



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Saúde Coletiva

Mestrado em Saúde Pública

Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Henrique de Barros Moreira Beltrão

Recife, 2006

HENRIQUE DE BARROS MOREIRA BELTRÃO

Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública, área de Controle de Endemias e Métodos de Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

Departamento de Entomologia, CpqAM - FIOCRUZ

Recife, 2006

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública

Dissertação de Mestrado

Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Henrique de Barros Moreira Beltrão

Comissão Examinadora

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha
CPqAM/FIOCRUZ (Orientadora)

Dr. André Freire Furtado
CPqAM/FIOCRUZ, (Membro titular interno)

Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
LIKA/UFPE (Membro titular externo)

Dra. Valéria Rego Alves Pereira
CPqAM/FIOCRUZ (Membro suplente interno)

Dr. Diogo Ardaillon Simões
CCB/UFPE (Membro suplente externo)

Recife, 2006

Aos meus pais, Alúzio (in memoriam) e Nadilza, meus irmãos, Gabriel e Elisabete e à minha esposa, Fernanda, por toda ternura, afeto e cumplicidade que dividimos, carinhosamente, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Helena, muito obrigado pela confiança, dedicação e atenção dispensadas a mim durante todos os momentos dessa jornada. Sua ajuda e orientação foram essenciais para a realização desse trabalho.

À Dra. Armelle Delécluse do Instituto Pasteur, por ter gentilmente cedido as cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Daniel Pedro Udrisar, do Departamento de Fisiologia da UFPE, por ter cedido as instalações para a marcação de proteínas.

À Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos, Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira e ao biomédico Sidney Carlos de Oliveira, do Departamento de Entomologia do CPqAM, pelo auxílio para o uso do programa SPSS e para análise de enriquecimento das culturas bacterianas.

À equipe do insetário do CPqAM pelo apoio técnico prestado para a obtenção de larvas de *Aedes aegypti*.

A todos os demais componentes do Departamento de Entomologia pela troca constante de experiência que em diferentes momentos pude contar para a realização dos experimentos.

Ao CPqAM por ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Dr. André Freire Furtado pelas valiosas críticas e sugestões para o aperfeiçoamento da redação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela importante contribuição na avaliação deste trabalho.

Sumário

	Pág.
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CPqAM	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Dengue: aspectos gerais	01
1.2 <i>Aedes aegypti</i> , vetor da dengue	01
1.3 Agentes de controle biológico	02
1.4 Microorganismos entomopatogênicos	03
1.4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	04
1.4.2 Modo de ação	05
1.5 <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti)	07
1.5.1 Utilização do Bti na saúde pública	08
1.5.2 Toxinas inseticidas e espectro de ação do Bti	09
1.6 Modo de ação das toxinas do Bti	10
1.6.1 Sinergia das toxinas	10
1.6.2 Estrutura das toxinas	11
1.6.3 Interação das toxinas com receptores	12
1.7 Resistência	14
1.8 Justificativa	15
2 PERGUNTA CONDUTORA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 Colônia de mosquitos.....	18
4.2 Preparação de frações ricas em <i>microvilli</i> intestinal	18
4.3 Produção de biomassas bacterianas	19
4.4 Bioensaios	20

4.5	Contagem de esporos	20
4.6	Processamento e marcação das toxinas	21
4.7	Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	22
5	RESULTADOS	24
5.1	Avaliação das biomassas	24
5.2	Bioensaio: atividade larvicida <i>in vivo</i>	25
5.3	Avaliação de preparações ricas em <i>microvilli</i> intestinal	26
5.4	Processamento <i>in vitro</i> das toxinas	27
5.5	Ensaio de ligação	28
5.5.1	Competições homólogas e heterólogas	28
5.5.2	Ensaio de saturação	31
5.5.3	Cinética de ligação	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	40
8	ANEXOS	41
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10	MANUSCRITO	58

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CPqAM
(Cópia)**



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM

Título do Projeto: "Modo de ação do larvicida *Barcillus thuringiensis* sorovarietade israelensis sobre o vetor *Aedes aegypti*".

Pesquisador responsável: Henrique de Barros Moreira Beltrão

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 15.02.2005

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 06/05

PARECER

A Comissão considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares

Recife, 02 de março de 2005

Ana Maria Aguiar dos Santos

Drª Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Modo de ação dos cristais tóxicos do <i>Bacillus thuringiensis</i> . Após a ingestão dos cristais e esporos pelas larvas dos insetos-alvo (1), as proteínas presentes no cristal são solubilizadas e ativadas por serina-proteínases no lúmen intestinal das larvas (2). As toxinas ativas ligam-se a receptores específicos presentes nas células do epitélio intestinal (3) e a larva morre devido aos efeitos nocivos causados às células do epitélio intestinal (modificado de REGIS <i>et al.</i> , 2001).	07
Figura 2 Estrutura esquemática da delta-endotoxina Cry4Ba. A região azul representa o domínio I, formado por sete alfa-hélices e responsável pela formação de poros, a região verde corresponde ao domínio II, responsável pela ligação da toxina ao receptor e a região roxa corresponde ao domínio III que age tanto no reconhecimento do receptor quanto na modulação do canal iônico (modificado a partir de BOONSERM; DAVIS; ELLAR, 2005).	12
Figura 3 Separação eletroforética (SDS- PAGE) a 12% de amostras de cristais contendo as protoxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> após a solubilização (A) e após a ativação com tripsina bovina (B). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.	27
Figura 4 Ensaios de competição <i>in vitro</i> entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> marcadas com iodo (I^{125}), e frações de <i>microvilli</i> intestinal (BBMF) de <i>Aedes aegypti</i> . Competições entre 30 nM de toxina Cry- I^{125} , 25 μ g de BBMF e concentrações crescentes (0-10 μ M) de competidor homólogo ou heterólogo, durante 16 h, à temperatura ambiente. Os gráficos mostram a ligação total da toxina- I^{125} , tomando como ponto máximo (100%) o valor observado na ausência de competidor. Cada ponto representa a média de pelo menos 6 replicatas.	30
Figura 5 Ensaios de saturação entre as toxinas marcadas- I^{125} Cry11Aa (A) e Cry4Aa (B) e frações de <i>microvilli</i> intestinal (BBMF) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Foram incubadas concentrações crescentes (8-300 nM) de toxina- I^{125} com 25 μ g de BBMF, na presença e na ausência de um excesso de toxina não marcada, durante 16 h, à temperatura ambiente.	31
Figura 6 Cinéticas de associação total (TO), de associação não específica (NE) e de dissociação total (DI) entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> marcadas com iodo (I^{125}) e frações de <i>microvilli</i> intestinal (BBMF) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> . Nas amostras de associação, foram incubados 30 nM de toxina- I^{125} e 25 μ g de BBMF na ausência (TO) ou presença (NE) de um excesso (10 μ M) de competidor não marcado, sendo coletadas amostras em diferentes momentos, durante 24 h. Nas amostras de dissociação (DI), após 24 h de incubação, foi adicionado um excesso de competidor	33

homólogo (10 μM), e foram coletadas diferentes amostras, durante as 24 h subseqüentes. Cada ponto analisado é uma média de 4 replicatas. O ensaio foi realizado durante 48 h à temperatura ambiente.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Exemplo de ordem de insetos-alvo das toxinas Cry do <i>Bacillus thuringiensis</i> (modificado a partir de GLAIRE; O'CALLAGHAM, 2000; CRICKMORE, 2000).	05
Tabela 2 Produtos à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> disponíveis no mercado internacional para utilização em programas de controle de culicídeos e simulídeos (Modificado a partir de BECKER, 2003).	08
Tabela 3 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/ml) das biomassas das cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> recombinantes expressando as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba.	24
Tabela 4 Atividade tóxica das biomassas produzidas pelas cepas recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> expressando isoladamente os cristais contendo as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, e pela cepa IPS-82, para larvas do 3º/4º estágio de <i>Aedes aegypti</i> .	25
Tabela 5 Avaliação de preparações de frações de <i>microvilli</i> intestinal (BBMF) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> do 3º/4º estágio a partir da atividade de enzimas marcadoras de membrana, leucina aminopeptidase - LAP (EC 3.4.11.1) e α -glicosidase – GLI (EC 3.2.1.20).	26
Tabela 6 Ensaio de competições homólogas e heterólogas entre as toxinas Cry 11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do <i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> marcadas (I ¹²⁵) e preparações de frações de <i>microvilli</i> intestinal (BBMF) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> do 3º/4º estágio.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
BBMF	Brush Border Membrane Fraction (Preparações ricas em <i>microvilli</i> intestinal)
B_{max}	Parâmetro que estima o número de receptores presentes por mg de proteína de BBMF
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina sérica bovina)
Bin	Toxina binária
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis svar. israelensis</i>
CL ₅₀	Concentração de toxina letal para 50% de larvas
cpm	Counts per minute
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DENV	Vírus dengue
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLI	α -glicosidase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IC ₅₀	Concentração do competidor capaz de deslocar 50% da toxina- I ¹²⁵ ligada
ICP	Insecticidal crystal proteins (Proteínas inseticidas do cristal)
kDa	Kilo-Dalton
LAP	Leucina aminopeptidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Programa de Controle do <i>Aedes aegypti</i>
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel eletrophoresis
UFC	Unidades formadoras de colônia

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) é um importante entomopatógeno utilizado na produção de larvicidas para o controle do *Aedes aegypti*, vetor da dengue. A toxicidade do Bti está baseada no cristal, produzido durante a esporulação, que contém quatro protoxinas Cry11Aa (70 kDa), Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ba (130 kDa) e Cyt1A (28 kDa). Sua ação ocorre através da ingestão dos cristais que são solubilizados no mesêntero, onde as protoxinas são liberadas e clivadas por serina-proteases em toxinas ativas que agem em sinergia no epitélio intestinal e provocam a morte das larvas. Apesar da alta seletividade do Bti, ainda não foi completamente elucidado como as toxinas Cry interagem com os receptores específicos presentes no epitélio das larvas. O objetivo principal do trabalho foi caracterizar, através de ensaios *in vitro* de natureza quantitativa, a capacidade de ligação de cada toxina Cry (4Aa, 4Ba e 11Aa) às preparações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Ae. aegypti*. Para tal, cada componente Cry foi produzido a partir de cepas recombinantes, Bt cepa 4Q2-81, para produção de biomassas. A atividade inseticida das biomassas para larvas do 3^o/4^o estádios foi determinada através de bioensaios e, outra parte da biomassa foi utilizada para a obtenção dos cristais. Os cristais contendo cada protoxina foram processados *in vitro* e uma amostra de cada uma delas foi marcada com iodo (I¹²⁵). Para realizar os estudos de ligação foram feitas preparações BBMF, a partir de larvas do 3^o/4^o estádios. Os estudos da capacidade de ligação da toxina foram realizados através de ensaios de competição, de saturação e de cinética, através de incubações entre a toxina- I¹²⁵ e preparações de BBMF, na ausência ou na presença de um competidor. Os bioensaios mostraram que todas as biomassas apresentaram atividade inseticida para larvas de *Ae. aegypti* e a toxicidade foi decrescente para Cry4Ba, Cry11Aa e Cry4Aa. Foram obtidos, após o processamento *in vitro* das protoxinas, fragmentos ativos de 38 e 30 kDa para Cry11Aa, 45 e 20 kDa para Cry4Aa e 45 e 18 kDa para Cry4Ba indicando a formação de dímeros ativos. As preparações de BBMF apresentaram um enriquecimento médio de cinco vezes em relação ao homogeneizado inicial, e o rendimento foi de 1,23 mg de proteína por grama de larva inteira empregada na preparação. Todas as toxinas Cry apresentaram ligação específica à BBMF de *Ae. aegypti* e, na ausência de competidor, observou-se cerca de 2-3 pmol de toxina-I¹²⁵/mg de BBMF. A presença de concentrações crescentes da toxina livre provocou uma competição pelos sítios de ligação, sendo observado um deslocamento de 70% da Cry-I¹²⁵ ligada, confirmando a especificidade da ligação. A concentração do competidor que deslocou 50% da toxina Cry-I¹²⁵ ligada (IC₅₀) foi cerca de 88 nM para a Cry11Aa, 99 nM para a Cry4Aa e 521 nM para a Cry4Ba. Os resultados obtidos mostraram que as toxinas Cry competem pelos mesmos sítios e partilham receptores presentes na BBMF. Em todos os casos estudados, a afinidade do complexo toxina-receptor não foi elevada, e não foi detectada sinergia entre as toxinas Cry para a ligação à BBMF. A ligação entre as toxinas-I¹²⁵ e a BBMF é irreversível, e observou-se uma forte tendência à oligomerização nos três casos. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a toxicidade das toxinas Cry para larvas de *Aedes* está relacionada à etapa irreversível de ligação com os receptores, e não é caracterizada por um padrão elevado de afinidade do complexo toxina-receptor. Certamente outros fatores, como a presença da toxina Cyt tem um papel importante neste processo.

Palavras-chave: toxinas Cry, modo de ação, controle de vetores, receptores, bioinseticidas.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) is an important entomopathogenic bacteria used for the production of larvicides to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. Bti toxicity is based in a crystal produced upon sporulation, that contains four protoxins named Cry11Aa (70 kDa), Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ba (130 kDa) and CytA (28 kDa). Bti action depends on the ingestion of crystals that are solubilized in the larvae midgut, where protoxins are released. In the *lumen*, the protoxins suffer cleavage by the serine-proteases and are converted into active toxins that act in synergy on the midgut epithelium, provoking larvae death. Despite of the high selectivity of Bti, the interaction of Cry toxins with specific receptors from the larvae midgut, has not been fully elucidated. The major goal of this work was to analyze, through *in vitro* assays, the capacity of each Cry toxin (11Aa, 4Aa and 4Ba) to bind the midgut *microvilli* (BBMF) of *Ae. aegypti* larvae. For this purpose, each toxin was obtained, individually, using a recombinant *B. thuringiensis* strain 4Q2-81. The insecticidal activity of each biomass was tested through *in vivo* bioassays against 3th/4th instar larvae and, part of the biomass was used to obtain purified crystals. The crystals containing each protoxin were processed *in vitro*, and a sample of the activated toxin was labeled with iodine (I^{125}). BBMF preparations were obtained using whole 3th/4th instar larvae. *In vitro* analysis of toxin binding were performed through competition, saturation and kinetics assays, between each Cry- I^{125} and BBMF, in the absence or in the presence of the competitor. Bioassays revealed that all toxins displayed activity against larvae and toxicity was decreasing for Cry4Ba, Cry11Aa and Cry4Aa. *In vitro* processing of each protoxin, provided two protease-resistant fragments: 30 and 38 kDa for Cry11Aa, 45 and 20 kDa for Cry4Aa and 45 and 18 kDa for Cry4Ba. The BBMF preparations showed 5-fold enzymatic enrichment and yielded 1,23 mg of protein per gram of larvae used. Cry toxins showed specific binding to BBMF and, in the absence of competitor, a level of 2-3 pmol of Cry- I^{125} /mg of BBMF was detected. Increasing concentrations of the unlabelled toxin showed competition for the binding sites and displaced around 70% of the bound Cry- I^{125} , confirming the specificity of the binding. The competitor concentration that displaced 50% of the bound toxin- I^{125} (IC_{50}) was 88 nM for the Cry11Aa, 99 nM for Cry4Aa and 521 nM for Cry4Ba. Results showed that the Cry toxins compete for binding sites and share the same class of receptors in the BBMF. In all cases, the affinity of the toxin-receptor complex was not high and the synergy among Cry toxins to bind BBMF, was not observed. The binding between Cry- I^{125} to BBMF was irreversible and a strong tendency of oligomerization was observed. Data from this work suggest that the insecticidal activity of the Cry toxins towards *Ae. aegypti* larvae is related to the irreversible step of binding to the receptors, and is not characterized by a high level of affinity of the complex toxin-receptor. It is likely that other factors, as the action of the Cyt toxin have an important role in this process.

Key words: Cry toxins, mode of action, vector control, receptors, bioinsecticides.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue: aspectos gerais

Malária, filariose, dengue e encefalopatias virais são algumas das principais doenças transmitidas por vetores que preocupam a Organização Mundial de Saúde, e estima-se que em todo mundo, cerca de dois bilhões de pessoas vivam em áreas de risco (BECKER; MARGALIT, 1993). No Brasil, a dengue em particular é um importante problema de saúde pública. A doença é provocada por um vírus da família Flaviviridae e são conhecidos 4 sorotipos virais. Em nosso país já foi detectada a circulação de três deles: DENV1, DENV2 e DENV3. Distinguem-se duas formas de manifestação clínica da doença: a dengue clássica e a dengue hemorrágica, sendo a segunda forma a mais severa e preocupante devido à possibilidade de óbito em poucos dias. Os mecanismos que desencadeiam uma ou outra manifestação da doença ainda não estão claros. Na história recente há relatos de grandes epidemias de dengue no país, como as de 1986 e 1987, quando a doença atingiu o Rio de Janeiro (93.000 casos), Alagoas (12.000 casos), Ceará (21.000 casos), Bahia (541 casos), Minas Gerais (527 casos) e Pernambuco (1.300 casos). Em 2002 foi observada uma ampla epidemia, quando foram registrados em todo país cerca de 800.000 casos, dos quais 120.316 casos somente em Pernambuco (CENEPI-FUNASA/MS, 2003).

1.2 *Aedes aegypti*, vetor da dengue

O vírus dengue é transmitido através da picada de mosquitos pertencentes ao subgênero *Stegomyia*, sendo que duas espécies são consideradas as mais importantes: *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus (1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus*, Skuse (1894). A primeira espécie é responsável pela manutenção do ciclo em áreas urbanas e no Brasil, em particular, é considerada a única a transmitir a doença (MELO-SANTOS, 2001). A segunda espécie destaca-se como vetor em áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas, principalmente na Ásia e África (RODHAIN; ROSEN, 1997). Aqui no Brasil o *Ae. albopictus* é endêmico mas ainda não foi caracterizado como vetor da doença, entretanto, sua susceptibilidade aos quatro sorotipos virais, aliado à sua capacidade de dispersão tanto em áreas urbanas como em áreas rurais, faz dessa espécie motivo de grande preocupação (CONSOLI, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A expansão do vírus dengue está intimamente ligada à expansão do mosquito *Ae. aegypti* no mundo, uma vez que ele é o

principal vetor da doença. O *Ae. aegypti* é originário do Egito e atualmente encontra-se distribuído dentro de zonas isotermais de 20°C em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Acompanhou o homem pelo mundo e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação. Acredita-se que o *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil no período colonial, provavelmente durante o tráfico de escravos provenientes de regiões onde o mosquito já existia. Em 1955 foi considerado erradicado do Brasil após ter sido intensamente combatido, entretanto países vizinhos como as Guianas e a Venezuela não o erradicaram, ocorrendo sua reintrodução em 1967, a partir de Belém - PA. Desde então, o processo de urbanização desordenado, aliado a outros fatores ambientais, têm favorecido a proliferação deste vetor.

