos clones de *E. coli* portadores do vetor pET SUMO com os genes *vip3Aa42*, *vip3Aa43* e *cry1la10*. M - Marcador de massa molecular “Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific). A: 1 - Gene *vip3Aa42* induzido; 2 - Gene *vip3Aa42* não induzido; 3 - Gene *vip3Aa43* induzido; 4 - Gene *vip3Aa43* não induzido. B: 1 - Gene *cry1la10* induzido; 2 - Gene *cry1la10* não induzido.

5.5. Bioensaios com os lisados protéicos

Bioensaios com os lisados protéicos foram realizados e as concentrações letais médias estimadas (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração letal média das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 para lagartas neonatas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Espécie / Tratamento	CL ₅₀ (ng/cm ²) (IC min – max) ^a	CL ₉₀ (ng/cm ²) IC (min – max) ^a	b±erro-padrão ^b
<i>S. frugiperda</i>			
Vip3Aa42	78,2 (51,2 - 128,6)	862,8 (401,6 – 3563,1)	1,2 ± 0,1
Vip3Aa43	113 (86 - 162,3)	977,4 (539,8 – 2453,3)	1,3 ± 0,1
Cry1Ia10	-	-	-
<i>A. gemmatalis</i>			
Vip3Aa42	239,2 (172,7 – 356,7)	1725,2 (952,7 – 4564,7)	1,4 ± 0,1
Vip3Aa43	57,5 (36,1 – 89,1)	338 (186,2 – 1134,1)	1,6 ± 0,1
Cry1Ia10	246,2 (187,3 – 319,3)	1398,1 (977,5 – 2287,5)	1,7 ± 0,1
<i>H. virescens</i>			
Vip3Aa42	> 5000	-	-
Vip3Aa43	> 5000	-	-
Cry1Ia10	> 5000	-	-

^a Valores entre parênteses referem-se ao intervalo de confiança a 95% de probabilidade. ^b Coeficiente angular da reta.

Nos bioensaios realizados com *S. frugiperda*, a CL₅₀ estimada foi de 78,2 ng/cm² para Vip3Aa42 e de 113 ng/cm² para Vip3Aa43, no entanto, observando-se o intervalo de confiança (IC), verifica-se que as proteínas foram igualmente efetivas para este inseto, visto que, os valores do intervalo de confiança se sobrepõem. Figueiredo et al. (2013) realizaram ensaios com a proteína Vip3Aa50 e utilizando a mesma população de *S. frugiperda* estimaram uma CL₅₀ de 79,6 ng/cm².

Em bioensaios realizados por Caccia et al. (2014) a toxicidade da proteína Vip3Aa16 foi testada para lagartas neonatas de *S. frugiperda* e apresentou CL₅₀ de 24 ng/cm². A proteína Vip3Aa tem se apresentado altamente tóxica para lagartas neonatas de *S. frugiperda*, sendo esta toxicidade superior ao das proteínas Cry1, conforme resultados obtidos por Sena et al. (2009), em que a proteína Vip3Aa1 foi testada em *S. frugiperda* e apresentou CL₅₀ de 49,3 ng/cm², enquanto as proteínas Cry1Ab e Cry1Fa apresentaram CL₅₀ de 867 ng/cm² e 170 ng/cm², respectivamente.

A proteína Cry1Ia10 não apresentou toxicidade para a população de *S. frugiperda* testada, mesmo quando doses de até 10.000 ng/cm² foram utilizadas. Escudero et al. (2006) testaram altas doses de uma proteína pertencente à família Cry1Ia (Cry1Ia7) e esta não apresentou toxicidade a população de *S. frugiperda*. Em

ensaios realizados por Grossi-de-Sá et al. (2007), a toxicidade da proteína Cry1Ia12, expressa em *E. coli* e purificada, foi testada para lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda* e apresentou moderada toxicidade. Altas concentrações da proteína (5 µg/mL) foram utilizadas para alcançar a toxicidade máxima para a lagarta.

No entanto, em ensaios realizados por Bergamasco et al. (2013), a mesma proteína Cry1Ia10 foi testada para outra população de *S. frugiperda* e obtiveram CL₅₀ de 69,52 ng/cm².

A diferença de suscetibilidade encontrada para diferentes populações ocorre porque populações de insetos possuem variação genética natural que afetam a resposta a uma toxina, com alelos conferindo suscetibilidade e outros conferindo resistência (BERNARDI et al., 2011).

Para *A. gemmatalis* as proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 apresentaram CL₅₀ de 239,2 ng/cm², 57,5 ng/cm² e 246,2 ng/cm², respectivamente. Estes resultados demonstram que a proteína Vip3Aa43 é quatro vezes mais tóxica para esta lagarta. As proteínas Vip3Aa42 e Cry1Ia10 apresentaram-se igualmente efetivas em nível de CL₅₀ e CL₉₀.

Ensaio realizado por Figueiredo et al. (2013) com a proteína Vip3Aa50 também demonstraram que lagartas neonatas de *A. gemmatalis* são altamente suscetíveis às proteínas Vip3Aa, uma vez que a CL₅₀ estimada foi de 20,3 ng/cm². Criallesi-Legori et al. (2014) realizando ensaios com as proteínas Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af obtiveram CL₅₀ de 5,4 ng/cm², 5,0 ng/cm² e 3,6 ng/cm², respectivamente. Os autores também testaram a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea para esta lagarta demonstrando alta suscetibilidade desta às proteínas Cry1.

Em ensaios realizados por Martins et al. (2008) a toxicidade da proteína Cry1Ia, obtida da estirpe brasileira de *B. thuringiensis* S1451, foi testada para *A. gemmatalis*. No entanto, esta lagarta não apresentou suscetibilidade à proteína.

Analisando a toxicidade das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 concluiu-se que a proteína Vip3Aa42 foi três vezes mais efetiva para *S. frugiperda* em nível de CL₅₀ quando comparada a *A. gemmatalis* e igualmente efetiva para as duas espécies em nível de CL₉₀. A proteína Vip3Aa43 apresentou-se igualmente efetiva

para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* tanto em nível de CL_{50} como em CL_{90} . E a proteína Cry1Ia10 apresentou-se efetiva somente para *A. gemmatalis*

As proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 foram testadas para lagartas neonatas de *H. virescens*, no entanto, esta população apresentou baixa suscetibilidade às três proteínas, uma vez que não foi possível obter a concentração letal média mesmo utilizando as proteínas em concentrações acima de 5.000 ng/cm². Lemes et al. (2014) testaram a toxicidade da proteína Vip3Aa e obtiveram CL_{50} de 1.650 ng/cm², o que evidencia que estas populações não apresentam alta suscetibilidade às proteínas Vip3Aa quando comparadas com os outros insetos testados, no entanto, quando comparada com proteínas Cry1Aa e Cry1Ca a proteína Vip3Aa foi mais efetiva, uma vez que as CL_{50} estimadas para as Cry1 foram de 3.500 ng/cm² e 3.100 ng/cm², respectivamente. Já quando comparada com a proteína Cry1Ac, cuja CL_{50} foi de 40 ng/cm², a proteína Vip3Aa apresentou-se 41 vezes menos tóxica a lagartas neonatas de *H. virescens*.