É um mosquito com curto ciclo de vida (de 8 a 12 dias em regiões tropicais), passando pelas seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto alado. Os criadouros de *Ae. aegypti* podem ser localizados com maior facilidade nos centros urbanos e são em sua maioria resultantes da atividade humana, tais como pneus, caixas d'água, vasos de plantas, recipientes e reservatórios diversos. Nesses criadouros proporcionados pelo homem, podem surgir condições propícias para a postura dos ovos pelas fêmeas de *Ae. aegypti*. Um criadouro ideal para as larvas desse mosquito é aquele que apresenta preferencialmente água limpa, pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais, acumulada principalmente em locais sombreados e com o fundo ou paredes escuras. Essas condições para a proliferação do *Ae. aegypti* tornam-se ainda mais comuns, na medida em que o crescimento das populações humanas não é acompanhado por uma ocupação racional do espaço urbano.

A principal forma de infecção do mosquito acontece após o repasto sangüíneo das fêmeas de *Ae. aegypti* em seres humanos contaminados pelo vírus. Uma vez infectados os mosquitos podem transmitir o vírus durante todo o seu ciclo de vida, inclusive aos seus descendentes por transmissão vertical ou transovariana (KHIN; THAN, 1983; JOSHI *et al.*, 1995).

1.3 Agentes de controle biológico

Desde a década de 1940, a introdução de inseticidas químicos no combate aos insetos vetores foi bastante difundido e, *a priori*, mostrou-se eficaz. Devido ao seu amplo espectro de ação, esses inseticidas atingem espécies não-alvo e provocam um alto impacto ambiental, além de promover a seleção de insetos resistentes. Aliado a esses fatos, também se constatou o risco à saúde humana através da exposição direta, e do consumo de alimentos e água

contaminados. Estes aspectos negativos associados ao uso dos inseticidas químicos, levaram à busca de agentes de controle de insetos mais eficazes e sobretudo seguros. Hoje são muitos os agentes biológicos que podem ser empregados no controle de insetos. Podemos dizer que todas as espécies de insetos têm inimigos naturais que desempenham, de diferentes maneiras, relações ecológicas que interferem em diversos estágios de vida, destacando-se o papel dos predadores, vertebrados ou invertebrados, dos parasitas, como algumas espécies de nematóides e, principalmente, de patógenos no controle da população de insetos (BECKER *et al.*, 2003).

1.4 Microorganismos entomopatogênicos

No universo de agentes de controle biológico os microorganismos se destacam por uma série de vantagens, principalmente a sua fácil produção em larga escala (RUAS-NETO, 1984; ZINIU; LONGSHENG, 1990). Os microorganismos entomopatogênicos que mais chamam a atenção de pesquisadores e industriais em todo mundo, devido principalmente ao seu modo de ação e a sua especificidade, são as bactérias. Já foram identificadas bactérias patogênicas de diferentes espécies de insetos das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, e também de outros grupos de organismos como nematóides e protozoários (FEITELSON; PAYNE; KIM, 1992).

As principais bactérias entomopatogênicas pertencem às famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae (ARONSON; BECKMAN; DUM, 1986). Dentre elas destacam-se aquelas pertencentes à ordem Bacillales, mais especificamente ao gênero *Bacillus*. O *Bacillus thuringiensis*, juntamente com o *B. sphaericus*, são os mais importantes entomopatogênicos do ponto de vista científico e industrial devido a um conjunto de características desejáveis, que ambos apresentam. Até hoje a espécie mais estudada é o *Bacillus thuringiensis* (Bt), tendo sido isolados inúmeros sorotipos, em diferentes regiões do mundo. Destacam-se por sua importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como a *israelensis*, *tenebrionis* e *kurstaki*. A primeira com importante aplicação na saúde pública frente a insetos da Ordem Diptera como o *Ae. aegypti* e o *Simulium pertinax*; a segunda e a terceira, por sua importância na agricultura, respectivamente tóxicos para alguns insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera.

1.4.1 *Bacillus thuringiensis*

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram positiva, aeróbica facultativa, cosmopolita, esporulante e formadora de inclusões cristalinas. Possui estruturas de locomoção chamados flagelos peritríquios, que são compostos por um grupo de proteínas imunogênicas chamado flagelinas, as quais permitem a obtenção de anticorpos, antígenos-H, altamente específicos e estáveis (DE BARJAC; FRACHON, 1990). Os anticorpos obtidos para as diferentes flagelinas permitem realizar reações de aglutinação *in vitro* que distinguem as sorovariedades de *B. thuringiensis*, tendo sido detectados até hoje mais de 90 sorotipos (LECADET *et al.*, 1999; RABINOVITCH *et al.*, 2000).

O Bt pode ser encontrado no solo, nas folhas de plantas e algumas vezes em microhabitats favoráveis como, por exemplo, dentro de insetos. O número de células de Bt obtidas em isolamento pode variar entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC/cm² por folha (DAMGAARD, 2000). Existem alguns poucos trabalhos que relatam o aparecimento de epizootias naturais desse microorganismo, principalmente em lepidópteros (BROWNBRIDGE; ONYANGO, 1992; MEADOWS *et al.*, 1992; PORCAR; CABALLERO, 2002). Devido a sua baixa ocorrência epizoótica, seria pouco provável que a principal fonte de toxinas e esporos de Bt na natureza seja os insetos colonizados. Acredita-se numa possível simbiose entre o patógeno e as plantas (ARONSON; SHAI, 2001). Diferente da maioria dos entomopatógenos, a reciclagem deste patógeno é pobre no solo, levando à hipótese do Bt ser essencialmente um microorganismo com atividade inseticida acidental (MARTIN; TRAVERS, 1989). O fato dessa bactéria ser encontrada normalmente no ambiente, na presença ou não de insetos, dá suporte a essa teoria.

Sob certas condições restritivas do crescimento observadas durante a fase estacionária, esta bactéria entra em processo de esporulação e, no início desta fase, sintetiza um cristal de natureza protéica que é responsável pela atividade larvívora do Bt. Os cristais são formados de delta-endotoxinas de dois tipos: as proteínas da família Cry, que apresentam atividade inseticida específica, e da família Cyt, com atividade citolítica inespecífica. Observou-se que a quantidade de toxina produzida em laboratório, aproximadamente 0,5 mg de proteína/mL de meio de cultura, e o tamanho dos cristais indicam que cada célula tem que sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de toxina, sejam responsáveis por mais de 25% do peso seco das células (AGAISSE; LERECLUS, 1995).

As toxinas do Bt formam um numeroso grupo de toxinas denominadas ICP (“Insecticidal Crystal Proteins”), sendo proposto por Crickmore *et al.* (1998) uma classificação a partir da seqüência primária de aminoácidos. A descrição completa das atuais toxinas de Bt catalogadas pode ser encontrada no site: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Já foram seqüenciadas cerca de 150 ICPs (CRICKMORE, 2005). O número de toxinas já identificadas é elevado e observa-se toxinas com atividade inseticida para importantes pragas da agricultura, particularmente contra lepidópteros e coleópteros, além de outras com atividade para dípteros e utilizadas para o controle de insetos vetores (Tab. 1). O Bt, em uso há mais de 60 anos como biolarvicida, mostrou-se inócuo em testes que avaliaram o potencial tóxico das toxinas Cry para células de mamíferos, além de organismos vertebrados e invertebrados não-alvo (THOMAS; ELLAR, 1983; GLAIRE; O’CALLARGHAM, 2000). Além das toxinas do cristal, ou delta-endotoxinas, algumas cepas de Bt produzem outras toxinas, denominadas exotoxinas, como a β -exotoxina que possui um amplo espectro de ação em insetos. Porém, devido à sua toxicidade também para vertebrados, os biolarvicidas são obtidos a partir de cepas de Bt que não produzem β -exotoxinas (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Tabela 1. Exemplo de ordem de insetos-alvo das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* (modificado a partir de GLAIRE; O’CALLAGHAM, 2000; CRICKMORE, 2000).

Ordem	Número de espécies	Cristal
Diptera	266	Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry20
Hymenoptera	62	Cry5, Cry22
Coleoptera	106	Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry18, Cry23
Lepidoptera	572	Cry1, Cry2, Cry9, Cry15
Nematoda	NI*	Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry21

*NI : Não informado

1.4.2 Modo de ação

A maior parte das informações existentes sobre o modo de ação do Bt são oriundas de estudos de sorovarietades como o *Bt kurstaki*, *Bt aizawai*, *Bt tenebrionis*, e outras de grande aplicação no controle de lepidópteros e coleópteros.

Para que ocorra a atividade tóxica do Bt faz-se necessário uma série de eventos (Fig. 1) que se inicia com a ingestão das inclusões cristalinas pelas larvas dos insetos alvo. Após a ingestão, as proteínas que se encontravam insolúveis e presas umas às outras formando o cristal são solubilizadas em pH alcalino próximo a 10, que é encontrado no mesêntero da maioria dos insetos-alvo e constitui a primeira etapa da seletividade da ação do Bti. Em seguida, as protoxinas são liberadas no intestino das larvas e convertidas em polipeptídeos tóxicos devido à ação proteolítica de enzimas digestivas. As toxinas ativas atravessam a membrana peritrófica e se ligam a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio. Elas agem interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. Estes eventos causam a lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio (KNOWLES; ELLAR, 1987; ARONSON; SHAI, 2001). De acordo com Knowles (1994), o pH elevado do intestino médio dos insetos susceptíveis evitaria a germinação dos esporos ingeridos do Bt. Porém, as delta-endotoxinas causam a paralisia do intestino, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos, que provocam um quadro de septicemia na larva. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria e reciclagem dos estoques, naturalmente. Devido à importância do esporo na reciclagem do Bt, a maioria dos produtos comercializados é composta de esporos e toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica. Entretanto, na Alemanha, a legislação exige que os biolarvicidas à base de *Bacillus*, contenham apenas esporos inativos, sendo os cristais os únicos responsáveis pela patogenicidade (BECKER; 2000).

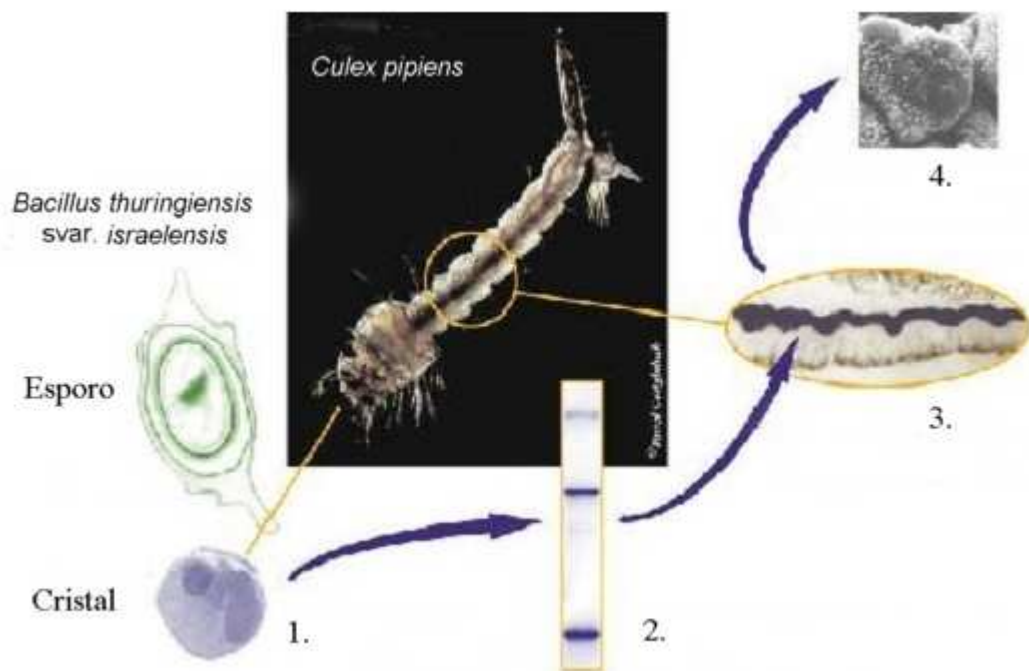


Figura 1. Modo de ação dos cristais tóxicos do *Bacillus thuringiensis*. Após a ingestão dos cristais e esporos pelas larvas dos insetos-alvo (1), as proteínas presentes no cristal são solubilizadas e ativadas por serina-proteinases no lúmen intestinal das larvas (2). As toxinas ativas ligam-se a receptores específicos presentes nas células do epitélio intestinal (3) e a larva morre devido aos efeitos nocivos causados às células do epitélio intestinal (modificado de REGIS *et al.*, 2001).

1.5 *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti)

O *B. thuringiensis* é um entomopatógeno utilizado desde 1960, mas a sua ação larvicida para dípteros só foi conhecida a partir da descoberta do *B. thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti). Essa cepa foi isolada por Goldberg e Margalit em 1977 a partir do intestino de larvas moribundas de *Culex*, sendo posteriormente caracterizada pelo método do antígeno-H como sorovariedade H-14 (DE BARJAC, 1978 *apud* CARVALHO, L.R., 2005). Descobriu-se mais tarde que o poder larvicida do Bti estendia-se para diferentes espécies das famílias Culicidae e Simuliidae (DELÉCLUSE; PÉREZ; BERRY, 2000). A descoberta desta sorovariedade foi um acontecimento importante para possibilitar o uso de agentes seletivos no controle de dípteros oferecendo facilidades de produção industrial e aplicação em larga escala. Atualmente existem diversos produtos comerciais à base de Bti sendo utilizados no mundo todo (Tab. 2).

Tabela 2. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* disponíveis no mercado internacional para utilização em programas de controle de culicídeos e simulídeos (Modificado de BECKER, 2003).

Nome comercial	Formulação	Fabricante
Aquabac®	Pó primário	Becker Microbial/USA
Bactimos WP®	Pó molhável	Valent BioSciences/USA
Bactimos PP®	Pó primário	Valent BioSciences/USA
Bactimos G®	Grânulos	Valent BioSciences/USA
Ice cubes®	Grânulos de gelo	Icybac GMBH/Phoenix/ Alemanha
Teknar Hp-D®	Concentrado fluido	Thermo Trilogy/USA
Teknar TC®	Pó técnico	Thermo Trilogy/USA
Teknar G®	Grânulos	Thermo Trilogy/USA
VectoBac 12AS®	Concentrado fluido	Valent BioSciences/USA
VectoBac TP®	Pó técnico	Valent BioSciences/USA
VectoBac WDG®	Grânulos dispersíveis em água	Valent BioSciences/USA
VectoBac DT®	Tabletes	Valent BioSciences/USA
Bactecide®	Grânulos dispersíveis em água	BioTech International Ltd/India
Culinx Tab plus®	Tabletes	Valent BioSciences/USA
BioTouch®	Concentrado fluido	Zohar Dalia/ Israel

1.5.1 Utilização do Bti na saúde pública

A utilização de inseticidas biológicos à base de *Bacillus* no controle de vetores tornou-se uma realidade após a descoberta do Bti. Em 1983 fez-se o primeiro uso em larga escala do Bti no “Programa de Controle da Oncocercose” envolvendo 11 países da África Ocidental para a redução populacional do vetor *Simulium pertinax*. Nessa mesma década o Bti foi introduzido no Brasil no “Programa de Controle de Simulídeos” em uma extensa área da Serra Gaúcha (RS) e posteriormente no litoral norte do estado de São Paulo (MARDINI *et al.*, 1999; ARAÚJO-COUTINHO, 1995). Em ambos os casos os simulídeos não têm o papel de vetor, porém causam grande incômodo à população humana justificando a necessidade de seu controle. Nestes programas obteve-se sucesso no combate ao *S. pertinax*, que já se mostrava resistente ao uso dos inseticidas químicos organofosforados, usados anteriormente

(MARDINI *et al.*, 1999). O Bti também é utilizado com êxito na Alemanha desde 1976 no combate ao *Aedes vexans*, e atualmente o programa de controle alcança cerca de 100 cidades e vilarejos que são afetados pela proliferação deste mosquito. No caso deste programa, existe uma grande prioridade que é a de diminuir a população do mosquito sem prejudicar a fauna da região. Como resultado desse trabalho, a incidência de mosquito foi reduzida em 90% a cada ano nesses locais. Nos Estados Unidos o Bti está se tornando o principal larvicida utilizado, além de estar sendo empregado em inúmeros outros países Europeus como a França, Espanha, Rússia, Itália, Suíça, Eslovênia e Iugoslávia (BECKER; MARGALIT, 1993). O Bti tomou uma importância especial no Brasil pois este biolarvicida foi integrado ao combate ao vetor da dengue no âmbito do “Programa de Controle do *Ae. aegypti*” (PCA), conduzido em centenas de municípios afetados pela doença (BRAGA *et al.*, 2004). Produtos comerciais à base do Bti foram adotados para o tratamento de criadouros de *Aedes* em vários estados, inclusive em Pernambuco.

1.5.2 Toxinas inseticidas e espectro de ação do Bti

Em contraste com os inseticidas químicos, o uso do Bti não tem efeito tóxico para a população humana e também se sobressai devido ao baixo impacto ambiental, uma vez que seu modo de ação é seletivo. Os principais alvos são espécies dos gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Anopheles*. A ação do Bti, deve-se à presença de um corpo paraesporal (cristal) produzido durante a fase de esporulação. O cristal possui atividade larvicida devido à presença de 4 protoxinas, com pesos moleculares aproximados de 125-, 135-, 68- e 28- kDa, respectivamente (DELÉCLUSE; PÉREZ; BERRY, 2000).

Os genes que codificam para esses quatro polipeptídeos do Bti estão localizados em um plasmídeo de 72-MDa e já foram identificados de acordo com suas seqüências, recebendo as denominações de *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cyt1Aa* (WARD; ELLAR, 1985). Fez-se uma análise das seqüências de aminoácidos primárias correspondentes à região amino-terminal de todas as seqüências de toxinas Cry conhecidas, identificando-se a presença de cinco blocos com alto grau de homologia (HÖFTE; WHITELEY, 1989). A análise destes blocos entre as toxinas, mostrou que a toxina Cry11Aa apresenta o menor grau de homologia entre elas (KUMAR; SHARMA; MALIK, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998).