Em estudos realizados por Ali e Luttrell (2011) com lagartas neonatas de *H. virescens*, provenientes de três populações diferentes, a proteína Vip3Aa19 foi testada durante os anos de 2004 e 2005, e apresentou concentração letal média para as populações entre 22 e 109 ng/cm². Não foram encontrados dados de toxicidade de proteínas da família Cry1Ia para *H. virescens*.

A diferença entre as concentrações letais pode ser devido às diferentes fases larvais, metodologia de bioensaio e às populações distintas dessas espécies. Além disso, alterações mínimas nas sequências de aminoácidos das proteínas testadas podem alterar a toxicidade e especificidade destas. Estudos realizados por Liu et al. (2007) demonstraram que a proteína Vip3Aa19 possui similaridade de 97% com a proteína Vip3Aa11, apresentando diferença em apenas 19 resíduos de aminoácidos quando comparadas. A proteína Vip3Aa19 demonstrou toxicidade contra *S. exigua*, *H. armigera*, *P. xylostella* e baixa toxicidade para *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) enquanto que, a proteína Vip3Aa11 demonstrou toxicidade contra *S. exigua* e *H. armigera* e baixa toxicidade para *P. xylostella*.

Shen et al. (2009) em estudos realizados com as proteínas Vip3Aa26 e Vip3Aa27, que apresentam similaridade de 99%, com diferença em apenas 11 resíduos de aminoácidos, demonstraram que a proteína Vip3Aa27 foi altamente

tóxica para *T. ni*, *S. exigua* e *H. armigera*, já a proteína Vip3Aa26 apresentou toxicidade apenas para *T. ni*, o que confirma que alterações mínimas na sequências de aminoácidos podem alterar o espectro inseticida das proteínas.

5.6. Purificação e ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 com tripsina pancreática bovina e suco intestinal de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*

Após a análise da expressão em gel de poliacrilamida, os lisados protéicos, contendo as proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10, foram purificados utilizando colunas “HisTrap™ HP Columns” (GE Healthcare). Na purificação, não houve completo êxito, visto que as frações com maior concentração das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 contêm outras proteínas, sendo isso evidenciado pela presença de bandas (Figura 8). Isso pode indicar uma inespecificidade na ligação destas proteínas ao níquel da coluna, sendo desta forma, necessário a utilização de outros métodos de purificação ou emprego de colunas com outras características, como por exemplo, colunas de purificação por troca iônica para que a purificação seja total. Porém as purificações apresentaram-se suficientes para a continuação do experimento.

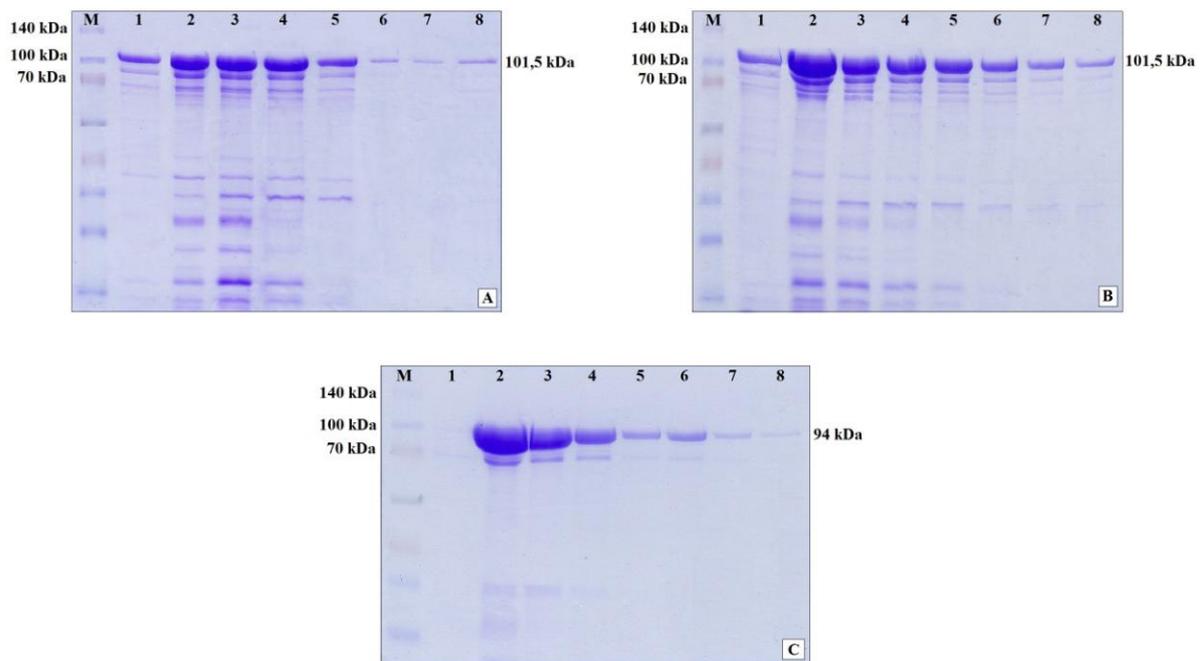


Figura 8. Géis de poliacrilamida das frações obtidas na purificação das proteínas Vip3Aa42 (A), Vip3Aa43 (B) e Cry1Ia10 (C). M - Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) em kDa. A: 1 a 8 – Frações da purificação da proteína Vip3Aa42. B: 1 a 8 – Frações da purificação da proteína Vip3Aa43. C: 1 a 8 – Frações da purificação da proteína Cry1Ia10.

A ativação das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa por tripsina é um passo essencial para que se possa determinar a atividade tóxica destas *in vitro*. Esse procedimento é feito para que se consiga reproduzir o evento de proteólise da protoxina em toxina ativa, que ocorre *in vivo* no lúmen do intestino médio das larvas. O processo de proteólise é essencial para a atividade das proteínas Vip e Cry devido à incapacidade dessas proteínas não processadas se unirem aos receptores presentes no intestino médio dos insetos-praga, passo esse, essencial para a toxicidade.

A ativação proteolítica das proteínas Vip3Aa de 101,5 kDa para um fragmento de aproximadamente 62 kDa ocorreu tanto por meio da ativação com tripsina pancreática bovina (Sigma-Aldrich), quanto pelo uso do suco intestinal dos insetos em estudo (Figura 9 - A e B). Esta ativação foi observada inclusive quando utilizado suco intestinal de *H. virescens* e, no entanto, não houve mortalidade, ou seja, não foi esta a etapa limitante. Estes resultados confirmam que a primeira etapa para a

atividade inseticida das proteínas Vip3Aa foi realizada, corroborando os estudos relativos à ativação da protoxina Vip3A realizados por Lee et al. (2003) e Caccia et al. (2014).

Nas proteínas Cry1Ia10, a ativação proteolítica do fragmento de 94 kDa para um fragmento de 50 kDa, ocorreu tanto por meio da ativação com tripsina pancreática bovina (Sigma-Aldrich), quanto pelo uso do suco intestinal dos insetos em estudo (Figura 9 - C). Esta ativação foi observada inclusive utilizando-se do suco intestinal de *S. frugiperda* e *H. virescens*, embora a proteína Cry1Ia10 não tenha apresentado toxicidade a estes insetos, o que sugere que a ativação não foi a etapa limitante.

Os resultados obtidos neste trabalho diferem-se dos resultados obtidos para outras proteínas da classe Cry1Ia. Em estudos realizados por Dammak et al. (2010) a ativação proteolítica da proteína Cry1Ia11 com tripsina e suco intestinal de *P. oleae*, acarretou na completa degradação desta proteína, no entanto, utilizando quimotripsina os autores obtiveram um fragmento de 70 kDa. Escudero et al. (2006) analisaram a proteína Cry1Ia7, onde após a digestão com tripsina, obtiveram um fragmento de 60 kDa, típico de proteínas Cry1 ativadas.

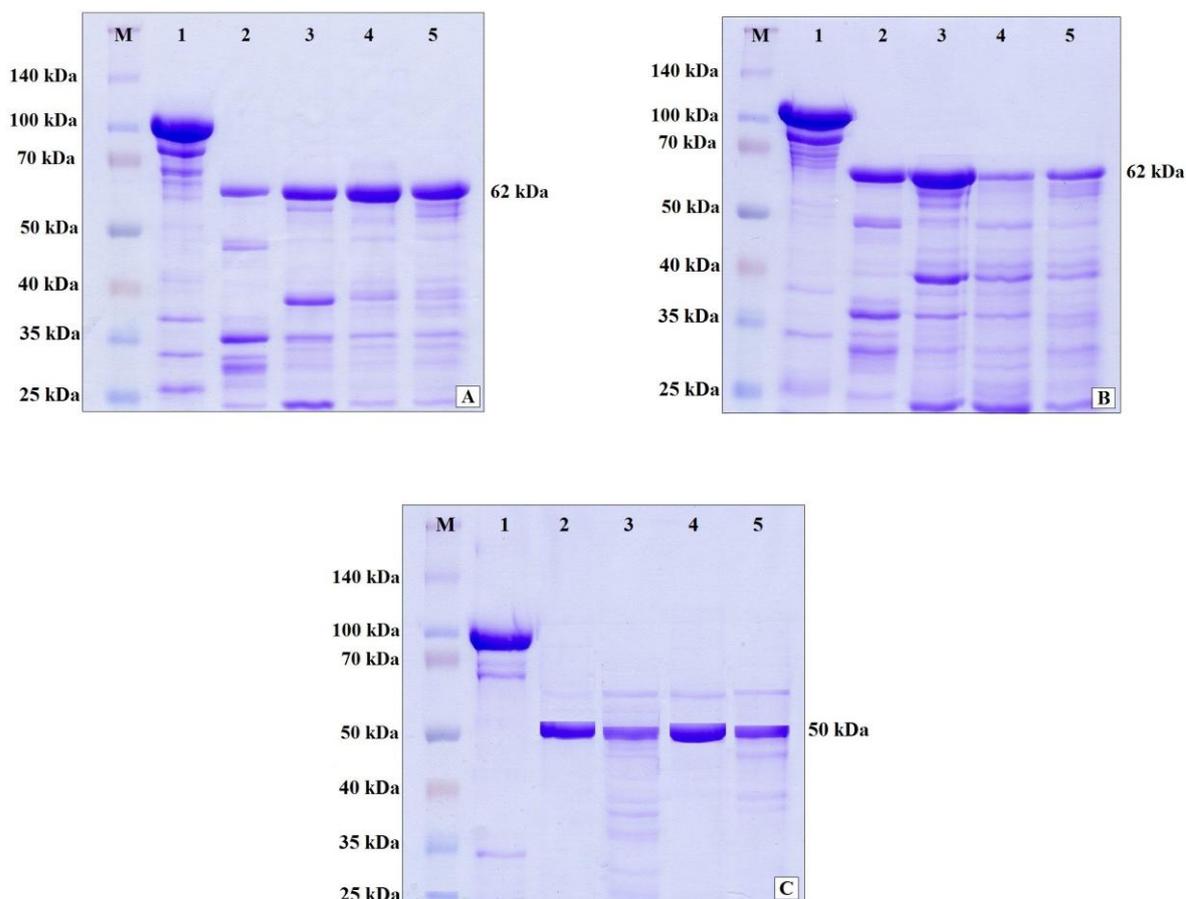


Figura 9. Géis de poliacrilamida da ativação das proteínas Vip3Aa42 (A), Vip3Aa43 (B) e Cry11a10 (C). M – Marcador de massa molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific) em kDa; 1 – Proteína purificada; 2 – Proteína ativada com Tripsina Pancreática Bovina (Sigma- Aldrich); 3 - Proteína ativada com suco intestinal de *S. frugiperda*; 4 - Proteína ativada com suco intestinal de *A. gemmatalis*; 5 - Proteína ativada com suco intestinal de *H. virescens*.

5.7. Marcação das proteínas ativadas com biotina

As toxinas ativadas com tripsina foram marcadas com biotina. A análise das membranas marcadas com as proteínas biotinizadas revelou a presença de bandas fortes com aproximadamente 62 kDa para Vip3Aa42 e Vip3Aa43 e de aproximadamente 50 kDa para Cry11a10, (Figura 10). Estes resultados demonstram que as proteínas se ligaram a biotina e mantiveram-se íntegras após passarem pelo processo de biotinilação.