1.6 Modo de ação das toxinas do Bti

O modo geral de ação do Bti envolve inicialmente a ingestão dos cristais, em suspensão na água, pelas larvas aquáticas de mosquitos (Culicidae) e borrachudos (Simuliidae). Uma vez ingerido, o cristal é solubilizado em pH alcalino intestinal liberando no lúmen quatro polipeptídeos componentes do cristal, que são considerados protoxinas. Estes necessitam ser clivados pelas proteases intestinais dando origem a fragmentos variando de 40-44 kDa para os polipeptídeos de 125-135 kDa, 30-35 kDa para os de 68 kDa, e 25 kDa para os de 28 kDa (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992; DAÍ; GILL, 1993; KONI; ELLAR, 1994). Após o processamento proteolítico, as toxinas parecem interagir com a porção apical das microvilosidades no lúmen intestinal das larvas, como demonstrado em larvas de *Anopheles gambiae* através de um estudo de imunodeteção das toxinas em cortes histológicos do mesêntero (RAVOAHANGIMALALA; CHARLES, 1995). Poucos minutos após a ingestão dos cristais, são observadas alterações citopatológicas no epitélio intestinal das larvas, como o entumescimento celular, alteração na estrutura das mitocôndrias, ruptura da lâmina basal e danos à musculatura lisa (SINGH; SCHOUEST; GILL, 1985).

1.6.1 Sinergia das toxinas

Foram realizados estudos para determinar a contribuição de cada um dos polipeptídeos do Bti na toxicidade para as larvas de *Ae. aegypti*. Observou-se que eles apresentam uma ação em sinergia, sendo o cristal nativo mais tóxico do que qualquer componente sob a forma individual, ou em combinação (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995). Em outro estudo da toxicidade do Bti para *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae), novamente constatou-se que a toxicidade do cristal nativo era bem maior do que as contribuições isoladas de cada componente (HUGHES *et al.*, 2005).

A contribuição de cada componente ou combinações deles na atividade tóxica do Bti para todos os gêneros de insetos susceptíveis, ainda não foi elucidada. Alguns estudos mostraram que a toxina Cry11Aa apresenta a maior toxicidade em *Ae. aegypti*, embora ela ainda seja inferior àquela do cristal nativo (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995). Alguns estudos também têm sido feitos com o objetivo de elucidar o papel tóxico de cada protoxina e seus respectivos fragmentos ativos. Em um estudo da protoxina Cry4Aa e de suas frações ativas em larvas de *Culex pipiens*, observou-se que a protoxina Cry4Aa, de 130 kDa, ou os seus fragmentos ativos, de 20 e 40 kDa, testados isoladamente, não apresentavam

toxicidade para as larvas. Quando estas foram expostas simultaneamente aos dois fragmentos ativos foi observada a atividade tóxica, sugerindo que os fragmentos dependem um do outro para a formação de um complexo toxicamente ativo de aproximadamente 60 kDa (YAMAGIWA *et al.*, 1999). Outro estudo, conduzidos com a Cry11Aa e larvas de *C. pipiens*, chegou-se a conclusão semelhante de que após a ativação da protoxina de 70 kDa em fragmentos menores, de 38 e 32 kDa, estes também formavam um dímero responsável pela toxicidade para essas larvas (YAMAGIWA, 2001).

1.6.2 Estrutura das toxinas

Estudos demonstraram que a estrutura tridimensional das moléculas das toxinas Cry1Aa (ativa para lepidópteros), Cry3A (ativa para coleópteros) e Cry2Aa (ativa para dípteros e lepidópteros) são bastante semelhantes (LI; CARROLL; ELLAR, 1991; GORCHULSKI *et al.*, 1995; MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001). As toxinas apresentam três domínios (Fig. 2). O domínio I estaria relacionado à inserção e formação de poros na membrana; o domínio II é responsável pelo reconhecimento do receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto-alvo; o domínio III parece estar envolvido com ambas as funções dos domínios I e II, além da estabilidade da toxina (RAJMOHAN; LEE; DEAN, 1998). Outros estudos, com as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba do Bti, mostraram que esses três domínios encontram-se em regiões de alta homologia de aminoácidos entre as delta-endotoxinas; o domínio I é uma região formada por sete α hélices correspondentes à região N-terminal, o domínio II por folhas β e uma alfa hélice e o domínio III apenas por folhas β , correspondendo à região C-terminal da toxina (BOONSERM; ELLAR; LI, 2003; REVINA *et al.*, 2004). As estruturas tridimensionais das protoxinas Cry4Aa e Cry4Ba, foram descritas recentemente e evidenciou-se a presença dos mesmos domínios estruturais, confirmando assim uma estrutura típica de toxinas que agem via o reconhecimento de receptores nos insetos-alvo (ANGSUTHANASOMBAT *et al.*, 2004).

Dentre as 150 seqüências de toxinas Cry de Bt identificadas até agora, chegou-se à conclusão, por análise de homologia de seqüências, que aproximadamente 120 delas carregam uma estrutura comum composta por três domínios (CRICKMORE, 2005). A alta atividade inseticida do Bti, associada aos recentes estudos da estrutura das toxinas Cry, aponta claramente que a ação destas toxinas depende da interação desses domínios com receptores do epitélio intestinal das larvas.

Dados preliminares utilizando a Cry11Aa em ensaios de ligação com preparações ricas em microvilosidades intestinais de insetos dípteros indicam a sua ligação a proteínas de 148 kDa em *Anopheles stephensi* e de 78 kDa em *Tipula oleracea* (FELDMANN; DULLEMANN; WAALWINJK, 1995). Ensaios de natureza qualitativa sugerem que os possíveis receptores para as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba em larvas de *Ae. aegypti* sejam proteínas de 62 e 65 kDa (BUZDIN *et al.*, 2002). Estudo recente utilizando preparações ricas em microvilosidades intestinais (BBMF) de *Ae. aegypti* e a toxina Cry11Aa do Bti, apontou que a alfa-hélice 8 localizada no provável domínio II da toxina Cry11Aa, ainda sem estrutura tridimensional conhecida, seria um importante epítipo envolvido nas interações com o receptor dessa toxina no epitélio de *Ae. aegypti* (FERNANDEZ *et al.*, 2005). Apesar de alguns dados já disponíveis, não foi realizada nenhuma análise através de ensaios de ligação quantitativos, que caracterizasse a interação das toxinas do Bti com os receptores do epitélio intestinal de *Ae. aegypti*.

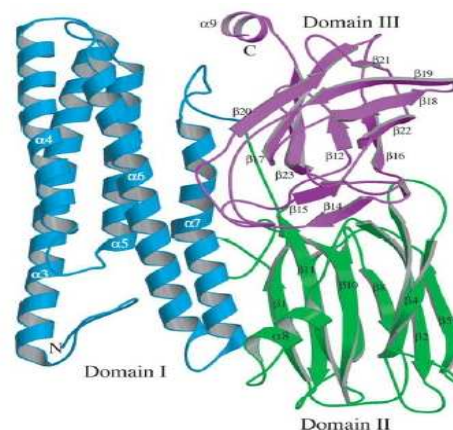


Figura 2. Estrutura esquemática da delta-endotoxina Cry4Ba. A região azul representa o domínio I, formado por sete alfa-hélices e responsável pela formação de poros, a região verde corresponde ao domínio II, responsável pela ligação da toxina ao receptor e a região roxa corresponde ao domínio III que age tanto no reconhecimento do receptor quanto na modulação do canal iônico (modificado a partir de BOONSERM; DAVIS; ELLAR, 2005).

1.6.3 Interação das toxinas com receptores

A ação inseticida de natureza seletiva do Bti indica claramente que suas toxinas necessitam interagir com receptores presentes na membrana apical do epitélio intestinal das larvas-alvo, a exemplo do que ocorre entre a toxina binária do *B. sphaericus* e larvas de *Culex* e *Anopheles* (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997), bem como entre as

toxinas Cry1 do *B. thuringiensis* ativas para larvas de lepidópteros (GARCZYNSKI; ADANG, 2000). Nestes casos as toxinas reconhecem receptores específicos do epitélio intestinal que têm sido identificadas e caracterizadas.

As sorovarietades do Bt, *kurstaki* e *aizawai* vêm sendo empregadas desde a década de 1960 no controle de lepidópteros e a maior parte do conhecimento obtido sobre a interação é proveniente de estudos com as toxinas Cry1. Neste último modelo, as toxinas Cry1 ativas ligam-se a receptores específicos da membrana do epitélio intestinal, promovem o comprometimento do equilíbrio osmótico destas células devido às alterações na permeabilidade das membranas apicais, que resultam no entumescimento e posterior rompimento celular (KNOWLES; ELLAR, 1987). Alguns receptores de toxinas Cry1 do *B. thuringiensis* presentes no mesêntero de larvas de lepidópteros tais como *Manduca sexta*, *Lymatria dispar*, *Heliothis virescens*, *Plutella xylostella* e *Bombyx mori* já foram identificados e caracterizados (GARCZYNSKI; ADANG, 2000). Os receptores caracterizados pertencem a três classes de proteínas: às aminopeptidases, à super família das caderinas. Recentemente, uma fosfatase-alcálica de 65 kDa ligada ao epitélio intestinal de larvas de *Ae. aegypti* através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) foi caracterizada como sendo o receptor da toxina Cry11Aa, esta é a primeira identificação de um receptor para toxinas de Bt em dípteros (FERNANDEZ *et al.*, 2006).

A ligação das toxinas às microvilosidades do epitélio intestinal das larvas é o processo mais importante no modo de ação das toxinas. Experimentos *in vitro* de natureza quantitativa, utilizando frações ricas em *microvilli* do epitélio intestinal das larvas (BBMF) e toxinas mostraram que a ligação da toxina ao receptor é um processo que ocorre em duas etapas, uma reversível e outra irreversível. Na primeira etapa ocorre o reconhecimento do receptor que é reversível e pode levar à dissociação do complexo toxina-receptor, na segunda etapa, ocorre a inserção da toxina na membrana apical da célula tornando a ligação irreversível (RAJAMOCHAN; LEE; DEAN, 1998). Em alguns casos existe uma correlação direta entre a afinidade da ligação do complexo toxina-receptor e a respectiva toxicidade *in vivo* observada para as larvas (HOFMANN *et al.*, 1988; LEE *et al.*, 1992). Entretanto, existem casos em que a toxina é altamente ativa para o inseto-alvo, como é o caso da Cry1Ab e larvas de *L. dispar*, porém não se observa uma boa afinidade nos ensaios de ligação *in vitro* entre toxina e receptor. Testes com as toxinas Cry1Aa e Cry1Ab mostraram que estas toxinas possuem afinidade *in vitro* semelhante aos receptores de *B. mori*, mas os efeitos biológicos são distintos, sendo a Cry1Aa 100 vezes mais tóxica do que a Cry1Ab (IHARA *et al.*, 1993). Neste caso, ficou demonstrado que, embora essas toxinas se liguem com a mesma intensidade

ao epitélio intestinal das larvas de *B. mori*, a ligação da Cry1Ab é um processo muito mais reversível que o da Cry1Aa, o que leva a concluir que a toxicidade está diretamente ligada à etapa irreversível da ligação.

1.7 Resistência

Experiências em campo com o Bti, em uso há mais de 20 anos, revelam que não há registro do aparecimento de resistência a este agente por parte dos insetos alvo (BECKER; MARGALIT, 1993). As toxinas produzidas pelo Bti agem em sinergia, o que dificulta a seleção de mecanismo de resistência, sendo esta característica uma das principais vantagens deste entomopatógeno. Ensaio de seleção de larvas de culicídeos, sob condições de laboratório, utilizando toxinas individuais ou combinações de duas ou três toxinas mostram que o desenvolvimento de resistência é inversamente proporcional ao número de toxinas empregado na seleção (GEORGHIOU; WIRTH, 1997). No caso dos inseticidas químicos, já foi amplamente registrada a ocorrência de resistência de vetores às diversas classes de inseticidas utilizados (BROGDON; MCALLISTER, 1998; HEMINGWAY; RANSON, 2000). O Bti apresenta um modo de ação extremamente eficaz e uma complexidade que o faz único dentre os demais agentes de controle biológico. Uma análise da susceptibilidade de populações de *Ae. vexans* da Alemanha, expostas ao Bti durante 10 anos, comparada àquela de insetos de áreas não tratadas, chegou a valores similares (BECKER; LUDVWIG, 1993). Conclusões semelhantes foram obtidos por Kurtak *et al.*, (1989) após avaliarem a susceptibilidade de *Simulium damnosum* ao Bti, após 7 anos de uso deste larvicida no oeste da África.

O Bti também tem grande utilidade para evitar a seleção de larvas de *Culex* ao entomopatógeno *B. sphaericus* (Bs). Estudos mostram que o modo de ação do *Bacillus sphaericus*, baseado na presença de uma única toxina, favorece o aparecimento de larvas de *Culex* resistentes. Para resolver esse problema, testaram-se combinações da toxina Bin com as toxinas do Bti para larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes e constatou-se que algumas dessas combinações foram tóxicas para as larvas, decorrente da maior complexidade das toxinas em ação (WIRTH *et al.* 2004). Mais adiante, avaliou-se o potencial de seleção de resistência, em larvas de *C. quinquefasciatus*, tratadas com a toxina binária, sozinha ou combinada com a toxina Cyt1A do Bti (WIRTH *et al.*, 2005). Observou-se após 20 gerações, que larvas expostas à toxina binária apresentavam uma resistência de 1.000 vezes, enquanto que aquelas tratadas com uma mistura da toxina binária e Cyt1A não apresentaram alteração

de sua susceptibilidade. Sugere-se que se faça alternância no uso do Bs com o Bti, no intuito de diversificar o número de toxinas utilizadas e mecanismos de ação, e dificultar o aparecimento da resistência (SILVA-FILHA *et al.*, 1997; REGIS *et al.*, 2001).

1.8 Justificativa

Ao contrário do conhecimento sobre as toxinas Cry do *B. thuringiensis*, ativas para insetos-praga na agricultura, pouco se sabe sobre o modo de ação dessas proteínas com atividade para dípteros como o *Ae. aegypti*. Ainda não se conhecem os mecanismos envolvidos na ligação das toxinas do Bti aos possíveis receptores e este estudo é fundamental considerando a grande importância deste agente nas campanhas de controle do *Ae. aegypti* no Brasil, e particularmente no estado de Pernambuco. O presente estudo de avaliação quantitativa da interação das toxinas do Bti com o epitélio de larvas de *Ae. aegypti* é inédito e representa uma contribuição relevante para a compreensão do modo de ação do Bti.

2 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os mecanismos envolvidos na interação das toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) com o epitélio intestinal de larvas do vetor *Ae. aegypti* ?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a interação das toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do cristal do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o epitélio intestinal de larvas do vetor *Aedes aegypti*, através de ensaios de natureza quantitativa.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de ligação específica das toxinas Cry, às preparações ricas em *microvilli* do epitélio intestinal de larvas de *Ae. aegypti* (BBMF).
- Comparar a capacidade de ligação específica e a afinidade de cada toxina Cry às preparações de BBMF.
- Avaliar a ocorrência de sinergia entre as toxinas Cry na possível interação com receptores específicos presentes nas preparações de BBMF.
- Comparar os dados de interação *in vitro* com a atividade *in vivo* de cada toxina para larvas de *Ae. aegypti*.

4. METODOLOGIA

4.1 Colônia de mosquitos

Neste trabalho foi utilizada uma colônia de *Aedes aegypti*, denominada Recife-Lab, formada a partir de ovos coletados em bairros do Recife e mantida há 10 anos no insetário do CPqAM sob condições controladas: temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa média de 70% e o fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). As larvas foram mantidas em água desclorada e alimentadas com ração comercial para gatos (Wiskas[®]). Os adultos foram alimentados com solução de açúcar a 10% e as fêmeas fizeram o repasto sangüíneo em aves (*Gallus sp.*).

4.2 Preparação de frações ricas em *microvilli* intestinal

Larvas do 3^o/4^o estágio, armazenadas a -70°C , foram utilizadas para obter preparações ricas em *microvilli* intestinal (BBMF). A técnica baseia-se no isolamento parcial de membranas apicais através de centrifugação diferencial e precipitação seletiva de membranas baso-laterais utilizando íons de magnésio (Anexo 1), de acordo com Silva-Filha *et al.*, (1997). A qualidade das preparações foi avaliada através da dosagem de proteínas pelo método de Bradford, (1976) e do enriquecimento da leucina aminopeptidase (EC 3.4.11.1) e da α -glicosidase (EC 3.2.1.20), que são enzimas marcadoras de *microvilli* intestinais. O método de Bradford baseia-se na detecção de proteínas utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino e o reativo específico (Biorad), sendo as amostras avaliadas em espectrofotômetro a uma absorbância de 595 nm. A atividade leucina aminopeptidase foi determinada a partir da incubação de 20 μl da amostra em 1 ml do tampão Tris 260 mM/NaCl 260 mM, pH 7.8, contendo 1 mM do substrato L-leucina-4-nitroanilide (Sigma), à temperatura ambiente (25°C). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 405 nm e a atividade foi determinada através da variação da absorbância por minuto, e por miligrama de proteína ($\Delta\text{Abs } 405 \text{ nm/min/mg}$), durante 5 minutos. A atividade da α -glicosidase foi avaliada a partir da incubação de 25 μg de proteína da amostra em 1 ml do tampão Tris-HCl 100 mM pH 6,5, contendo KCl 130 mM/MgCl₂ 5 mM/CaCl₂ 10 mM e 2 mM do substrato p-nitrophenyl- α -D-glucanopyranoside (Sigma) após duas horas de incubação a 37°C . A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 405 nm. A atividade foi determinada através da variação da absorbância a 405 nm por hora e por miligrama de proteína ($\Delta\text{Abs } 405 \text{ nm/h/mg}$). O

enriquecimento enzimático foi dado pela razão entre a atividade observada na amostra de BBMF (Anexo 1, P4) e àquela detectada na amostra correspondente ao homogenado inicial de larvas inteiras (Anexo 1, S'O + SO).