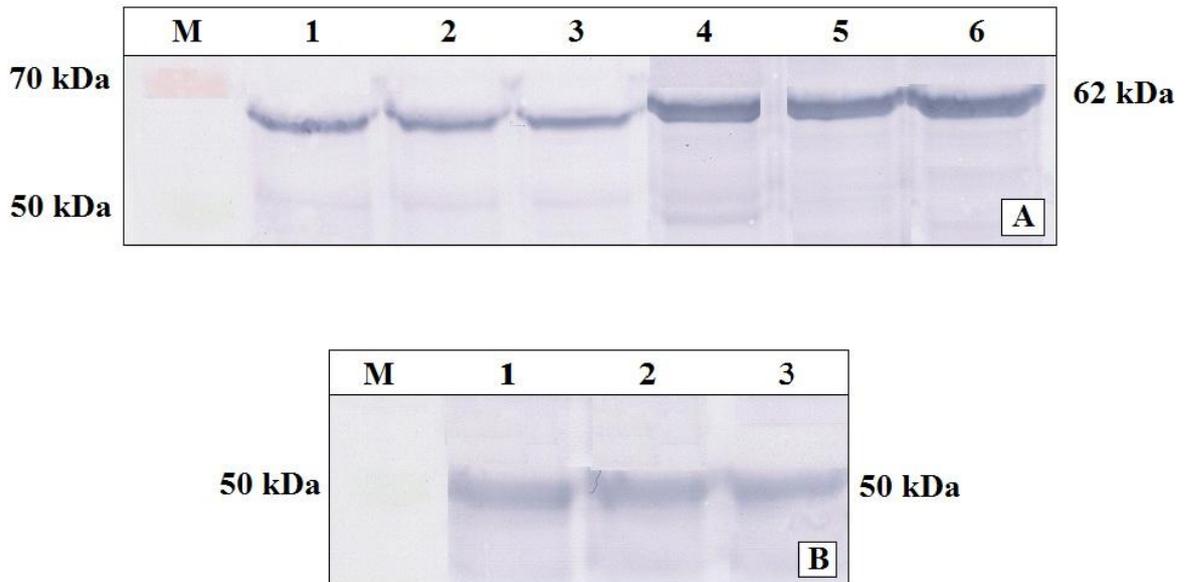


Figura 10. Membranas marcadas com proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 (A) e Cry1Ia10 (B) biotiniladas. M – Marcador de massa molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific) em kDa. A: 1 a 3 – Frações da proteína Vip3Aa42 biotinilada; 4 a 6 – Frações da proteína Vip3Aa43 biotinilada. B: 1 a 3 – Frações da proteína Cry1Ia10 biotinilada.

5.8. Retirada do intestino de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* e preparação das BBMV

Os intestinos de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* foram dissecados, BBMVs foram preparadas e analisadas em gel de poliacrilamida. Os resultados observados no gel demonstraram que os perfis protéicos das BBMVs encontravam-se íntegros para os ensaios de ligação (Figura 11).

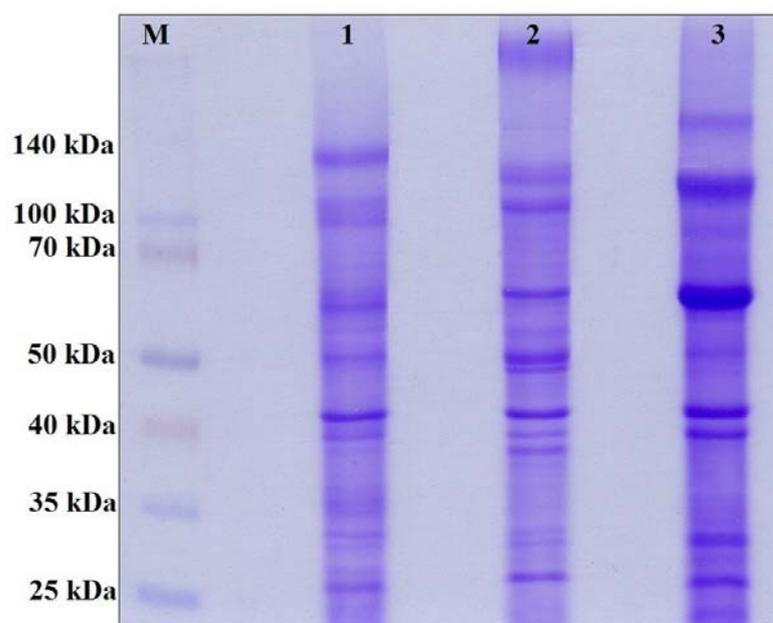


Figura 11. Gel de poliacrilamida das BBMV's preparadas a partir do intestino dos lepidópteros-praga. M – Marcador de massa molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific) em kDa; 1 BBMV de *S. frugiperda*; 2 – BBMV de *A. gemmatalis*; 3 – BBMV de *H. virescens*.

5.9. Ensaio de ligação e competição homóloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 as BBMV's de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*

Ensaio de ligação foram realizados incubando as proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 tripsinizadas e marcadas com biotina juntamente com BBMV's preparadas a partir do intestino médio de lagartas das três espécies estudadas. Na Figura 12 (Aa42, Aa43 e Ia10) é possível observar que ocorreu a ligação das proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 nas BBMV's dos insetos testados.

As proteínas Vip3Aa foram tóxicas para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, porém não apresentaram toxicidade para a população de *H. virescens* testada. E a proteína Cry1Ia10 apresentou toxicidade apenas para *A. gemmatalis* (Tabela 4). Contudo, houve a ocorrência de ligação das proteínas nos receptores presentes nas BBMV's das três espécies, indicando que, a ligação das proteínas aos receptores presentes na BBMV dos insetos é um passo necessário, porém, não suficiente para a toxicidade. O mesmo foi observado por Chakroun e Ferré (2014) que, realizando

ensaios de ligação de proteínas Vip3A marcadas radioativamente com ^{125}I a BBMV de *S. frugiperda*, observaram que a proteína Vip3Ad, embora não tenha sido tóxica para *S. frugiperda*, ligou-se aos receptores presentes na BBMV deste inseto.

Na competição homóloga com as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 foi possível observar a redução na ligação da proteína marcada (observada pela redução na intensidade da banda) quando utilizado 1.000 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina. No entanto, a redução na ligação da proteína marcada se torna mais evidente quando utilizado 2.000 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada para todas as espécies estudadas (Figura 12).

Análises de competições homólogas realizadas por Abdelkefi-Mesrati et al. (2011) com a proteína Vip3Aa16, demonstraram que esta proteína se liga de maneira específica aos receptores presentes nas BBMVs de *S. litoralis*, visto que, o aumento nas quantidades de proteína não marcada (excessos de 50, 100, 400 e 1.000 vezes) reduziu significativamente a ligação da proteína marcada.

Na competição homóloga com a proteína Cry1Ia10 foi possível observar que não ocorreu a ligação da proteína marcada (observada pela ausência da banda) quando utilizado 500 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina para todas as espécies estudadas (Figura 12). Sendo assim, não foram realizados os ensaios com 1.000 e 2.000 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina.

Ensaio de competição homóloga realizados por Bergamasco et al. (2013) com a mesma proteína Cry1Ia10 e BBMVs de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* demonstraram a especificidade da ligação da proteína aos receptores presentes na BBMVs das espécies estudadas uma vez que, a ligação da proteína marcada foi substancialmente reduzida quando em excesso de 200 vezes da proteína não marcada.

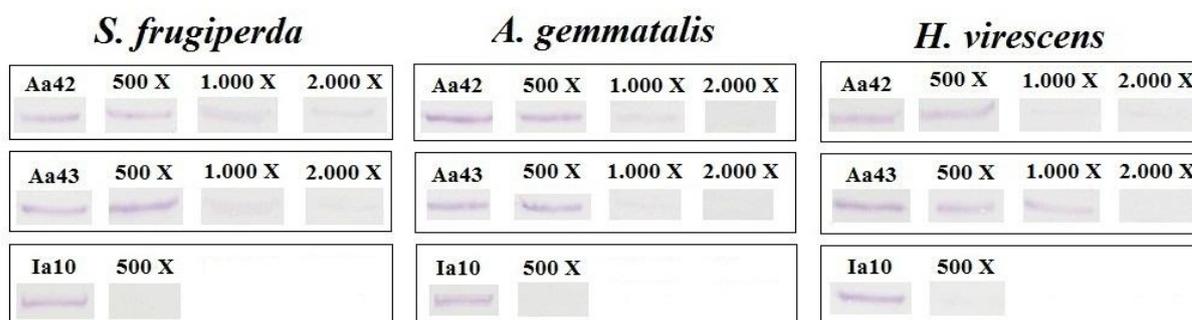


Figura 12. Ensaio de ligação e competição homóloga das proteínas Vip3Aa42 (Aa42), VipAa43 (Aa43) e Cry1Ia10 (Ia10) marcadas com biotina à BBMV de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*. 500X, 1.000X e 2.000X – Competição homóloga com 500X, 1.000X e 2.000 X de excesso da proteína não marcada.