4.3 Produção das biomassas bacterianas

As toxinas do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) utilizadas nos ensaios de ligação foram produzidas individualmente a partir de recombinantes do *B. thuringiensis* cepa 4Q2-81, transformados com 3 plasmídios distintos: pHT640, pHT606, pHT618 contendo os genes que codificam respectivamente as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba (DELÉCLUSE *et al.*, 1993; PONCET *et al.*, 1993). As amostras destes recombinantes foram gentilmente cedidas pela Dra. Armelle Delécluse (Institut Pasteur, Paris). As toxinas foram obtidas individualmente para sua análise. Para a obtenção das culturas foram utilizados papelotes impregnados com esporos correspondentes às três cepas recombinantes envolvidas. Os inóculos foram realizados em 120 ml de meio para *Bacillus thuringiensis* (Anexo 2) acrescidos de glicose 30% (1% final) e de eritromicina (25 µg/ml final). Os meios contendo o inóculo foram incubados durante 72 horas a 30°C em mesa agitadora a 200 rpm. Após a incubação, foram retiradas amostras das culturas para verificar o nível de esporulação através de observação direta no microscópio óptico. As biomassas (células vegetativas, cristais e esporos) das culturas que atingiram um nível de esporulação $\geq 60\%$ foram recuperadas por centrifugação 12.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C (Beckman[®] rotor JA14). As amostras foram lavadas com uma solução de NaCl 1 M/EDTA 100 mM e depois uma solução de EDTA 100 mM, intercaladas de centrifugações segundo as condições citadas anteriormente, e por fim armazenadas a -20°C. Para sua utilização em bioensaios (vide ítem 4.4) a biomassa foi liofilizada, e para os ensaios de competição *in vivo*, ela foi submetida ao gradiente de sacarose para a obtenção de cristais (vide ítem 4.6). Neste trabalho também foi utilizada uma amostra liofilizada da cepa IPS82 (Bti nativo), considerada padrão de referência internacional, produzida pela Unidade de Bactérias Entomopatógenas do Instituto Pasteur.

4.4 Bioensaios

A avaliação da atividade inseticida *in vivo* das toxinas Cry do Bti para *Ae. aegypti* foi feita através de bioensaios utilizando larvas do 4^o estágio jovens, de acordo com metodologia previamente descrita (WHO, 1995). Nos bioensaios, as larvas foram expostas a concentrações obtidas à partir de uma suspensão (5 g/L) de biomassa de cada protoxina Cry liofilizada em água destilada (vide item 4.3). Em cada ensaio foram utilizadas três réplicas de 6 concentrações, além do controle não tratado. Cada réplica foi constituída por 20 larvas colocadas em 100 ml de água destilada em recipientes plásticos. As concentrações utilizadas nos ensaios resultaram em valores de mortalidade entre 10 e 95%. O registro da mortalidade foi feito após 24 h de exposição. Os ensaios foram repetidos três vezes para a validação dos resultados. A concentração de toxina letal para 50% das larvas (CL₅₀) em 24 h de exposição foi estabelecida através da análise de próbites (FINNEY, 1971), utilizando o programa SPSS 10.0.

4.5 Contagem de esporos

A qualidade da biomassa liofilizada utilizada nos bioensaios, foi avaliada a partir da quantificação de esporos nas amostras. Existe uma relação para *B. thuringiensis* em que a produção de um esporo, no citoplasma da célula, corresponde à respectiva produção de um cristal. Dessa maneira, a concentração de esporos permite inferir a existência equivalente de inclusões de cristais na biomassa e, conseqüentemente, de atividade inseticida. A quantificação foi feita através da determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). Para tanto, foi preparada uma suspensão (peso/volume) contendo 10% da biomassa liofilizada de cada uma das amostras analisadas. Esta suspensão, foi submetida a um choque térmico (80°C por 12 minutos e 0°C por 5 minutos), eliminando assim as formas vegetativas e deixando apenas os esporos viáveis. Em seguida foram feitas diluições seriadas e amostras de 5 µl das respectivas diluições foram aplicadas em cinco pontos diferentes de uma placa de Petri contendo meio ágar nutritivo (Anexo 3). As placas foram incubadas por 18 horas a 30°C. Após a incubação foi feita a contagem do número de colônias presentes nos pontos de cada placa. O valor médio em UFC/ml para cada uma das biomassas utilizadas nos bioensaios foi obtido a partir da avaliação de cinco placas.

4.6 Processamento e marcação das toxinas

A biomassa armazenada a -20°C foi utilizada para a obtenção de cristais e por conseguinte de lotes de toxina ativa para os ensaios de ligação. A amostra de biomassa constituída de cristais, esporos e células vegetativas foi submetida a um gradiente contendo sacarose à 67%, 72%, 79% e 84%, e centrifugada (Beckman[®] rotor SW 28) à 25.000 rpm, durante 20 minutos a 4°C (Anexo 4). Após esse processo, foi feita a análise microscópica das fases formadas pela ultra-centrifugação, e aquelas ricas em cristais, foram selecionadas para o processamento *in vitro*. Este consiste de etapas descritas mais abaixo, que simulam o processamento *in vivo* que ocorre no mesêntero das larvas. Os cristais foram solubilizados em NaOH 50 mM durante 1 h a 30°C e, em seguida, a amostra foi neutralizada para atingir um pH 9 com Tris 1 M pH 7,4. A ativação das protoxinas foi feita com a tripsina bovina (Sigma) durante 1 h a 37°C , na proporção de 1:10 (enzima:proteína), seguida da dosagem de proteína. A amostra foi submetida à diálise, em tampão NaPi 0,02 M (0,02 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) pH 8, em uma etapa de 4 horas e outra de 16 horas, a 4°C . Quando necessário, as amostras foram concentradas utilizando polietilenoglicol (15.000 – 20.000 kDa) a fim de obter amostras com concentração $\geq 1\text{mg/ml}$. Para verificar a eficácia da ativação e qualidade das toxinas processadas *in vitro*, foi feita a separação eletroforética (SDS-PAGE) em gel de bis-acrilamida a 12%, das amostras do cristal após sua solubilização, e da toxina ativada obtida ao final do processo. Nesta etapa, foi determinado o padrão de fragmentos clivados, resultante do processamento *in vitro*. Após a verificação, foi adicionada azida sódica (NaN_2 0.02% final) aos lotes de toxina que foram armazenados a 4°C .

As toxinas Cry, após processamento *in vitro*, foram marcadas com iodo I^{125} (Amersham Biosciences), segundo Nielsen-LeRoux e Charles, (1992). A marcação de cada toxina foi feita através da incubação entre 100 μg de proteína e 0,5 mCi de iodo I^{125} , na presença do reagente de iodinação (esferas de N-cloro-benzeno sulfonamida), em tampão PBS pH 7.4 (NaH_2PO_4 2.1 mM/ Na_2HPO_4 14 mM/ NaCl 150 mM) durante 13 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, a proteína marcada foi separada do iodo livre através da passagem da amostra em coluna GF-5[®] (Pierce), seguida da eluição de sete volumes de 200 μl do tampão PBS. Os três volumes finais continham a proteína marcada e foram coletados. Após o procedimento de iodinação foram determinadas a concentração de proteína da amostra e a sua atividade específica (cpm/pmol de proteína).

4.7 Ensaios de ligação *in vitro*

Para identificar e caracterizar a capacidade de ligação das toxinas Cry do Bti ao epitélio de *Ae. aegypti*, foram conduzidos ensaios de ligação *in vitro* entre cada toxina marcada com I¹²⁵ e as preparações de BBMF de larvas. A metodologia utilizada para os ensaios de ligação *in vitro* foi baseada em Nielsen-LeRoux e Charles (1992) e Silva-Filha *et al.* (1997). As incubações foram feitas em microtubos de poliestireno em um volume total de 100 µl, em tampão PBS pH 7,4. Nas competições homólogas/heterólogas e para os ensaios de saturação, as amostras foram incubadas durante 16 horas; para as cinéticas de associação e de dissociação as amostras foram incubadas por até 48 horas. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. Após a incubação, a toxina ligada à BBMF foi separada do sobrenadante por centrifugação (8.700 g, 15 minutos, 4°C) As amostras de BBMF foram colocadas em líquido de cintilação (ScintiSafe Plus®) e analisadas em um contador de emissão de partículas beta (Wallac-Pharmacia®). Os dados obtidos nos ensaios de ligação foram analisados pelo programa Prism® for Windows.

Competição homóloga. Determina a capacidade de uma toxina ligar-se especificamente à BBMF. Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), na presença de concentrações crescentes (0-10 µM) da toxina não marcada, que agiu como competidor homólogo.

Competição heteróloga. Determina a capacidade de competição de uma toxina heteróloga não marcada, pelo sítio de ligação da toxina marcada. Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), na presença de concentrações crescentes (0-10 µM) de uma toxina heteróloga não marcada, que agiu como competidor heterólogo. Foram realizadas ensaios utilizando as diferentes toxinas Cry do Bti para avaliar a competição destas pelos mesmos sítios.

Curva de saturação. Determina a capacidade de saturação de uma ligação específica, quando se estabelece o equilíbrio da reação. Foram incubadas concentrações crescentes (8-200 nM) de toxina marcada e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg). Esta série experimental foi feita na ausência de toxina livre para estimar a capacidade de ligação total. Outra série idêntica foi incubada na presença de um excesso de toxina não marcada (10 µM) para

determinar o nível de ligação não específica observado (“back-ground”). A ligação específica é a diferença entre o valor da ligação total e o valor da ligação não específica.

Cinética de associação e de dissociação. Determina a capacidade de associação de uma toxina marcada à BBMF ao longo do tempo, e avalia a capacidade de dissociação, quando um excesso de toxina não marcada é adicionada ao meio. Foram preparados e analisados três grupos experimentais, contendo um volume total de incubação suficiente para a retirada de amostras de 100 µl, em duplicata, de acordo com os tempos de avaliação preconizados nesse estudo.

- Grupo de associação total: Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg). Amostras de 100 µl foram coletadas após 0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas de incubação. Nessas amostras foi avaliado o padrão de associação total da toxina.
- Grupo de associação não-específica: uma série experimental idêntica à anterior foi feita na presença de um excesso de toxina não marcada (10 µM). Amostras de 100 µl foram coletadas nos mesmos intervalos, para determinar a ligação não-específica.
- Grupo de dissociação: Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), durante 24 h. Após esse período foi adicionado um excesso de toxina não marcada (10 µM). Amostras de 100 µl foram coletadas 24, 25, 26, 28, 32 e 48 horas para avaliar a capacidade de dissociação da toxina marcada, previamente ligada à BBMF.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação das biomassas

Foram obtidas as biomassas correspondentes às cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, que codificam individualmente as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba. Uma vez obtidas essas biomassas, foram feitos semeios em meio sólido, para determinar o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). O nível de esporulação das biomassas indica o seu potencial tóxico, visto que os cristais são produzidos durante esse processo.

Os resultados obtidos mostram que todas as biomassas apresentaram um nível elevado de esporulação ($>10^8$) e que estavam adequadas para avaliar a atividade inseticida das diferentes toxinas Cry, através de ensaios de toxicidade *in vivo* realizados neste trabalho. A maior esporulação observada foi da biomassa Cry4Aa com cerca de $9,2 \times 10^9$ esporos/ml, seguida por Cry4Ba e Cry11Aa com valores aproximados de 10^9 esporos/ml (Tab. 3).

Tabela 3. Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/ml) das biomassas das cepas de *Bacillus thuringiensis* recombinantes expressando as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba.

Placa*	Nº médio de UFC		
	Cry11Aa (diluição 10^{-5})	Cry4Aa (diluição 10^{-7})	Cry4Ba (diluição 10^{-6})
1	41,8	6,2	1,0**
2	42,0	5,4	3,4
3	27,2	4,2	9,6
4	20,4**	2,6	5,2
5	33,4	12,0**	5,8
Média \pm SD	36,1 \pm 7,1	4,6 \pm 1,6	6,0 \pm 2,6
UFC/ml	$7,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$

* Em cada placa foi feito o semeio da 5 μ l da respectiva diluição em 5 pontos distintos e a média foi obtida a partir dos resultados de 4 placas.

** Amostra eliminada da média e do desvio padrão.

5.2 Bioensaios: atividade larvicida *in vivo*

A atividade larvicida das biomassas liofilizadas contendo as toxinas Cry do Bti foi analisada através de bioensaios, utilizando larvas do 3^o/4^o estádios de *Ae. aegypti*. As concentrações letais para 50% de larvas (CL₅₀) expostas durante 24 h às toxinas testadas estão apresentadas abaixo (Tab. 4). A toxina Cry4Ba apresentou a maior toxicidade, seguida da Cry11Aa e Cry4Aa. A concentração letal da cepa do cristal nativo, usado como controle, foi de 0,023 mg/l (MELO SANTOS, 2001). A comparação da toxicidade do cristal nativo com os diferentes componentes tóxicos da família Cry mostra claramente a sua superioridade em termos de atividade inseticida. A toxicidade do cristal Cry4Ba foi a mais elevada, alcançando uma CL₅₀ 5 vezes superior àquela do cristal nativo. O cristal Cry11Aa mostrou a segunda contribuição mais importante seguido da Cry4Aa que, apesar de uma biomassa com excelente nível de esporulação, apresentou uma CL₅₀ cerca de 500 vezes superior àquela do cristal (Tab. 4). Os dados detalhados desta análise estão descritos no Anexo 5.

Tabela 4. Atividade tóxica das biomassas produzidas pelas cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* expressando isoladamente cristais contendo as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, e pela cepa IPS-82, para larvas do 3^o/4^o estágio de *Aedes aegypti*.

Toxina	N ^o de ensaios	CL ₅₀ mg/l ² Média ± SD
Cry11Aa	3	1,350 ± 0,230
Cry4Aa	3	13,046 ± 4,040
Cry4Ba	3	0,123 ± 0,050
Bti nativo ¹	3	0,023 ± 0,002

¹ Liofilizado padrão IPS-82 fornecido pelo Instituto Pasteur (França).

² Concentração letal para 50% das larvas após 24 horas de exposição.

5.3 Avaliação de preparações ricas em *microvilli* intestinal

Foram feitas preparações ricas em *microvilli* do epitélio intestinal (BBMF), para avaliar a capacidade de ligação *in vitro* das toxinas Cry do Bti, ao mesêntero das larvas de *Ae. aegypti*. As preparações de BBMF foram feitas a partir de larvas inteiras de 3^o/4^o estágio, segundo metodologia descrita anteriormente (SILVA FILHA *et al.*, 1997), com a finalidade de garantir um rendimento protéico final adequado, sem haver necessidade de dissecar um grande número de larvas. A análise das preparações mostrou que o rendimento protéico foi de $1,28 \pm 0,63$ mg de proteína de BBMF por grama de larvas inteiras utilizada na preparação. Isto corresponde a cerca de 4% das proteínas encontradas no homogeneizado inicial de larvas. As preparações mostraram a presença de atividade enzimática de ambas as enzimas marcadoras de membrana utilizadas. O enriquecimento, estimado a partir da comparação entre a atividade observada na BBMF e no homogeneizado inicial de ambas as enzimas marcadoras, é cerca de 5 vezes e demonstra que a BBMF é rica em membranas apicais do epitélio intestinal, portanto adequada para o estudo de interação das toxinas Cry (Tab. 5). Os dados detalhados desta análise estão descritos no Anexo 6.

Tabela 5. Avaliação de preparações de frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti* do 3^o/4^o estágio a partir da atividade de enzimas marcadoras de membrana, leucina aminopeptidase - LAP (EC 3.4.11.1) e α -glicosidase – GLI (EC 3.2.1.20).

Enzima	N ^o de amostras	Atividade específica ¹		Enriquecimento ²
		Homogeneizado	BBMF	
LAP	11	$0,089 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,14$	$4,68 \pm 1,36$
GLI	11	$3,250 \pm 0,64$	$15,52 \pm 5,61$	$4,85 \pm 1,57$

¹ Variação da absorbância à 405 nm por hora, ou minuto, por miligrama de proteína (Δ Abs 405 nm/tempo/mg), respectivamente para a GLI e para a LAP.

² Razão entre a atividade específica da BBMF e àquela do homogeneizado inicial de larvas inteiras.

5.4 Processamento *in vitro* das toxinas

Para realizar o estudo da capacidade de ligação das toxinas Cry às preparações de BBMF, foram obtidas as toxinas ativas a partir do processamento *in vitro* das biomassas. Este processamento, simula os eventos de solubilização dos cristais e proteólise das protoxinas que ocorrem *in vivo*, no mesêntero das larvas, quando elas ingerem produtos à base de Bti. Na primeira etapa, correspondente à solubilização dos cristais, foi possível observar a presença de uma banda majoritária de 70 kDa para a protoxina Cry11Aa e uma banda de 130 kDa para Cry4Aa e Cry4Ba (Fig 3A). O tratamento das protoxinas com a tripsina bovina, nas condições estabelecidas neste trabalho, causou uma proteólise gerando os seguintes fragmentos tripsina-resistentes: peptídeos de 38 e 30 kDa para Cry11Aa, 45 e 20 kDa para Cry4Aa e 45 e 18 kDa para Cry4Ba (Fig 3B).

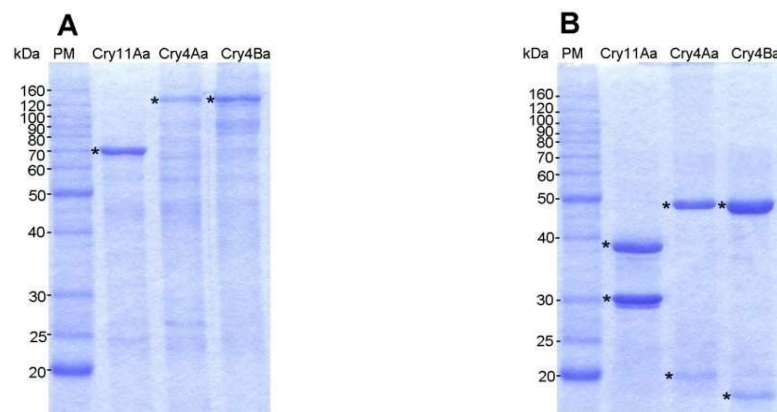


Figura 3. Separação eletroforética (SDS- PAGE) a 12% de amostras de cristais contendo as protoxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* após a solubilização (A) e após a ativação com tripsina bovina (B). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

Neste trabalho foram conduzidos cerca de 10 processamentos *in vitro* de cada amostra de cristais de toxina Cry. Apesar de algumas variações, os fragmentos ativos descritos acima representam o padrão encontrado com maior regularidade após a proteólise. Em alguns ensaios observou-se um padrão de proteínas que pareciam ser produtos intermediários da ação da tripsina, entretanto, todos os lotes de toxina utilizados neste trabalho apresentaram o perfil padrão representado na Fig. 3B.