A redução na ligação da proteína marcada, evidenciada pela diminuição na intensidade da banda quando a membrana é revelada com o substrato “BCIP/NBT Liquid Substrat System” (Sigma-Aldrich), ocorre quando os receptores são imediatamente ocupados pelas proteínas não marcadas, em excesso, impedindo a ligação da proteína marcada, a qual é eliminada pelas lavagens.

Segundo Chakroun e Ferré (2014), a redução na ligação da proteína marcada quando incubada com excesso de proteína não marcada confirma que há a ocorrência de um número limitado de receptores, que podem ser saturados adicionando um excesso de proteína não marcada.

Desta forma, o resultado apresentado no presente trabalho torna-se um indicativo de que existe um grande número de receptores para as proteínas Vip3Aa presentes nas BBMV dos insetos testados e que, a necessidade de uma alta concentração (2.000 vezes) de proteína homóloga não marcada para saturar os sítios receptores impedindo a ligação da proteína marcada, pode ocorrer devido a interações inespecíficas das proteínas Vip3Aa às BBMV de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Já para a proteína Cry1Ia10 a ligação aos receptores presentes nas BBMV de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, quando comparada com as proteínas Vip3Aa apresenta-se mais específica visto que, a presença do competidor homólogo em excesso de 500 vezes já foi suficiente para que não ocorresse a ligação da proteína marcada com biotina.

5.10. Ensaio de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 as BBMV de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*

Os ensaios de competição heteróloga foram realizados baseados nos resultados de mortalidade estimados, onde para *S. frugiperda* foram realizados ensaios de competição entre as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43, visto que, somente as proteínas Vip3Aa apresentaram toxicidade para esta lagarta (Tabela 4).

A competição heteróloga foi realizada incubando a proteína Vip3Aa42 tripsinizada e marcada com biotina juntamente com BBMV's preparadas a partir do intestino médio de *S. frugiperda* com excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes de proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina.

Neste ensaio foi possível observar uma grande redução na ligação da proteína Vip3Aa42 marcada (observada pela redução na intensidade da banda) quando utilizado 500 vezes de excesso de proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina. Quando utilizado 1.000 vezes de excesso da proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada, não houve ligação da proteína marcada (observada pela ausência de banda) (Figura 13). Sendo assim, não foi realizado o ensaio com 2.000 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina.

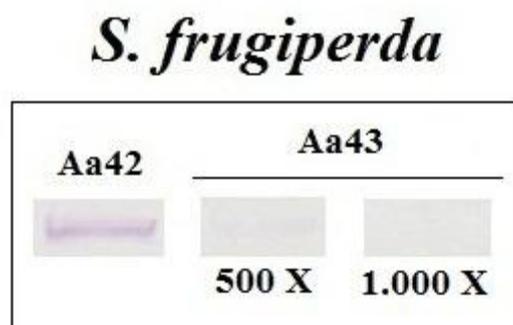


Figura 13. Ensaio de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa42 e VipAa43 à BBMV de *S. frugiperda*. Aa42 – Ligação da proteína Vip3Aa42 marcada com biotina à BBMV; Aa43 – Competidora heteróloga Vip3Aa43 não marcada, em excesso de 500X, 1.000X e 2.000X.

Estes resultados demonstram que as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 apresentam grande similaridade em suas sequências de aminoácidos e compartilham o mesmo receptor presente na BBMV de *S. frugiperda*. Resultados similares foram apresentados por Sena et al. (2009), que realizando ensaios de competição heteróloga entre as proteínas Vip3Aa e Vip3Af, observaram que estas proteínas, embora de subclasses diferentes (Aa e Af), compartilham o mesmo receptor em BBMVs de *S. frugiperda*.

Chakroun e Ferré (2014) demonstraram em ensaios de competição heteróloga a redução na ligação da proteína Vip3Aa marcada, quando utilizadas como competidoras as proteínas Vip3Ad, Vip3Ae e Vip3Af, indicando que estas proteínas compartilham o mesmo sítio de ligação no intestino médio de *S. frugiperda*, não sendo, desta forma, apropriada a combinação destas para a produção de plantas transgênicas piramidadas.

Os ensaios de competição para *A. gemmatalis* foram realizados entre as proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10, visto que estas proteínas apresentaram toxicidade para esta lagarta (Tabela 4).

A competição heteróloga foi realizada incubando a proteína Cry1Ia10 tripsinizada e marcada com biotina juntamente com BBMVs preparadas a partir do intestino médio de *A. gemmatalis* com excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 tripsinizadas e não marcada com biotina (Figura 14).

O resultado demonstrou que as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 não compartilham o mesmo receptor das proteínas Cry1Ia10 em *A. gemmatalis*, uma vez que mesmo utilizando concentrações de proteínas Vip3Aa em excessos de até 2.000 vezes não ocorreu à redução na ligação da proteína Cry1Ia10 marcada com biotina, sendo isso observado pela intensidade da banda, que não sofre alteração quando quantidades crescentes de proteína não marcada são adicionadas à reação.

Ensaio de competição heteróloga realizados por Bergamasco et al. (2013) demonstraram que o excesso de proteína Cry1Ia10 não marcada não reduziu a ligação da proteína Vip3Aa marcada, indicando que estas proteínas não competem pelo mesmo receptor no intestino médio de *S. frugiperda*, *Spodoptera albula* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858)

(Lepidoptera: Noctuidae), embora os receptores para as proteínas possam ser diferentes entre as três espécies. Já para *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae), os autores relatam que, a proteína Cry1Ia10 em excesso reduziu a ligação da proteína Vip3Aa marcada indicando uma competição parcial entre as proteínas nos receptores deste inseto. Fato este, não detectado no presente estudo, corroborando os demais estudos de que as toxinas Vip e Cry não competem para o mesmo sítio receptor na maioria dos insetos lepidópteros estudados até o momento.

Em ensaios de competição heteróloga utilizando BBMV's de *Earias insulana* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Nolidae) e *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1755) (Lepidoptera: Tortricidae), Escudero et al. (2006) demonstraram que a proteína Cry1Ia7, não compartilha o mesmo sítio receptor no intestino médio destes insetos, com as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac que são encontradas em cultivares transgênicos e bioinseticidas comerciais à base de Bt.