5.5 Ensaios de ligação

5.5.1 Competições homólogas e heterólogas

Os ensaios de competição mostraram que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba ligam de forma específica à BBMF de *Ae. aegypti* (Fig. 4). Este é o primeiro trabalho que demonstra, de forma quantitativa, a capacidade de ligação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* à membrana apical do epitélio intestinal (BBMF) de larvas desta espécie. A capacidade máxima de ligação específica de cada toxina marcada foi determinada na ausência de um competidor, após uma incubação de 16 horas. A ligação das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba foi de cerca de 3 pMol/mg de proteína de BBMF, sendo a ligação da toxina Cry11Aa mais discreta (Tab. 6).

Os ensaios de competição homóloga realizados mostram que a ligação das toxinas é específica, pois a adição de concentrações crescentes do competidor deslocam a toxina marcada (I^{125}) previamente ligada à BBMF (Fig. 4). O nível de ligação não específica detectado corresponde à base da curva de deslocamento dos respectivos competidores, cerca de 30% na maioria dos ensaios realizados (Fig. 4). Em cada modelo de competição homóloga foi determinado o IC_{50} , que é a concentração do competidor capaz de deslocar 50% da toxina- I^{125} ligada à BBMF, e este é um parâmetro que indica o grau de afinidade da ligação entre a toxina e o receptor. Foram observados valores médios de 88, 99 e 521 nM de IC_{50} , respectivamente para as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba em competições homólogas. Nota-se que a afinidade da toxina Cry4Ba pelo sítio de ligação na BBMF de *Ae. aegypti* é claramente inferior às demais, embora a atividade *in vivo* da biomassa detectada neste trabalho tenha sido a melhor (Tab. 4).

Os ensaios de competição heteróloga conduzidos com a toxina Cry11Aa- I^{125} , mostraram que as toxinas não marcadas Cry4Aa e Cry4Ba são capazes de deslocar a toxina Cry11Aa- I^{125} e conseqüentemente competem pelos mesmos sítios de ligação (Fig. 4A), sendo a afinidade da toxina Cry4Aa maior do que a do competidor heterólogo Cry4Ba, de acordo com os valores de IC_{50} obtidos (Tab. 6). No caso específico do competidor Cry4Ba, não foi possível determinar o IC_{50} através do programa PRISM® e, neste caso, foi adotado um IC_{50} aproximado de 5.000 nM, baseado na observação direta dos valores desta competição no gráfico (Fig 4A).

Os respectivos ensaios de competição heterólogos tendo como toxinas marcadas a Cry4Aa-I¹²⁵ e Cry4B-I¹²⁵ mostraram um comportamento semelhante aquele observado para a toxina Cry11Aa-I¹²⁵ (Fig 4, B e C). Os resultados das competições heterólogas demonstraram que as três toxinas Cry do Bti competem pelos mesmos sítios e partilham uma classe de receptores presentes nas preparações de BBMF (Fig. 4). A análise dos valores de IC₅₀ obtida à partir dos ensaios (Tab. 6) mostram que as toxinas Cry11Aa e Cry4Aa possuem uma afinidade pelos receptores semelhante e maior do que àquela observada para a toxina Cry4Ba, que mostrou a menor capacidade de competição pelos sítios de ligação, nos ensaios *in vitro*.

Os dados obtidos mostram que nenhuma das toxinas Cry apresentam uma afinidade elevada pelo sítio de ligação da BBMF no modelo estudado, apesar da elevada atividade inseticida do cristal do Bti para larvas de *Ae. aegypti*. Outro aspecto investigado nos ensaios foi o eventual incremento da ligação das toxinas marcadas na presença de outro componente Cry. Em todos os ensaios observou-se que a presença da toxina heteróloga em concentração equimolar (30 nM) ou superior àquela da respectiva toxina marcada, não provocou um aumento da ligação à BBMF, demonstrando que a ausência de sinergia entre as toxinas para o reconhecimento do receptor, nestas condições experimentais. Os dados detalhados desta análise desta seção estão descritos no Anexo 7.

Tabela 6. Ensaios de competições homólogas e heterólogas entre as toxinas Cry 11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* marcadas (I¹²⁵) e preparações de frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti* do 3^o/4^o estágio.

Cry-I ¹²⁵	Nº de ensaios	Ligação específica pMol/mg (Média ± SD)	Competidor homólogo/heterólogo	IC ₅₀ ¹ (nM)
11Aa	3	1,64 ± 0,41	11Aa	88 ± 36
	4		4Aa	105 ± 60
	5		4Ba	>5.000
4Aa	6	3,02 ± 1,04	11Aa	162 ± 85
	4		4Aa	99 ± 3
	6		4Ba	411 ± 181
4Ba	3	2,84 ± 1,08	11Aa	141 ± 42
	2		4Aa	161 ± 29
	3		4Ba	521 ± 334

¹ Concentração do competidor que desloca 50% da toxina- I¹²⁵ ligada à BBMF.

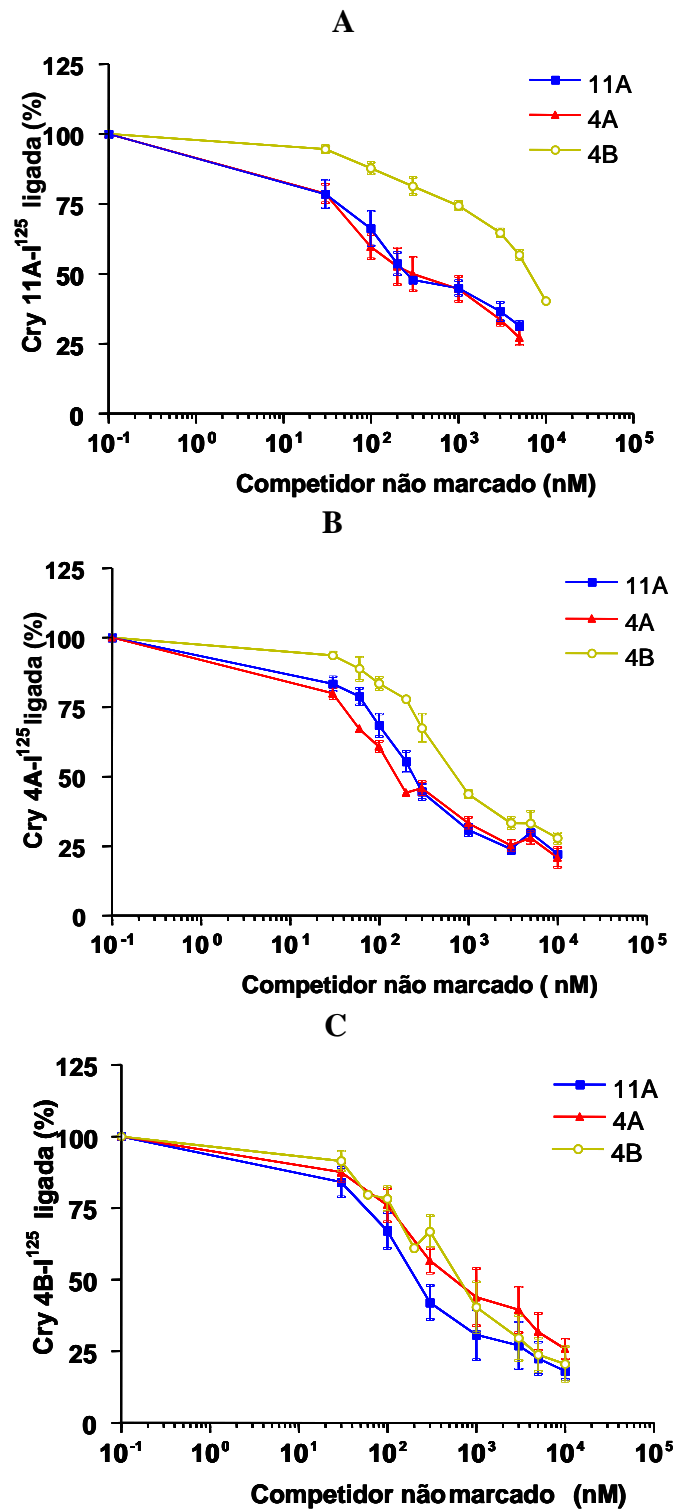


Figura 4. Ensaios de competição *in vitro* entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* marcadas com iodo (I^{125}), e frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de *Aedes aegypti*. Competições entre 30 nM de toxina Cry- I^{125} , 25 μ g de BBMF e concentrações crescentes (0-10 μ M) de competidor homólogo ou

heterólogo, durante 16 h, à temperatura ambiente. Os gráficos mostram a ligação total da toxina- I^{125} , tomando como ponto máximo (100%) o valor observado na ausência de competidor. Cada ponto representa a média de pelo menos 6 replicatas.

5.5.2 Ensaio de saturação

Foi realizada a análise da capacidade de saturação da ligação das toxinas Cry11Aa e Cry4Aa à BBMF. Este parâmetro de ligação indica a quantidade de receptores disponíveis nas preparações. A análise das toxinas Cry11Aa e Cry4Aa mostrou que a ligação específica de doses crescentes de toxina - I^{125} à BBMF, não mostrou um nível de saturação (Fig. 5). Quando a ligação de uma toxina a seu receptor é saturável, observa-se uma ligação crescente até determinado ponto, a partir do qual ocorre uma estabilização da ligação mesmo com o acréscimo de concentrações maiores de toxina marcada. A saturação corresponde ao platô que caracteriza a ocupação de todos os sítios de ligação disponíveis. Em ambos os casos analisados, a ligação específica é dose crescente, entretanto não foi detectado um nível de saturação dos receptores (Fig. 5). Estes resultados indicaram que o equilíbrio da ligação não foi atingido, o que impossibilitou a determinação do parâmetro B_{max} que estima o número de receptores presentes por mg de proteína de BBMF.

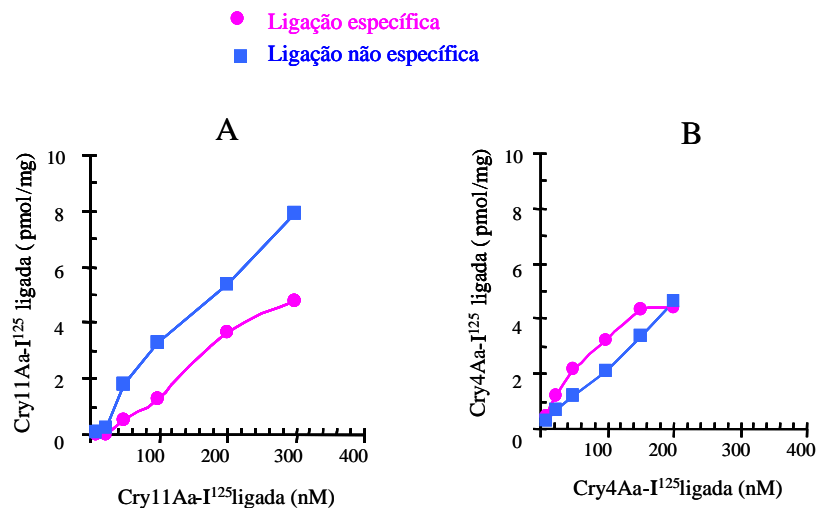


Figura 5. Ensaio de saturação entre as toxinas marcadas- I^{125} Cry11Aa (A) e Cry4Aa (B) e frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti*. Foram incubadas concentrações crescentes (8-300 nM) de toxina- I^{125} com 25 μ g de BBMF, na presença e na ausência de um excesso de toxina não marcada, durante 16 h, à temperatura ambiente.

5.5.3 Cinética de ligação

Em função da ausência do equilíbrio da ligação, no período de 16 h, observado nos experimentos de saturação, foram realizados ensaios para determinar a cinética de associação total (TO), de associação não específica (NE) e a cinética de dissociação (DI) das toxinas- I¹²⁵ em relação à preparação de BBMF. As cinéticas de associação total apresentaram, após 24 horas de incubação, uma capacidade de associação máxima de 5 pmol/mg para as toxinas Cry11Aa e Cry4Aa, e de aproximadamente 3,5 pmol/mg para a toxina Cry4Ba (Fig. 6). A associação não específica manteve-se estável em cerca de 1 pmol/mg para as três toxinas- I¹²⁵ (Fig. 6). Estes resultados mostram que a associação das toxinas Cry à BBMF de *Ae. aegypti* não atinge um equilíbrio durante o tempo observado, pois as curvas de associação das toxinas Cry11Aa e Cry4Aa, ao final de 24 h, não apresentam uma tendência de estabilização (Fig. 6, A e B). Não se pode afirmar a partir destes dados, se a associação contínua observada ao longo do ensaio resulta integralmente da ligação entre a toxina-I¹²⁵ e seus receptores ou se, parte de ligação observada, pode ser uma consequência da oligomerização de moléculas de toxina-I¹²⁵. Para a toxina Cry4Ba, a capacidade de associação é menor e se mostrou mais estável a partir de 8 h de incubação (Fig. 6, C).

A cinética de dissociação foi feita para determinar se a ligação do complexo toxina-receptor após 24 horas de associação é reversível, mediante a adição do competidor não marcado ao meio. Nos três casos estudados a adição de um excesso do competidor homólogo não marcado não provocou um deslocamento significativo da toxina- I¹²⁵ ligada à BBMF (Fig. 6). Podem ser observadas apenas pequenas oscilações em torno do valor de associação total atingido após 24 h de associação. A ausência de dissociação indica que a toxina, após ligar-se ao receptor, tem a capacidade de inserir-se nas membranas, impossibilitando assim o seu deslocamento, devido à presença do competidor no meio.

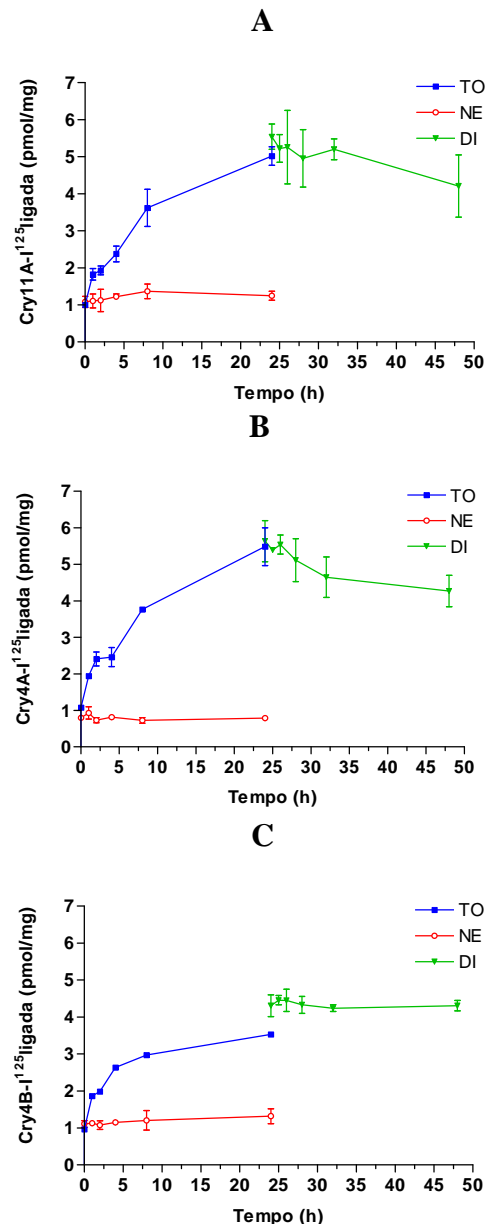


Figura 6. Cinéticas de associação total (TO), de associação não específica (NE) e de dissociação total (DI) entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* marcadas com iodo (I^{125}) e frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti*. Nas amostras de associação, foram incubados 30 nM de toxina- I^{125} e 25 μg de BBMF na ausência (TO) ou presença (NE) de um excesso (10 μM) de competidor não marcado, sendo coletadas amostras em diferentes momentos, durante 24 h. Nas amostras de dissociação (DI), após 24 h de incubação, foi adicionado um excesso de competidor homólogo (10 μM), e foram coletadas diferentes amostras, durante as 24 h subsequentes. Cada ponto analisado é uma média de 4 replicatas. O ensaio foi realizado durante 48 h à temperatura ambiente.

6 DISCUSSÃO

Atividade larvicida individual das toxinas

A análise do grau de esporulação do Bti, em UFC/ml, mostrou que as biomassas das cepas recombinantes apresentaram uma qualidade adequada e similar. Os seus potenciais tóxicos divergiram quando testadas para larvas de *Aedes aegypti*, e observou-se que a atividade larvicida da biomassa Cry4Ba foi a mais alta frente às larvas, nas condições testadas, seguida pela Cry11Aa e Cry4Aa. Esses resultados reproduzem alguns dos achados de Poncet *et al.*, (1995) no tocante à atividade individual das toxinas Cry do Bti em bioensaios para larvas de *Ae. aegypti*, sendo observada a mesma seqüência de toxicidade encontrada neste trabalho. Crickmore *et al.*, (1995) observaram em estudos semelhantes, que a toxina Cry11Aa apresentou a mais alta toxicidade (LC₅₀) para larvas de *Ae. aegypti*, seguida pela Cry4Ba e Cry4Aa. Hughes *et al.*, (2005) analisando as contribuições individuais destas toxinas para larvas do díptero *Chironomus tepperi* observaram que a Cry11Aa e Cry4Ba eram as mais tóxicas para essa espécie. As diferenças observadas nestes estudos podem ser devido a vários fatores que influenciam os resultados, como forma de criação das larvas utilizada e oscilações naturais da susceptibilidade das populações de insetos utilizadas nos bioensaios (WIRTH; FERRARI; GEORGHIOU, 2001). Apesar de haver alguma variação quanto à capacidade individual de cada toxina Cry do Bti para as larvas de dípteros, todos os trabalhos apontam que as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba são as que possuem melhores atividades individuais. Deve ser lembrado ainda que, o cristal nativo é sempre mais tóxico do que as frações individuais ou combinações de toxinas. De fato, a ação inseticida elevada do cristal nativo nos bioensaios, deve-se à ação sinérgica das toxinas Cry componentes, incluindo a toxina Cyt que tem um papel importante na toxicidade (WU; CHANG, 1985; CHILCOTT; ELLAR, 1988; ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992).

Processamento in vitro das toxinas

Nos ensaios de processamento *in vitro* dos cristais contendo as protoxinas Cry do Bti foram obtidos perfis bem definidos de fragmentos ativos para cada uma das três protoxinas. De acordo com trabalhos prévios acerca do processo de ativação das protoxinas Cry do Bti e sua toxicidade para larvas de dípteros, os fragmentos tripsina-resistentes obtidos neste trabalho,

seriam aqueles formados durante o processo *in vivo* e que se ligam aos receptores do epitélio intestinal das larvas desencadeando o processo citopatológico.

No processo de ativação das protoxinas Cry1 de sorovarietades de Bt inseticidas para lepidópteros de aproximadamente 130 kDa, observa-se ao final a formação de um fragmento de aproximadamente 60-70 kDa protease-resistente (DE MAAGD *et al.*, 2003). Já para as protoxinas Cry do Bti de 130 e 70 kDa ativas contra dípteros, observa-se normalmente, ao final do processo de ativação, a formação de dois fragmentos que juntos têm a capacidade de se ligar e formar um dímero de aproximadamente 60-70 kDa (YAMAGIWA *et al.*, 1999; REVINA *et al.*, 2004)

Para a protoxina Cry11Aa, de 70 kDa, observou-se que após sua ativação existe a formação de dois fragmentos de 33 e 36 kDa, correspondendo respectivamente à região N-terminal contendo o domínio I e à região C-terminal englobando os domínios II e III da molécula. Também foi observado nesse trabalho que os fragmentos isolados não possuem atividade tóxica para as larvas-alvo, mas que juntos determinam a presença de toxidade (REVINA *et al.*, 2004). Conclui-se portanto, que após a proteólise deve-se assegurar a presença de fragmentos que contenham os três domínios estruturais, indispensáveis para a ação desta toxina. Trabalhos prévios já demonstram que as toxinas Cry4Aa e Cry4Ba também possuem estruturas tridimensionais com três domínios (ANGSUTHANASOMBAT *et al.*, 2004).

Para as protoxinas de 130 kDa, observou-se, após o processo de ativação da protoxina Cry4A, a formação de fragmentos de 20 kDa e 45 kDa (YAMAGIWA *et al.*, 1999) e da protoxina Cry4B, a formação de fragmentos de 45 e 18 kDa (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992). Foram testados os efeitos na ação tóxica dos fragmentos da Cry4A e, de forma semelhante aos fragmentos da Cry11Aa, eles apresentaram atividade unicamente quando testados em associação, mostrando novamente que o dímero formado por eles era o responsável pela toxicidade para as larvas-alvo (YAMAGIWA *et al.*, 1999). A Cry4B, a exemplo dos fragmentos anteriores, também é capaz de formar um dímero (YAMAGIWA *et al.*, 1999). A ausência de toxidade do fragmento de 45 kDa para larvas indica também que nesse caso, a presença de dois fragmentos, contendo todos os domínios, é necessária para desencadear as ações tóxicas da Cry4Ba (CHUNGJATUPORCHAI *et al.*, 1988).

As etapas de solubilização e ativação das protoxinas são fundamentais para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos observados. Uma alteração no pH intestinal das larvas ou no processamento proteolítico pode acarretar uma mudança na ativação *in vivo* das protoxinas

e conseqüentemente na diminuição dos efeitos tóxicos observados. E, até em certos casos, ser o responsável pela resistência em insetos (OPPERT, 1999). O êxito na obtenção dos fragmentos Cry ativos às larvas de *Ae. aegypti* descritos nesse trabalho, foi etapa fundamental para os estudos posteriores de sua capacidade de ligação à BBMF, *in vitro*.

Qualidade das preparações de microvilli intestinal

As preparações de BBMF foram feitas a partir de larvas inteiras, ao invés de amostras de intestinos dissecados, devido às dimensões das larvas de *Ae. aegypti*, de acordo com metodologia descrita previamente para obtenção de BBMF de larvas de *Culex* (SILVA-FILHA *et al.*, 1997). As análises das BBMF de *Aedes* confirmaram a qualidade destas preparações pois, a partir de larvas inteiras, houve um enriquecimento de cerca de 5 vezes das enzimas marcadoras de membrana apical do intestino, leucina aminopeptidase e α -glicosidase, em relação ao homogeneizado inicial, o que demonstra que as preparações utilizadas eram ricas em *microvilli* intestinais. Em outro trabalho, também utilizando larvas inteiras de *Ae. aegypti* para obtenção de BBMF, observou-se que o enriquecimento, medido através das enzimas marcadoras de membrana leucina aminopeptidase e γ -glutamil transferase, foi cerca de 8 vezes. Ainda nesse trabalho a comparação do enriquecimento de BBMF feitas a partir de larvas inteiras ou de amostras de intestinos dissecados, mostrou que os tecidos contaminantes decorrentes do uso das larvas inteiras não interferem no processo de precipitação, que é etapa chave na separação da BBMF (MACINTOSH; LIDSTER; KIRKHAM, 1994). As preparações de BBMF feitas a partir de ambos os métodos apresentaram capacidades semelhante de ligação à toxina-I¹²⁵, como foi o caso da toxina Cry1Ab em larvas de *Plutella xylostella* (ESCRICHE; SILVA; FERRE, 1995).

O processo de dissecção do intestino de larvas para obtenção de grandes quantidades de material é considerado uma atividade laboriosa, conforme a dimensão das larvas utilizadas. A otimização do processo de obtenção de BBMF a partir de larvas inteiras como foi demonstrado em trabalho com larvas de *Plutella xylostella* (MACINTOSH, S.; LIDSTER, B.D.; KIRKHAM, 1994) e mais tarde com larvas de dípteros (SILVA FILHA *et al.*, 1997), permitiram a produção de BBMF em escala considerável para seu emprego em vários estudos.

Capacidade de ligação das toxinas, in vitro

Os resultados obtidos demonstraram que as toxinas Cry do Bti possuem sítios de ligação específicos na BBMF de *Ae. aegypti*, porém foi observada uma baixa afinidade do complexo toxina-receptor. Este parâmetro diz respeito à primeira etapa do modo de ação das toxinas, o reconhecimento do receptor. A toxina Cry11Aa foi aquela que obteve melhor afinidade nos ensaios de competição homóloga, cujo o IC₅₀ foi de 88 nM. Entretanto, este valor indica um nível de afinidade fraca, quando comparado a alguns modelos de interação entre toxinas Cry1 e BBMF de lepidópteros-alvo. Nestes modelos de ligação, as toxinas Cry1 mostram uma alta afinidade da toxina pelos receptores das larvas-alvo. Trabalhos avaliando a interação de toxinas Cry1 com BBMF de diferentes lepidópteros, como *Bombix mori*, *Spodoptera littoralis*, *S. exigua* entre outros, registraram valores de afinidade da ordem de 10 nM, apontando uma afinidade bem superior àquelas encontradas neste trabalho para as toxinas Cry do Bti e BBMF de *Ae. aegypti* (RAUF; ELLAR, 1999; SANCHIS; CHAUFAX; PAURON, 1994).

Estes achados corroboram a idéia de que existem outros fatores que permeiam a interação das toxinas Cry do Bti com o epitélio intestinal das larvas, visto que a afinidade foi baixa e a toxicidade *in vivo* é alta. Um fato importante em relação à atividade *in vivo* do cristal nativo, é a presença da toxina Cyt1A. Trabalhos relativos a larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à toxina binária do *B. sphaericus*, demonstraram que o uso da toxina Cyt1A em combinação com a toxina binária, reduziu drasticamente o aparecimento da resistência nas larvas. De fato, a Cyt1A parece agir sobre as células fazendo com que a toxina Bin possa agir sem ser mediada por seus receptores, visto que estes estão ausentes da *microvilli* dos insetos resistentes (WIRTH *et al.*, 2005). Sabe-se que a atividade da toxina Cyt, *in vitro*, é de natureza citolítica e parece não envolver receptores específicos, podendo inserir-se espontaneamente em membranas contendo fosfolipídeos insaturados e formar poros ou, alternativamente, ter ação do tipo detergente na superfície das membranas celulares (LI; KONI; ELLAR, 1996; BUTKO, 2003). Na presença das toxinas Cry do Bti, a ligação da Cyt1A parece ser direcionada para as regiões do intestino médio, nas quais as toxinas Cry ligam-se a receptores específicos (LI; KONI; ELLAR, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998). Tal fato sugere uma elevada associação entre as toxinas Cry e a Cyt1A, o que pode ser a base das interações sinérgicas para larvas de dípteros (TABASHNIK, 1992; GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992). De fato, um trabalho recente mostrou que a toxina Cry11Aa e Cyt1A têm a capacidade de se ligar através de epítomos existentes em ambas as moléculas e,

ensaios de interação mostraram que a ligação da toxina Cry11Aa à BBMF de *Ae. aegypti* foi otimizada pela presença da Cyt1A. Assim, há evidências de que a Cyt1A serve como receptor e que se liga no domínio II nas alças α 8 e β 4 da Cry11Aa, que estão envolvidas na ligação ao receptor de membrana (PÉREZ *et al.*, 2005). Este dado reforça a idéia da necessidade de associação entre as toxinas Cry e a Cyt, para a interação com o epitélio intestinal das larvas-alvo.

Nos ensaios de saturação preliminares observou-se que a ligação da toxina marcada a seus receptores não se estabilizou. A ausência de saturação na ligação pode estar associada à formação de oligômeros da toxina. Estudos com a toxina Cry1Ab e BBMF do lepidóptero *Manduca sexta*, mostram que a oligomerização é um passo necessário para a formação de poros e, portanto, para a toxicidade (SOBERÓN *et al.*, 2000). Estudos relativos à estrutura e distribuição da toxina Cry4Ba em membranas lipídicas mostram que a toxina insere-se na membrana preferencialmente através de estruturas oligoméricas (tetrâmeros), ao invés da molécula monomérica (PUNTHEERANURAK *et al.*, 2005). Nas cinéticas de associação ficou claro que a tendência de agregação da toxina-I¹²⁵ era um processo que prosseguiria por um tempo indeterminado. O fato de não ter sido observada a dissociação das toxina-I¹²⁵ mostrou que a sua ligação à membrana é um processo irreversível correspondente à segunda etapa do modo de ação, quando ocorre a inserção da toxina na membrana levando à formação de poros nas células. Em alguns modelos de ligação a alta afinidade *in vivo* não está correlacionada à afinidade inicial da ligação, observada a partir da formação do complexo toxina-receptor (IHARA *et al.*, 1993). Os nossos resultados sugerem que as toxinas Cry do Bti se enquadram nesta categoria. Neste trabalho, por exemplo, um competidor heterólogo com atividade específica para lepidópteros, Cry1Ac, foi capaz de deslocar as toxinas-I¹²⁵ do Bti ligados à BBMF (dados não apresentados). Depois, constatou-se que já havia relato de ligação de toxinas Cry à BBMF de insetos que não são susceptíveis, como o exemplo de Cry1Ac para larvas de *S. frugiperda* (GARCZYNSKI; ADANG, 2000). Isso sugere mais uma vez, que em alguns modelos, os efeitos *in vivo* das toxinas Cry não estão necessariamente relacionados à capacidade inicial de reconhecimento e ligação aos receptores, mas sim ao caráter irreversível da ligação.

A ausência de sinergia entre as toxinas nos ensaios de ligação *in vitro*, mostra que a afinidade pelos receptores não é melhorada na presença de mais de uma toxina Cry. De fato, a sinergia das toxinas Cry observada nos ensaios de atividade *in vivo* não foi detectada nos ensaios de ligação *in vitro*, no modelo estudado. É possível que para a interação das toxinas Cry com os receptores, a toxina Cyt seja um fator determinante para a sinergia (PEREZ *et al.*,

2005). Também deve ser considerada a hipótese das toxinas Cry do Bti interagirem com outras biomoléculas, como glicolipídeos, antes da etapa de reconhecimento dos receptores, como foi estudado no modelo de ligação de toxinas ativas para o nematóide *Caenorhabditis elegans* (CRICKMORE, 2005).

Outro aspecto a ser investigado é o estudo da afinidade através de outra metodologia, pois a incorporação de iodo na tirosina presente nas toxinas marcadas poderia ter algum efeito sobre a sua capacidade de ligação, visto que foi demonstrado que a presença da tirosina (Tyr-202) nas alças $\alpha 4$ e $\alpha 5$ do domínio II da Cry4Aa, é essencial para a toxicidade (PORNWIROON *et al.*, 2005). Entretanto, não sabemos ao certo se esse achado para a Cry4Aa pode ser válido para as demais toxinas, uma vez que a baixa afinidade foi observada para todas as toxinas Cry do Bti. Os conjuntos de achados neste trabalho, no entanto, apontam preferencialmente que a toxicidade das proteínas Cry do Bti não estaria relacionada a um padrão de alta afinidade com receptores, mas sim com a etapa irreversível do modelo de ligação que corresponderia à inserção da toxina na membrana celular, seguida pela formação de poros e danos celulares que levariam à morte das larvas.

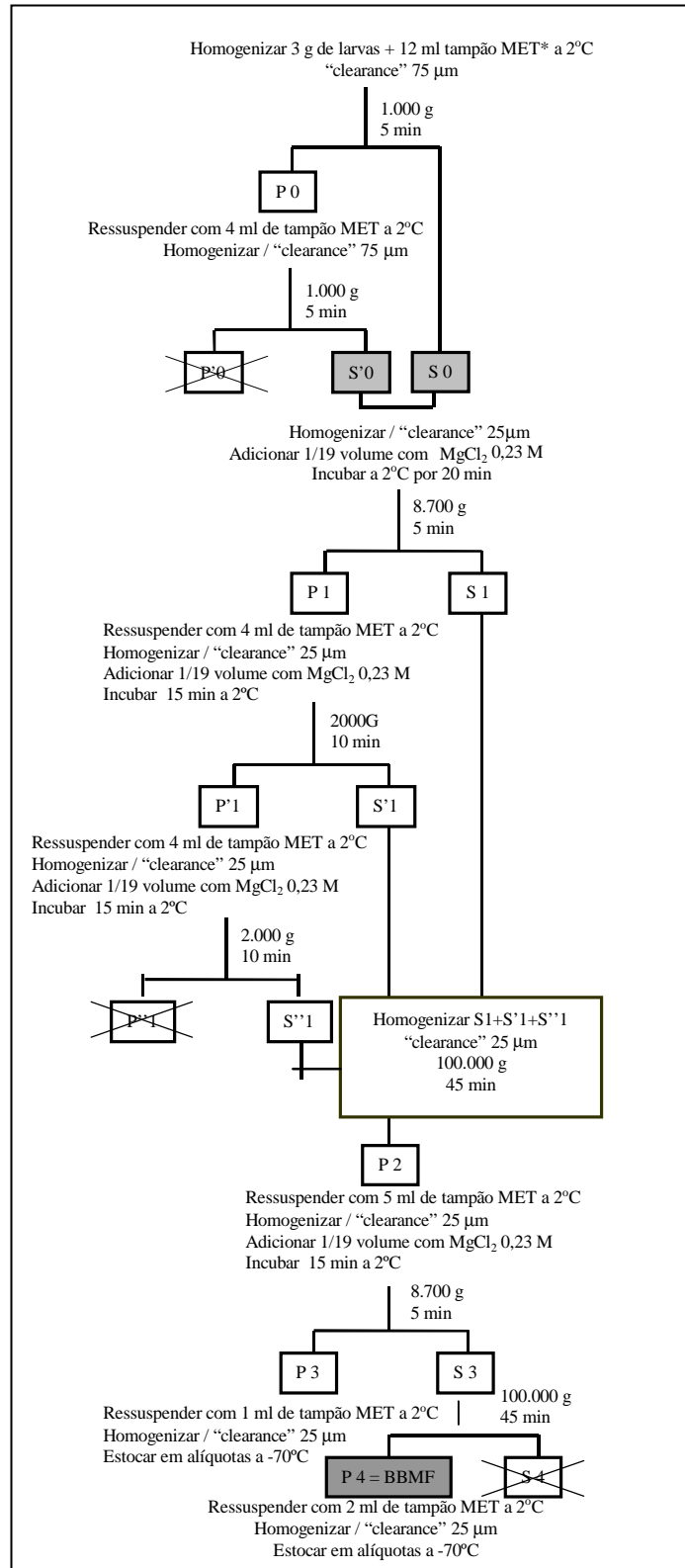
7 CONCLUSÕES

A análise da interação das toxinas Cry do Bti com o mesêntero das larvas de *Aedes aegypti* realizada neste trabalho, mostrou que:

- As protoxinas Cry do Bti dão origem, após o processamento *in vitro*, a dois fragmentos que formam um dímero responsável pela ação tóxica.
- A toxicidade individual para larvas de *Ae. aegypti* é decrescente para Cry4Ba, Cry11Aa e Cry4Aa.
- As toxinas Cry do Bti possuem receptores específicos no mesêntero de *Ae. aegypti* e partilham uma classe comum de sítios de ligação.
- Não ocorre sinergia entre as toxinas Cry para a interação com os receptores *in vitro*, ao contrário da sinergia observada para a ação tóxica *in vivo*.
- A toxicidade não está relacionada a um padrão de alta afinidade entre toxina e receptores, mas sim à natureza irreversível da ligação.
- Outros fatores, além da ligação individual das toxinas Cry aos seus receptores, são essenciais para produzir o efeito tóxico do cristal.

8 ANEXOS

Anexo 1: Esquema do protocolo para a obtenção de BBMF.



*Tampão MET: Manitol 300 mM, EDTA 5mM, Tris 20 mM, pH 7,4.

Anexo 2: Meio de cultura líquido para *Bacillus thuringiensis*.

Componentes	Para 1 litro
Bacto peptona (marca Difco)	7,50 g
Solução KH ₂ PO ₄ (68g/l)	100 ml
Solução mãe 1	10 ml
Solução mãe 2	10 ml
Solução mãe 3	10 ml
H ₂ O destilada ou MilliQ	Q.s.p. 1000 ml

- Ajustar o pH para 7.4 com NaOH 0.5 M.
- Colocar 120 ml do meio em cada Erlenmeyer de 1 litro estéril (forno, 180° C durante 2h).
- Autoclavar 20 min a 120°C.
- No momento do inóculo, adicionar ao meio a glicose (1% final) e eritromicina (25µg/ml final).