Também foi realizado um ensaio de competição heteróloga incubando a proteína Vip3Aa42 tripsinizada e marcada com biotina juntamente com BBMV's preparadas a partir do intestino médio de *A. gemmatalis* com excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes da proteína Vip3Aa43. Os resultados demonstraram que, assim como ocorre em *S. frugiperda*, as proteínas Vip3Aa competem pelo mesmo sítio de ligação no intestino médio de *A. gemmatalis*.

Foi possível observar uma grande redução na ligação da proteína Vip3Aa42 marcada (observada pela redução na intensidade da banda) quando utilizado 500 vezes de excesso de proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada com biotina. No entanto, quando utilizado 1.000 vezes de excesso da proteína Vip3Aa43 tripsinizada não marcada, não houve qualquer ligação da proteína marcada (observada pela total ausência de banda) (Figura 14). Sendo assim, não foi realizado o ensaio com 2.000 vezes de excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina.

A. gemmatalis

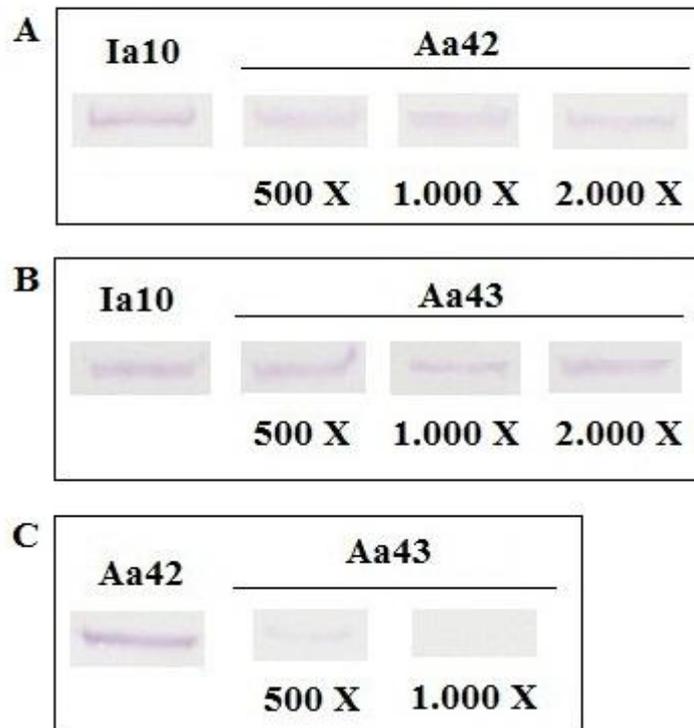


Figura 14. Ensaio de competição heteróloga das proteínas Vip3Aa42, VipAa43 e Cry1Ia10 à BBMVs de *A. gemmatalis*. A: Ia10 – Ligação da proteína Cry1Ia10 marcada com biotina à BBMVs; Aa42 – Competidora heteróloga Vip3Aa42 não marcada, em excesso de 500X, 1.000X e 2.000X. B: Ia10 – Ligação da proteína Cry1Ia10 marcada com biotina à BBMVs; Aa43 – Competidora heteróloga Vip3Aa43 não marcada, em excesso de 500X, 1.000X e 2.000X. C: Aa42 – Ligação da proteína Vip3Aa42 marcada com biotina à BBMVs; Aa43 – Competidora heteróloga Vip3Aa43 não marcada, em excesso de 500X e 1.000X.

Ensaio de competição heteróloga entre diferentes proteínas Vip e Cry têm sido realizados por vários pesquisadores (LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; LIU et al., 2011; BERGAMASCO et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013) na busca por novas combinações de proteínas, que apresentem alta toxicidade e diferentes sítios de ligação no intestino médio dos insetos-praga, possibilitando assim a construção de plantas transgênicas piramidadas, na tentativa de driblar o desenvolvimento de populações de insetos resistentes.

Trabalho realizado por Sena et al. (2009) demonstrou que, no intestino médio de *S. frugiperda*, as toxinas Cry1 e Vip3A ocupam sítios receptores distintos, e que a proteína Cry1Fa ocupa o mesmo sítio receptor que Cry1Ab, ao mesmo tempo em que Vip3Af1 e Vip3Aa1 competem pelo mesmo receptor, sugerindo portanto, a combinação de uma Cry1 com uma Vip3, as mais efetivas, na piramidação de plantas de milho, por exemplo, visando o controle da lagarta-do-cartucho.

Gouffon et al. (2011) demonstraram a especificidade da ligação da proteína Cry2Ae, marcada radioativamente, nos sítios receptores presente nas BBMV's de *H. virescens*, *H. zea* e *H. armigera*. E em ensaios de competição com as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Vip3A e Cry2Ab, os autores relataram que as proteínas Cry2Ae e Cry2Ab compartilham o mesmo sítio receptor, no entanto, este receptor é diferente dos receptores das proteínas Cry1 e Vip3A. Estes resultados sugerem a possibilidade de piramidação de plantas com uma das Cry2A, uma Cry1 e a Vip3A no controle das referidas pragas na tentativa de impedir possível surgimento de resistência às toxinas por parte destes insetos, visto que a probabilidade seria menor de se ter uma alteração nos três diferentes sítios receptores, ao mesmo tempo, que pudesse levar à total resistência destas pragas. Se houvesse a alteração em um dos sítios, ainda assim, haveria o controle das mesmas pelas plantas piramidadas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a combinação da proteína Cry1Ia10 com as proteínas Vip3Aa42 ou Vip3Aa43 seria uma excelente alternativa na formulação de bioinseticidas, assim como na construção de plantas transgênicas visando o controle de *A. gemmatilis*, pois, além de apresentarem alta toxicidade para esta lagarta, as proteínas não competem pelo mesmo sítio receptor no intestino médio desta. Sendo assim, a obtenção de uma planta transgênica expressando as proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa poderia postergar o desenvolvimento de populações de *A. gemmatilis* resistentes.