Solução mãe 1

- Sulfato de magnésio (Mg SO₄, 7.H₂O) 0,615 g
- Sulfato de manganês (Mn SO₄, 1H₂O) 0,009 g
- Sulfato de zinco (ZnSO₄, 7H₂O) 0,070 g
- H₂O Q.s.p. 50 ml

Aquecer moderadamente para auxiliar a dissolução e ajustar para o volume final de 50 ml.

Filtrar em fluxo laminar.**Solução mãe 2**

- Sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃ (3mM) 0,10 g*
- H₂O destilada 5,0 ml
- Ácido sulfúrico H₂SO₄ 0,15 ml
- H₂O Q.s.p. 50 ml

* Para FeSO₄.7H₂O (sulfato ferroso) usar 13 mM

Aquecer moderadamente cerca de 4 min e ajustar para o volume final para 50 ml.

Filtrar em fluxo laminar e armazenar a 8°C.

Solução mãe 3

- Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$) 0,735 g
- H_2O destilada Q.s.p. 50 ml

Filtrar em fluxo laminar e armazenar a 8°C .

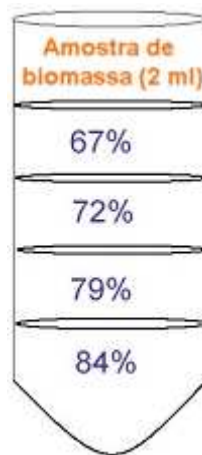
Anexo 3: Meio ágar nutritivo.

- Extrato de carne 3 g
- Peptona de Carne 5 g
- Ágar 25 g
- Q.s.p. 1 litro

Autoclavar e distribuir nas placas de forma homogênea.

Anexo 4: Separação de cristais do Bti.

- Preparar soluções de sacarose nas concentrações de 67%, 72%, 79% e 84%.
- Preparar a biomassa: adicionar detergente Triton 100 a uma concentração final de 0.02%, e sonicar por um tempo total de 4 minutos em ciclos de 3 segundos, durante 30 segundos, numa potência de 100W.
- Depositar em tubo cônico para centrífuga 6,5 ml de cada solução de sacarose, em ordem decrescente de densidade, ver figura abaixo.
- Verificar a formação correta do gradiente.
- Depositar cerca de 2 ml da amostra de biomassa na parte superior dos tubos.
- Centrifugar à 25.000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Beckman[®], rotor SW 28).
- Recuperar as fases de interesse com a ajuda de uma pipeta.
- Lavar as amostras duas vezes com água destilada, intercalando com centrifugações a 12.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C (Beckman[®] rotor JA14).
- Armazenar as amostras a -20°C.



Anexo 5: Tabela de atividade tóxica de biomassas.

Atividade tóxica das biomassas produzidas por cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* expressando isoladamente os cristais contendo as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, para larvas do 3^o/4^o estágio de *Aedes aegypti*.

Biomassa	Data	N ^o de larvas	CL ₅₀ mg/l ¹	Limites fiduciais (95%)
Cry11Aa	12.07.2005	420	1,65	(1,20 - 2,37)
	27.07.2005	300	1,10	(0,87 - 1,35)
	02.08.2005	420	1,30	(0,95 - 1,75)
Cry4Aa	16.08.2005	300	8,63	(6,84 - 11,52)
	23.08.2005	300	16,57	(10,97 - 29,16)
	26.09.2005	420	13,94	(8,66 - 19,43)
Cry4Ba	19.10.2005	300	0,18	(0,080 - 0,27)
	05.12.2005	300	0,097	(0,074 - 1,22)
	12.12.2005	420	0,092	(0,072 - 0,12)

¹ Concentração letal para 50% das larvas após 24 horas de exposição

Anexo 6: Avaliação de preparações de *microvilli* intestinal de larvas de *Aedes aegypti*.

Preparações de frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti* do 3^o/4^o estágio e avaliação da atividade de enzimas marcadoras de membrana, leucina aminopeptidase - LAP (EC 3.4.11.1) e α -glicosidase - GLI (EC 3.2.1.20).

Data	Rendimento protéico ¹	Atividade específica ²				Enriquecimento ³	
		Homogeneizado		BBMF		LAP	GLI
		LAP	GLI	LAP	GLI	LAP	GLI
04.02.04	0,97	0,113	3,52	0,448	18,02	3,97	5,12
31.05.04	1,37	0,086	2,15	0,482	14,31	5,62	6,66
14.07.04	0,72	0,092	2,55	0,542	15,53	5,87	6,09
06.08.04	1,04	0,095	2,50	0,463	11,50	4,88	4,60
21.12.04	1,11	0,086	3,13	0,327	12,78	4,00	4,08
25.01.05	1,28	0,091	3,59	0,374	17,62	4,12	4,91
15.04.05	1,90	0,088	4,09	0,365	15,37	4,16	3,76
27.06.05	2,22	0,089	3,79	0,218	7,98	2,43	2,11
30.06.05	2,30	0,055	3,24	0,179	9,28	3,28	2,86
21.09.05	0,37	0,104	4,06	0,591	28,23	5,67	6,95
14.10.05	0,76	0,080	3,23	0,577	20,14	7,24	6,24
M \pm SD	1,28 \pm 0,63	0,089 \pm 0,01	3,25 \pm 0,64	0,42 \pm 0,14	15,52 \pm 5,61	4,68 \pm 1,36	4,85 \pm 1,57

¹ Rendimento de miligramas de proteína de BBMF por grama de larva inteira utilizada.

² Variação da absorbância à 405 nm por hora ou minuto por miligrama de proteína (Δ Abs 405nm/tempo/mg), respectivamente para a GLI e para a LAP.

³ Razão entre a atividade específica da BBMF e àquela do homogeneizado inicial de larvas inteiras.

Anexo 7: Dados individuais dos ensaios de competição.

Ensaio de competições homólogas e heterólogas entre as toxinas Cry 11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis israelensis* marcadas (I^{125}) e preparações de frações de *microvilli* intestinal de larvas de *Aedes aegypti* do 3^o/4^o estágio.

Toxina- I^{125} (30nM)	IC ₅₀ (nM) competidor não marcado ¹		
	Cry11Aa	Cry4Aa	Cry4Ba
Cry11Aa	108	168	-
	110	146	-
	46	57	-
	-	49	-
	Média ± SD	88 ± 36	105 ± 60
Cry4Aa	67	99	292
	100	103	190
	177	100	578
	301	94	264
	211	-	543
	117	-	599
Média ± SD	162 ± 85	99 ± 3	411 ± 181
Cry4Ba	181	141	906
	146	182	333
	96	-	323
Média ± SD	141 ± 42	161 ± 29	521 ± 334

¹ Concentração do competidor que desloca 50% da toxina marcada ligada à BBMF.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produces so much insecticidal crystal protein? **J. Bacteriol.**, v. 21, p. 6027-6032, 1995.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, V.; ELLAR, D.J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 94, p. 63-68, 1992.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; UAWITHYA, P.; LEETACHEWA, S.; PORNWIROON, W.; OUNJAI, P.; KERDCHAROEN, T.; KATZENMEIER, G.R.; PANYIM, S. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 304-313, 2004.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Biological control program against Simuliidae in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 131-133, 1995.

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

ARONSON, A.I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 1195, p. 1-8, 2001.

Bacillus thuringiensis toxin nomenclature:
www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em 11 de Agosto 2005.

BECKER, V.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, M.J.; HIGGS, S (eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***, John Wiley & Sons Ltd., Londres, 1993, p. 147-169.

BECKER, N.; LUDWIG, M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-yr application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 2, p. 221-224, 1993.

BECKER, V. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds.), **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiouv**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p.383-398.

BECKER, V. Biological control. In: BECKER, V.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; DAHL, C.; LANE, J.; KAISER, A (eds.). **Mosquitoes and their control**. Kluwer Academic Publishers, New York, 2003, p. 345-485.

BOONSERM, P.; ELLAR, D.; LI, J. Crystalization and x-ray diffraction studies of a mosquito-larvicidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Acta Crystallogr.**, v. 59, p. 591-594, 2003

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

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

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.; SOARES, S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 199-203, 2004.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 605-613, 1998.

BROWNBRIDGE, M.; ONYANGO, J. Screening of exotic and locally isolated *B. thuringiensis* (Berliner) strains in Kenya for toxicity to the spotted steam borer, *Chilo partellus* (Swinhoe). **Trop. Pest Manag.**, v. 38, p. 7-91, 1992.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2415-2422, 2003.

BUZDIN, A.A.; REVINA, L.P.; KOSTINA, L.I.; ZALUNIN, I.A.; CHESTUKHINA, G.G. Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, p. 540-546, 2002.

CARVALHO, L.R. **Características biológicas, aspectos moleculares e busca de atividades entomotóxicas em linhagens autóctones de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1915, dos sorovares *oswaldocruzi* (H-38) e *brasiliensis* (H-39)**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2005, 137 p. (Dissertação, Doutorado em Biologia Parasitária).

CENEPI-FUNASA/MS. <http://sis.funasa.gov.br/dw/dm01/HTML_P/020103/27>. Acesso em: 15 de Outubro 2003.

CHILCOTT, C.V.; ELLAR, D.J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 9, p. 2551-2558, 1988.

CHUNGJATUPORNCHAI, W.; HÖFTE, H.; SEURINK, J.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; VAECK, M. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. **Eur. J. Biochem.**, v. 173, p. 9-16, 1988.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994, 225 p.

CRICKMORE, V.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A.; ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 249-254, 1995.

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

CRICKMORE, V. The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX C. (eds.). **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiöv**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 65-79.

CRICKMORE, V. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 347-350, 2005.

DAÍ, S-M.; GILL, S.S. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 23, p. 273-283, 1993.

DAMGAARD, P.H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX C. (eds.). **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiöv**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 23-40.

DE BARJAC, H; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, v. 35, p. 233-240, 1990.

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

DELÉCLUSE, A.; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Expression of *cry4A* e *cry4B* genes, independently or in combination, in crystal minus strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3922-3927, 1993.

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V.J.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J-F; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds.), **Entomopathogenic bacteria from laboratory to field applicatiiov**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 101-122.

ESCRICHE, B.; SILVA, F.J.; FERRE, J. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) crystal protein. **J. Invert. Pathol.**, v. 65, p. 318-320, 1995.

FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FELDMANN, F.; DULLEMANS, A.; WAALWIJK, C. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus turingiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2601-2605, 1995.

FERNANDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M.H.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 3508-3514, 2005.

FERNANDEZ, L.E.; AIMANOVA, G.K.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.**, v. 393, p. (no prelo), 2006.

FINNEY, D.J. **Probit analysis – a statistical treatment of the sigmoid response curve** - 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1971, p. 50-80.

GARCZYNSKI, S.F.; ADANG, M.J. Investigations of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function. In: CHARLES, J-F; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds.). **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiiov**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 181-197.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 1095-1101, 1997.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 615-636, 1992.

GLAIRE, T.R.; O'CALLARGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. John Wiley and sons, Chichester, 2000, 350 p.

GORCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **J. Mol. Biol.**, v. 254, p. 447-464, 1995.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 371-391, 2000.

HOFMAN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HOFFE, H.; VAN-RIE, J.; JANSEN, S.; VAN-MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

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

HUGHES, P.A.; STEVENS, M.M.; PARK, H.W.; FEDERICI, B.A.; DENNIS, E.S.; AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 88, p. 34-39, 2005.

IHARA, H.; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombix mori*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 200-204, 1993.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R C. Transovarian transmission of dengue 3 by *Aedes aegypti*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 4, p. 324-330, 1995.

KHIN, M. M.; THAN, K. A. Transovarian transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p. 590-594, 1983.

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

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, v. 2, p. 257-262, 1994.

KONNI, P.A.; ELLAR, D.J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxins. **Microbiology**, v. 140, p. 1869-1880, 1994.

KUMAR, P.A.; SHARMA, R.P.; MALIK, V.S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 1-43, 1996.

KURTAK, D.; BACK, G.; CHALIFOUR, A.; DOANNIO, J.; DOSSUO-YOVO, J.; DUVAL, J.; GUILLET, P.; MEYER, R.; OCRAN, M.; WHALE, B. Impact of *B. t. israelensis* on black-fly control in the onchocerciasis control programme in west Africa. **Israel J. Entomol.**, v. 23, p. 21-38, 1989.

LEE, M.K.; MILNE, R.E.; GE, A.Z.; DEAN, D.H. Location of a *Bombix mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 3115-3121, 1992.

LECADET, M. M.; FRANCHON, E.; COSMAO, D. V.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; THIÉRY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 660-672, 1999.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 $^{\circ}$ A resolution. **Nature**, v. 353, p. 815-821, 1991.

LI, J.; KONI, P.A.; ELLAR, D.J. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J. Mol. Biol.**, v. 257, p. 129-152, 1996.

MACINTOSH, S.C.; LIDSTER, B.D.; KIRKHAM, C.L. Isolate of brush border membrane vesicles from whole Diamondback (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. **J. Invert. Pathol.**, v. 63, p. 97-98, 1994.

MARDINI, L.B.; SOUZA, M.A.; RABINOVICHT, L.; ALVES, R.S.; SILVA, C.M. Field studies with the bacterial larvicide INPALBAC for *Simulium* spp. in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 679-681, 1999.

MARTIN, P.A.W.; TRAVERS, R.S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 2437-2442, 1989.

MEADOWS, M.P.; ELLIS, D.J.; BUTT, J.; JARRET, P.; BURGESS, H.D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1344-1350, 1992.

MELO-SANTOS, M.A.V. **Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2001, 74 p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Animal)

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

NIELSEN-LEROUX, C; CHARLES, J.F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, v. 210, p. 585-590, 1992.

OPPERT, B. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 42, p. 1-12, 1999.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L.E.; SUN, J.; FOLCH, J.L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 18303-18308, 2005.

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

PONCET, S.; ANELLO, G.; DELÉCLUSE, A.; FLIER, A., RAPOPORT, G. Role of the CryIVD polypeptide in the overall toxicity of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3928-3930, 1993.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **J. Invert. Pathol.**, v. 66, p. 131-135, 1995.

PORCAR, M.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. **J. Appl. Microbiol.**, v. 4, p. 309-316, 2002.

PORNWIROON, W.; KATZENMEIER, G.; PPAYNIM, S.; ANGSUTHANASOMBAT, C. Aromaticity of Tyr-202 in the alpha4-alpha5 loop is essential for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, p. 292-297, 2005.

PUNTHEERANURAK, T; STROH, C.; ZHU, R.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; HINDTERDORFER, P. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. **Ultramicroscopy**, v. 105, p. 115-124, 2005.

RABINOVITCH, L.; BRAZÃO-E-SILVA, C.M; ALVES, R.S.A- Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna-SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000, p. 17-90.

RAJAMOHAN, F.; LEE, M.K.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 60, p. 1-27, 1998.

RAUF, M.A.; ELLAR, D.J. Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from whole *Aedes aegypti* larvae. **J. Invert. Pathol.**, v. 75, p. 45-51, 1999.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.F. *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **FEBS Lett.**, v. 362, p. 111-115, 1995.

REGIS, L.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends Parasitol.**, v. 8, p. 377-380, 2001.

REVINA, L.P.; KOSTINA, L.I.; GANUSHKINA, L.A.; MILKHAILOVA, A.L.; ZALUIN, I.A.; CHESTUKHINA, G.G. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to N- and C- moieties restores its original biological activity. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, p. 181-187, 2004.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vector and dengue virus-vector relationships. In: GLOUBER, D.J.; KUNO, G.(eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. CAB Publishing, Wallingford, p. 45-60, 1997.

RUAS-NETO, A.L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como alternativa no controle de simulídeos no Rio Grande do Sul: susceptibilidade a campo. **B. Saúde**, v. 2, p. 21-26, 1984.

SANCHIS, V.; CHAUFAX, J.; PAURON, D. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombix mori*. **FEBS Lett.**, v. 353, p. 259-263, 1994.

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

SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. larvae. **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 754-761, 1997.

SINGH, G.J.P.; SCHOUDEST, L.P.J.R.; GILL, S.S. The toxic action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Aedes aegypti* *in vivo*. **Pesticide Biochem. Physiol.**, v. 26, p. 36-46, 1985.

SOBERÓN, M.; PÉREZ, R.V.; VALDÉZ, M.E.V.; LORENCE, A.; GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 191, p. 221-225, 2000.

TABASHNIK, B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3342-3346, 1992.

THOMAS, W.E.; ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **J. Cell. Sci.**, v. 60, p. 181-197, 1983.

WARD, E.S.; ELLAR, D.J. Assignment of the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Lett.**, v. 190, p. 232-236, 1985.

WIRTH, M.C.; FERRARI, J.A.; GEORGHIOU, G.P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean islands of Cyprus. **J. Econ. Entomol.**, v. 4, p. 920-928, 2001.

WIRTH, M.C.; JIANNINO, J.A.; FREDERICI, B.A.; WALTON, W.E. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. **J. Med. Entomol.**, v. 5, p. 935-941, 2004.

WIRTH, M.C.; JIANNINO, J.A.; FREDERICI, B.A.; WALTON, W.E. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invert. Pathol.**, v. 88, p. 154-162, 2005.

World Health Organization (WHO). Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvae. **TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.1-24**, 1995.

WU, D.; CHANG, F.V. Sinergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Lett.**, v. 190, p. 232-236, 1985.

YAMAGIWA, M.; ESAKI, M.; OTAKE, K.; INAGAKI, M.; KOMANO, T.; AMACHI, T.; SAKAI, H. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 3464-3469, 1999.

YAMAGIWA, M.; KAMAUCHI, S.; OKEGAWA, T.; ESAKI, M.; OTAKE, K.; AMACHI, T.; KOMANO, T.; SAKAI, H. Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical *microvilli* of larval midgut of *Culex pipiens*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 11, p. 2419-2427, 2001.

ZINIU, Y.; LONGSHEIG, Y. Large-scale field evaluation of larvicidal preparation of *Bacillus thuringiensis* H-14 for mosquito control in town and rural environment in China. **Bull. Soc. Vector Ecol.**, v. 2, p. 189-195, 1990.