Porém a eficácia de uma mistura não é estimada com base na eficácia dos componentes individuais, mas com base no estudo de sinergismo entre eles (BLISS, 1939). Neste sentido, bioensaios com as proteínas combinadas seriam indicados para as análises de sinergismo e antagonismo entre as proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa42 ou Vip3Aa43.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 apresentam toxicidade à população de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*;
- A proteína Cry1Ia10 apresenta toxicidade à população de *A. gemmatalis*;
- A população de *H. virescens* não foi suscetível às proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10;
- As proteínas Vip3Aa42, Vip3Aa43 e Cry1Ia10 se ligam aos receptores presentes nas BBMV's de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*;
- Os ensaios de ligação às BBMV's demonstraram que há correlação entre a toxicidade e a união aos receptores apenas nas lagartas *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. Para *H. virescens* não houve relação entre a toxicidade e a união aos receptores;
- A combinação das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa42 ou Vip3Aa43 seria indicada para a produção de bioinseticidas, ou plantas transgênicas piramidadas visando contornar possível surgimento de resistência de populações de *A. gemmatalis* às toxinas Bt.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELKEFI-MESRATI, L. A.; ROUIS, S.; SELLAMI, S.; JAOUA, S. *Prays oleae* Midgut Putative Receptor of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3LB Differs from that of Cry1Ac Toxin. **Mol. Biotechnol.**, Totowa, n. 43, p. 15–19, 2009.
- ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 106, n. 2, p. 250-254, 2011.
- AFONSO, A. P. S.; WREGGE, M.; MARTINS, J. F. da S.; NAVA, D. E. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 76, p. 607-612, 2009.
- ALI, M. I.; LUTTRELL, R. G.; Susceptibility of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 108, p. 76-84, 2011.
- ALMEIDA, R. P.; SILVA, C. A. D.; RAMALHO, F. S. Manejo Integrado de Pragas do Algodão. In: NAPOLEÃO, E. M. B.; DEMÓSTENES, M. P. A. (Org.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. v. 2. p. 1034-1098, 2008.
- ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. **J. Cell. Sci.**, London v. 114, n. 4, p. 629-641, 2001.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L.; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron. J. Biotechn.**, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, v. 3, n. 1. p. 40-65, 2000.
- BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 112, p. 152-158, 2013.
- BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES, J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry1Ia* gene in *Escherichia coli* with Strong Activity Against Cotton Pests. **Aust. J. Basic. Appl. Sci.**, Pakistan, v. 5, n. 12, p. 526-533, 2011.
- BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. de. (Org.). **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. v. 1, p. 181-207.

BLISS, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. **Ann. Appl. Biol.**, Warwick, v. 26, p. 585-615, 1939.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Ann. Biochem.**, Palo Alto, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use. **Comprehensive Mol. Insect Sci.**, Amsterdam, n. 6, p. 175-206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of the action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxicon.**, Elmsford, n. 49, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; GOMEZ, L.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1667, p. 38-46, 2004.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R.; Characterization of *cry* genes in mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965 - 4972, 1998.

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

CACCIA, S.; CHAKROUN, M.; VINOKUROV, K.; FERRÉ, J.; Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins by two *Spodoptera* species. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 67, p. 76-84, 2014.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. *In vivo* and *in vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by ¹²⁵I Radiolabeling. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v. 80, p. 6258-6265, 2014.

CHEN, J.; YU, J.; TANG, L.; TANG, M.; SHI, Y.; PANG, Y. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 95, n. 2, p.310–316, 2003.

CHOI, S. K.; SHIN, B. S.; KONG, E. M.; RHO, H. M.; PARK, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* Cry1I-type crystal protein gene. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 41, p. 65-69, 2000.

COSTA, M. A. G.; GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; COSTA, E. C.; STORCH, G.; STEFANELLO JÚNIOR, G. J. Eficácia de diferentes inseticidas e de

volumes de calda no controle de *Spodoptera frugiperda* nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 1234-1242, 2005.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, A. O.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 49, p. 79-87, 2014.

CRICKMORE N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H.; ***Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature** Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 5 jan. 2014.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, New York, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

DAMMAK, M; TOUNSI, S.; ROUIS, S. E JAOUA, S. Comparative study of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia and Cry1Aa delta-endotoxins: activation process and toxicity against *Prays oleae*. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 104, n. 1, p. 39-43, 2010.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from espore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

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

DOSS, V. A. Binding affinity and larvicidal activity of a novel vegetative insecticidal protein Vip3V. **Trop. Biomed.**, Kuala Lumpur, n. 26, v. 3, p. 334-340, 2009.

DOSS, V. A.; ANUP KUMAR, K.; JAYAKUMAR, R.; SEKAR, V. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Express Purif**, Orlando, v. 26, p. 82-88, 2002.

DUHRUA, S.; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the Pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera; Gelechiidae), from India. **Pest Manag Sci**, Sussex, v. 67, n.8, p. 898-903, 2011.

ESCUADERO, I. R.; ESTELA, A.; POCAR, M., MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J. A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4796-4804, 2006.

ESPINDOLA, R. **Sequência completa do gene *cry11a* do isolado T 01 328 de *Bacillus thuringiensis* proveniente do solo de Cubatão (SP-Brasil)**. 2003. 55f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

FERNANDEZ, L. E.; AIMANOVA, K. G.; GILL, S. S.; BRAVO, A. SOBERÓN, M. GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.**, London, v. 394, p. 77-84, 2006.

FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; BEL, Y.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 132, p.1-7, 1994.

FERRÉ, J.; REAL, M. D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 88, p. 5119-5123, 1991.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Ver. Entomol.**, Palo Alto, v. 47, p. 501-533, 2002.

FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene *vip3A* e toxicidade da proteína Vip3Aa50 à lagarta-do-cartucho e à lagarta-da-soja. **Pesqu. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1220-1227, 2013.

FIGUEIREDO, M. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Efeito do inseticida clorpirifos e sua interação com inimigos naturais na supressão de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Rev. Bras. Milho Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, p. 325-339, 2006.

FORCADA, C.; ALCACER, E.; GARCERA, M. D. TATO, A.; MARTINEZ, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strain of *Heliothis virescens*; proteolytic and SEM study of larval midgut. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 42, p. 51-63, 1999.

FORCADA, C.; ALCACER, E.; GARCERA, M. D.; MARTINEZ, R. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, New York, v. 31, p. 257-272, 1996.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-evolved resistance to *Bt* maize by Western Corn Rootworm. **PLOS One.**, San Francisco, v. 6, n. 7, e22629, 2011.

GIOLO, F. P.; BUSATO, G. R.; GARCIA, M. S.; MANZONI, C. G.; BERNADI, O.; ZART, M. Biologia de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. **Rev. Bras. Agrociênc.**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 167-171, 2006.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1b toxin. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 513, p. 242-246, 2002.

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 77, n. 10, p.3182-3188, 2011.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **J. Econ. Entomol.**, Lanham, n. 88, p. 1545-1559, 1995.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GRIFFITTS, J. S.; HASLAM, S. M.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S. F.; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER, P. S.; DELL, A.; ADANG, M. J.; AROIAN, R. V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, Washington, v. 307, n. 5711, p. 922-925, 2005.

GRIFFITTS, J. S.; AROIAN, R. V. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **BioEssays**, Cambridge, v. 27, p. 614-624, 2005.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MAGALHÃES, M. Q.; SILVA, M. S.; SILVA, S. M. B.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y. T.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R.; NETO, O. B. O.; OLIVEIRA, R. S.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z.; SIQUEIRA, H. A. A.; FIGUEIRA, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **J. Biochem. Mol. Biol.**, Seoul, v. 40, n. 5, p. 773-782, 2007.

GUNNING, R. V.; DANG, H. T.; KEMP, F. C.; NICHOLSON, I. C.; MOORES, G. D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crop expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, n. 71, p. 2558-2563, 2005.

GUO, S.; ZHANG, C.; LIN, X.; ZHAN, Y.; HE, K.; SONG, F.; ZHANG, J. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Protein Express. Purif.**, Orlando, v. 78, p. 204-208, 2011.

GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 188, p. 7-13, 2000.

HAMADOU-CHARFI, D. B.; BOUKEDI, H.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 114, n. 2, p. 139-143, 2013

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; BAXTER, S. W.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B. E. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 95, n. 3; p. 19-197, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **J. Invertebr. Pathol.**, San Diego, v. 113, p. 78-81, 2013.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.107, p. 219-225, 2009

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P. L.; MOAR, W. J.; DE MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 96, 2005.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: EMBRAPA Soja 2000, 70p. (Circular Técnica, 30).

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.; Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 53, p. 242 - 255, 1989.

JACKSON, R. E.; MARCUS, M. A.; GOULD, F.; BRADLEY JUNIOR, J. R.; VAN DUYN, J. W.; Cross-resistance responses of cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A. **J. Econ. Entomol.**, Lanham, v. 100, n. 1, p.180-186, 2007.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 271, n. 15, p. 3127-3135, 2004.

LAGNAOUI, A.; CAÑEDO, V.; DOUCHES, D.S. Evaluation of *Bt-cry1Ia1(cryV)* transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. **CIP Program Report 1999 – 2000**, p. 117–121, 2001.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, Amsterdam, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LEMES, A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; FERNANDES, A. O.; FERRÉ, J.; LEMOS, M. V. F.; DESIDERIO, J. A. Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS One**, San Francisco, v. 9, p. 1-8, 2014.

LEUBER, M.; ORLIK, F.; SCHIFFLER, B.; SICKMANN, A.; BENZ, R. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. **Biochem.**, New York, v. 45, p. 283-288, 2006.

LIMA JR, I. S.; DEGRANDE, P. E.; MELO, E. P.; BERTONCELLO, T. F.; SUEKANE, R. Infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado. **Rev. Agrarian.**, Dourados, v. 5, n. 15, p. 14-19, 2012.

LIU, J.; SONG, F.; ZHANG, J.; LIU, R.; HE, K.; TAN, J.; HUANG, D.; Identification of vip3A-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. **Let. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 45 p. 432–438, 2007.

LIU, J.; YANG, A.; SHEN, X.; HUA, B.; SHI, G. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation. **J. Invertebr. Pathol.**, Orlando, v. 108, p. 92-97, 2011.

LIU, K. Y.; ZHENG, B. L.; HONG, H. Z.; JIANG, C. F.; PENG, R.; PENG, J. X.; YU, Z. H.; ZHENG, J.; YANG, H. Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **In Vitro Cell. Biol. Dev-An.**, Columbia, v. 40, p. 312-317, 2004.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T.; SANTOS, C. G.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 269-277, 2002.

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

MARUCCI, S. C. **Seleção e caracterização de novos genes vip3A: genes inseticidas de segunda geração de *Bacillus thuringiensis***. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.

MCNALL, R. J.; ADANG, M. J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, Amsterdam, v. 33, n. 10, p. 999-1010, 2003.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.. **Controle biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v. 2, 388p.

MIDDELBERG, A. P. Preparative protein refolding. **Trends Biotechnol.**, London, v. 20, n. 10, p. 437-443, 2002.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, I. B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C.; Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biol. Control**, Orlando, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

NEPPL, C. C.; **Management resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. 2001. 35f. Thesis, University of Chicago, Chicago, 2001.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA – FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil – parasitóides e predadores**. Piracicaba: Ed. Manole, 2002. 609p.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007. 2007.

PRAÇA, L. B.; NETO, P. S.; MONNERAT, R. G. ***Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) biologia, amostragem e métodos de controle**. Embrapa Brasília: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 17p. (Boletim de Pesquisa, 196).

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R.; Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 10 p. 6276-6281, 2005.

RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M., ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W. F. **O impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade**. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1991. 93 p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual** 3 ed, New York: Cold Spring Harbor, 250p. 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, D.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H.; *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SELVAPANDIYAN, A; ARORA, N; RAJAGOPAL, R.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; SINGH, S. P.; BHATNAGAR, R. K. Toxicity Analysis of N- and C-Terminus-Deleted Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5855-5858, 2001.

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; FERRÉ, J.; Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SHEN, J.; HOU, M.; GUO, W. Identification and cloning of *vip3A* genes from isolates of *Bacillus thuringiensis* and their bioactivity analysis. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 49, p. 110-116, 2009.

SINGH, G., SACHDEV, B., SHARMA, N., SETH, R., BHATNAGAR, R. K. Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 76, n. 21, p. 7202–7209, 2010.

SOBERON, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

SONG, F. P.; ZHANG, J.; GU, A. X.; WU, Y.; HAN, L. L.; HE, K. L.; CHEN, Z. Y.; YAO, J.; HU, Y. Q.; LI, G. X.; HUANG, D. F. Identification of cry1I-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cry1I-type gene. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, p. 5207-5211, 2003.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **J. Econ. Entomol.**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STUDIER F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, London, v. 189, p.113-130, 1986. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Method. Enzymol.**, Amsterdam, v. 185, p. 60-89, 1990.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 39, p. 47-79, 1994.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops; evidence versus theory. **Nat. Biotechnol.**, London, n. 26, p. 199-202. 2008.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nat. Biotechnol.**, London, n. 29, p. 1128-1131, 2011.

TAILOR, R. J. ; TIPPET, J. ; GIBB, G. ; PELLIS, S. ; PIKE, D. ; JORDAN, L. ; ELY, S. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 1211-1217. 1992.

TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1la*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 95, p. 23–28, 2003.

TOWBIN, H.T., STAEHETIN.A., GORDON, J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALAITIS, A. P.; JENKINS, J. L.; LEE, M. K.; DEAN, D. H.; GARNER, K. J. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. **Arch. Insect Biochem.**, New York, v. 46, p. 186–200, 2001.

VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX (Ed.), Entomopathogenic bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publications, 2000. p. 219-237.

WANG, P.; ZHAO, J. Z.; RODRIGO-SIMÓN, A.; KAIN. W.; JANMAAT, A. F; SHELTON, A. M.; FERRÉ, J.; MYERS, J. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1199-1207, 2007.

WAQUIL, J. M. **Manejo fitossanitário e ambiental: milho transgênico Bt e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho.** 2007. Disponível em:

<http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/manfito/index.htm>. Acesso em: 5 jan. 2015.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: CAROZZI, N.B.; KOZIEL, M. (Ed.). **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylors and Francis, 1997. p. 109-121.

WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F.V.; GIORDANA, B.; HANOZET, M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comp. Biochem. Physiol.**, London, v. A86, p. 301-308, 1987.

XIE, R.; ZHUANG, M.; ROSS, L.S.; GOMEZ, I.; OLTEAN, D.I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, p. 8416-8425, 2005.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H.; Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. **Entomopathogenic bacteria**. Amsterdam: Kluwer Academic Publications, 2000. p. 81-100.

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

ZHU, C.; RUAN, L.; PENG, D.; YU, Z.; SUN, M. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 109-114, 2006.