Manuscrito do artigo a ser
submetido para publicação
em revista indexada

**Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o
mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

H. B. M. Beltrão, M. H. N. L. Silva-Filha

Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

H. B. M. Beltrão, M. H. N. L. Silva-Filha

Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo s/n, Recife-PE, 50670-420 Brasil

RESUMO

O *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) é um importante entomopatógeno utilizado na produção de larvicidas para o controle do *Aedes aegypti*, vetor da dengue. O objetivo principal do trabalho foi determinar, através de ensaios *in vitro* de natureza quantitativa, a capacidade de ligação de cada toxina Cry do Bti a preparações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Ae. aegypti*. Os bioensaios demonstraram que a toxicidade para larvas foi decrescente para CRy4Ba, Cry11Aa e Cry4Aa. Após o processamento *in vitro* os fragmentos ativos das toxinas Cry obtidos foram de 38 e 30 kDa para Cry11Aa, e cerca de 45 e 20 kDa para Cry4Aa e Cry4Ba. As preparações de BBMF mostraram um enriquecimento enzimático de marcadores de membrana apical. Nos ensaios de competição homóloga as toxinas apresentaram uma ligação de 2-3 pmol de toxina-I¹²⁵/mg de BBMF, na ausência do competidor. A presença de concentrações crescentes da toxina livre provocou uma competição pelos sítios de ligação, sendo observado um deslocamento de 70% da Cry-I¹²⁵ ligada, confirmando a especificidade da ligação. A concentração do competidor homólogo que deslocou 50% da toxina-I¹²⁵ (IC₅₀) foi cerca de 88 nM para a Cry11Aa, 99 nM para a Cry4Aa e 521 nM para a Cry4Ba. Os resultados de competição heteróloga mostraram que as toxinas Cry competem pelos mesmos sítios e partilham receptores presentes na BBMF. Em todos os casos, a afinidade do complexo toxina-receptor não foi elevada e a ligação observada entre as toxinas-I¹²⁵ e a BBMF é de natureza irreversível. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a toxicidade das toxinas Cry para larvas de *Ae. aegypti* está relacionada à etapa irreversível da interação com os receptores, não tendo sido observado um padrão de afinidade elevada na etapa inicial de ligação aos receptores. Certamente outros fatores, como a presença da toxina Cyt tem um papel importante neste processo.

Palavras-chave: toxinas Cry, modo de ação, controle de vetores, receptores, bioinseticidas.

INTRODUÇÃO

A dengue é hoje uma das arboviroses mais importantes no contexto mundial e a sua transmissão ocorre através do vetor *Aedes aegypti*. O emprego de inseticidas químicos, a exemplo do organofosforado (Temephos), não tem sido eficaz no seu controle e o seu uso tem sido limitado graças ao aparecimento da resistência de insetos e efeitos nocivos em organismos não-alvo. O *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é um agente larvicida eficaz, seguro e adequado para o controle do *Ae. aegypti*, tendo sido utilizado desde 1980 em vários países (BECKER; MARGALIT, 1993). No Brasil, o Bti já é utilizado como larvicida em alguns municípios em programas de controle do *Ae. aegypti* (ARAÚJO-COUTINHO, 1995; MARDINI *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2004).

O poder larvicida do Bti deve-se à sua capacidade de produzir cristais de proteína durante sua esporulação. O cristal possui atividade larvicida devido à presença de 4 protoxinas, com pesos moleculares aproximados de 125-, 135-, 68- e 28- kDa, respectivamente (DELÉCLUSE; PÉREZ; BERRY, 2000). Os genes que codificam para esses quatro polipeptídeos do Bti estão localizados em um plasmídeo de 72-MDa e foram identificados de acordo com suas seqüências, recebendo a denominação de *cry4Ba*, *cry4Aa*, *cry11Aa* e *cyt1Aa* (WARD; ELLAR, 1985). O modo geral de ação do Bti envolve inicialmente a ingestão dos cristais, em suspensão na água, pelas larvas aquáticas de mosquitos (Culicidae) e borrachudos (Simuliidae). Uma vez ingerido, o cristal é solubilizado em pH alcalino intestinal liberando no lúmen os quatro polipeptídeos, que são considerados protoxinas. Estes necessitam ser clivados pelas proteinases intestinais para geração de fragmentos ativos, que interagem com a membrana apical do epitélio intestinal desencadeando processos citopatológicos que culminam com a morte das larvas, (RAVOAHANGIMALALA; CHARLES, 1995).

A ação inseticida do Bti é seletiva para algumas espécies dos gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Anopheles*. Isto indica claramente que suas toxinas necessitam interagir com receptores presentes na membrana apical do epitélio intestinal das larvas-alvo, a exemplo do que ocorre entre a toxina binária do *B. sphaericus* e larvas de *Culex* e *Anopheles* (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997), bem como entre as toxinas Cry1 de outras sorovariedades de *B. thuringiensis* ativos para larvas de lepidópteros (GARCZYNSKI; ADANG, 2000). Estudos recentes mostram que o receptor da toxina Cry11Aa em larvas de *Ae. aegypti* é uma fosfatase alcalina de 65 kDa (FERNANDEZ *et al.*, 2006). Entretanto, a caracterização destes receptores ao nível qualitativo e quantitativo são escassos, sendo necessários estudos para a melhor compreensão do modo de ação do Bti. Neste trabalho foram

analisadas a atividade tóxica de cada um dos componentes Cry do cristal do Bti para larvas de *Ae. aegypti*, e foram realizados estudos quantitativos da capacidade de ligação *in vitro* das toxinas às frações de *microvilli* intestinal dessas larvas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Colônia de mosquitos

Foi utilizada uma colônia de *Ae. aegypti*, denominada Recife-Lab, formada a partir de ovos coletados em bairros do Recife e mantida há 10 anos no insetário do CPqAM sob condições controladas: temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa média de 70% e o fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro). As larvas são mantidas em água desclorada e alimentadas com ração comercial para gatos. Os adultos são alimentados com solução de açúcar a 10% e as fêmeas fazem o repasto sangüíneo em aves (*Gallus sp.*).

Preparação de frações ricas em microvilosidades intestinais (BBMF)

Foram utilizadas larvas de 4º estágio de *Ae. aegypti* da colônia padrão mantida no insetário do CPqAM. Larvas armazenadas à -70°C , foram utilizadas para obter as preparações de BBMF (“Brush Border Membrane Fraction”) (SILVA-FILHA *et al.*, 1997). A técnica baseia-se no isolamento parcial de membranas apicais através de centrifugação diferencial e precipitação seletiva utilizando íons de magnésio. A qualidade das preparações foi avaliada através da dosagem de proteínas pelo método de Bradford, (1976) e do enriquecimento da leucina aminopeptidase (EC 3.4.11.1) e da α -glicosidase (EC 3.2.1.20), enzimas marcadoras de membrana, de acordo com a metodologia descrita em Silva-Filha *et al.*, (1997).

Produção, processamento e marcação das toxinas

As toxinas utilizadas nos ensaios de ligação (Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba) foram produzidas individualmente a partir do *B. thuringiensis* recombinante cepa 4Q2-81, transformado com 3 plasmídios distintos: Cry11Aa/pTH640, Cry4Aa/pTH606, Cry4Ba/pTH611 (DELÉCLUSE *et al.*, 1993; PONCET *et al.*, 1993). A obtenção de culturas esporuladas e a separação de cristais foi feita através de gradiente de sacarose segundo metodologia descrita em Poncet *et al.*, (1995). O processamento *in vitro* das toxinas foi feito através das seguintes etapas: solubilização em NaOH 50 mM durante 1 h à 30°C , neutralização com Tris 1 M pH 7.4; ativação com tripsina bovina (Sigma®) durante 1 h à 37°C , na proporção de 1:10 (enzima:proteína); diálise em tampão NaPi 0,02 M (0,02 M

Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), pH 8. A eficácia da ativação foi feita através da análise de amostras da protoxina solubilizada e da toxina ativada por SDS-PAGE, à 12%. Após verificação, foi adicionada azida sódica (0.02% final) aos lotes de toxina que foram armazenados à 4°C. As toxinas foram marcadas com o isótopo I¹²⁵ (Amershan Biotech®), segundo protocolo descrito em Charles & Nielsen-LeRoux, (1992) para serem utilizadas nos ensaios de ligação *in vitro*.

Bioensaios

A avaliação da atividade inseticida *in vivo* das toxinas Cry do Bti para *Ae. aegypti* foi feita através de bioensaios utilizando larvas jovens do 4º estágio, de acordo com metodologia previamente descrita (WHO, 1995). Nos bioensaios, as larvas foram expostas a concentrações obtidas à partir de uma suspensão da biomassa liofilizada (5 g/L) de cada protoxina Cry, avaliada previamente através da determinação de unidades formadoras de colônias (UFC/ml). Em cada ensaio foram utilizadas três réplicas de 6 concentrações além do controle. Cada réplica foi representada por 20 larvas colocadas em 100 ml de água destilada em recipientes plásticos. As concentrações utilizadas nos ensaios resultaram em valores de mortalidade entre 10 e 95%. O registro da mortalidade foi feito após 24 h de exposição. Os ensaios foram repetidos três vezes para a validação dos resultados. A concentração de toxina letal para 50% das larvas (CL₅₀) em 24 h foi estabelecida através da análise de probites (FINNEY, 1971), utilizando o programa SPSS 10.0.

Ensaio de ligação *in vitro*

Para identificar e caracterizar a capacidade de ligação das toxinas Cry do Bti ao epitélio de *Ae. aegypti*, foram conduzidos ensaios de ligação *in vitro* entre cada toxina marcada com I¹²⁵ e as preparações de BBMF de larvas. A metodologia utilizada para os ensaios de ligação *in vitro* foi baseada em Charles & Nielsen-LeRoux, (1992) e Silva-Filha *et al.*, (1997). As incubações foram feitas em microtubos de poliestireno em um volume total de 100 µl, em tampão PBS pH 7,4. Nas competições homólogas/heterólogas e para os ensaios de saturação, as amostras foram incubadas durante 16 horas; para as cinéticas de associação e de dissociação as amostras foram incubadas por até 48 horas. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. Após a incubação, a toxina ligada à BBMF foi separada do sobrenadante por centrifugação (8.700g, 15 minutos, 4°C) As amostras de BBMF foram colocadas em líquido de cintilação (ScintiSafe Plus®) e analisadas em um contador de emissão de partículas beta (Wallac-Pharmacia®). Os dados obtidos nos ensaios de ligação foram analisados pelo programa Prism® for Windows.

Competição homóloga. Determina a capacidade de uma toxina ligar-se especificamente à BBMF. Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), na presença de concentrações crescentes (0-10 µM) da toxina não marcada, que agiu como competidor homólogo.

Competição heteróloga. Determina a capacidade de competição de uma toxina heteróloga não marcada, pelo sítio de ligação da toxina marcada. Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), na presença de concentrações crescentes (0-10 µM) de uma toxina heteróloga não marcada, que agiu como competidor heterólogo. Foram realizadas ensaios utilizando as diferentes toxinas Cry do Bti para avaliar a competição destas pelos mesmos sítios.

Cinética de associação e de dissociação. Determina a capacidade de associação de uma toxina marcada à BBMF ao longo do tempo, e avalia a capacidade de dissociação, quando um excesso de toxina não marcada é adicionada ao meio. Foram preparados e analisados três grupos experimentais, contendo um volume total de incubação suficiente para a retirada de amostras de 100 µl, em duplicata, de acordo com os tempos de avaliação preconizados nesse estudo.

- Grupo de associação total: Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg). Amostras de 100 µl foram coletadas após 0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas de incubação. Nessas amostras foi avaliado o padrão de associação total da toxina.
- Grupo de associação não-específica: uma série experimental idêntica à anterior foi feita na presença de um excesso de toxina não marcada (10 µM). Amostras de 100 µl foram coletadas nos mesmos intervalos, para determinar a ligação não-específica.
- Grupo de dissociação: Foi incubada uma concentração fixa de toxina marcada (30 nM) e uma quantidade fixa de BBMF (25 µg), durante 24 h. Após esse período foi adicionado um excesso de toxina não marcada (10 µM). Amostras de 100 µl foram coletadas 24, 25, 26, 28, 32 e 48 horas para avaliar a capacidade de dissociação da toxina marcada, previamente ligada à BBMF.

RESULTADOS

Bioensaios: atividade larvicida *in vivo*

A atividade larvicida das biomassas liofilizadas contendo as toxinas Cry do Bti para larvas do 3^o/4^o estádios de *Ae. aegypti* foi analisada através de bioensaios. Todas as biomassas apresentaram um nível elevado de esporulação, $7,2 \times 10^8$ para a Cry11Aa, $9,2 \times 10^9$ para Cry4Aa e $1,2 \times 10^9$ para Cry4Ba. As concentrações letais para 50% de larvas (CL₅₀) expostas durante 24 h às toxinas testadas que compõem o cristal nativo do Bti estão apresentadas na Tab. 1. A toxina Cry4Ba apresentou a maior toxicidade, seguida da Cry11Aa e Cry4Aa. A concentração letal da cepa IPS-82 que contém o cristal nativo usado como controle, foi de 0,023 mg/l (MELO-SANTOS, 2001). A comparação da toxicidade do cristal nativo com os diferentes componentes tóxicos da família Cry mostra claramente a sua superioridade em termos de atividade inseticida. A toxicidade do cristal Cry4Ba foi a mais elevada, alcançando uma CL₅₀ apenas 5 vezes superior àquela do cristal nativo. O cristal Cry11Aa mostrou a segunda contribuição mais importante seguido da Cry4Aa que, apesar de uma biomassa com excelente nível de esporulação, apresentou uma CL₅₀ cerca de 500 vezes superior àquela do cristal nativo.

Preparações ricas em *microvilli* intestinal e processamento *in vitro* das toxinas.

A análise das preparações ricas em *microvilli* do epitélio intestinal (BBMF) mostrou um rendimento de $1,28 \pm 0,63$ mg de proteína de BBMF por grama de larva inteira utilizada na preparação. As preparações mostraram um enriquecimento das enzimas marcadoras de membrana utilizadas, leucina aminopeptidase e α -Glicosidase, da ordem de $4,68 \pm 1,36$ e $4,85 \pm 1,57$ vezes, respectivamente.

Foram obtidas toxinas ativas a partir do processamento *in vitro* das biomassas, para realizar o estudo da capacidade de ligação das toxinas Cry às preparações de BBMF. O processamento simula os eventos de solubilização dos cristais e proteólise das protoxinas que ocorrem *in vivo* no mesêntero das larvas, quando elas ingerem produtos à base de Bti. Na primeira etapa, correspondente à solubilização dos cristais, foram observadas uma banda majoritária de 70 kDa para a protoxina Cry11Aa e uma banda de 130 kDa para Cry4Aa e Cry4Ba (Fig. 1A). O tratamento das protoxinas com a tripsina bovina, nas condições estabelecidas neste trabalho, causou uma proteólise gerando os seguintes fragmentos tripsina-resistentes: peptídeos de 38 e 30 kDa para Cry11Aa, 45 e 20 kDa para Cry4Aa e 45 e 18 kDa para Cry4Ba (Fig. 1B).

Competições homólogas e heterólogas

Os ensaios de competição demonstraram que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba ligam de forma específica à BBMF de *Ae. aegypti* (Fig. 2). Este é o primeiro trabalho que demonstra, de forma quantitativa, a capacidade de ligação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* à membrana apical do epitélio intestinal (BBMF) de larvas desta espécie. A capacidade máxima de ligação específica de cada toxina marcada foi determinada na ausência de um competidor, após uma incubação de 16 horas. A ligação das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba foi de cerca de 3 pMol/mg de proteína de BBMF, sendo a ligação da toxina Cry11Aa mais discreta (Tab. 2).

Os ensaios de competição homóloga realizados mostram que a ligação das toxinas é específica, pois a adição de concentrações crescentes do competidor deslocam a toxina marcada (I^{125}) previamente ligada à BBMF. E o nível de ligação não específica detectado nos ensaios corresponde à base da curva de deslocamento dos respectivos competidores, cerca de 30% na maioria dos ensaios realizados (Fig. 2). Em cada modelo de competição homóloga foi determinado o IC_{50} , que é a concentração do competidor capaz de deslocar 50% da toxina- I^{125} ligada à BBMF, este é um parâmetro que indica o grau de afinidade da ligação entre a toxina e o receptor. Foram observados valores médios de 88, 99 e 521 nM de IC_{50} , respectivamente para as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba em competições homólogas (Tab. 2). Nota-se que a afinidade da toxina Cry4Ba pelo sítio de ligação na BBMF de *Ae. aegypti* é claramente inferior às demais, embora a atividade *in vivo* da biomassa detectada neste trabalho tenha sido a melhor.

Os ensaios de competição heteróloga conduzidos com a toxina Cry11Aa- I^{125} , mostraram que as toxinas não marcadas Cry4Aa e Cry4Ba são capazes de deslocar a toxina Cry11Aa- I^{125} e conseqüentemente competem pelos mesmos sítios de ligação (Fig. 2A), sendo a afinidade da toxina Cry4Aa maior do que a do competidor heterólogo Cry4Ba, de acordo com os valores de IC_{50} obtidos (Tab. 2). No caso específico do competidor Cry4Ba, não foi possível determinar o IC_{50} através do programa PRISM® e, neste caso, foi adotado um IC_{50} aproximado de 5.000 nM, baseado na observação direta dos valores desta competição no gráfico (Fig. 2A).

Os respectivos ensaios de competição heterólogos tendo como toxinas marcadas a Cry4Aa- I^{125} e Cry4B- I^{125} mostram um comportamento semelhante aquele observado para a toxina Cry11Aa- I^{125} (Fig. 2, B e C). Os resultados das competições heterólogas demonstraram que as três toxinas Cry do Bti competem pelos mesmos sítios e partilham uma classe de receptores presentes nas preparações de BBMF (Fig. 2). A análise dos valores de IC_{50} obtidos

à partir dos ensaios (Tab. 2) mostram que as toxinas Cry11Aa e Cry4Aa possuem uma afinidade pelos receptores semelhante e maior do que àquela observada para a toxina Cry4Ba, que mostrou a menor capacidade de competição pelos sítios de ligação, nos ensaios *in vitro*.

Os dados obtidos mostram que nenhuma das toxinas Cry apresentam uma afinidade elevada pelo sítio de ligação da BBMF no modelo estudado, apesar da elevada atividade inseticida do cristal do Bti para larvas de *Ae. aegypti*. Outro aspecto investigado nos ensaios foi o eventual incremento da ligação das toxinas marcadas na presença de outro componente Cry. Em todos os ensaios observou-se que a presença da toxina heteróloga em concentração equimolar (30 nM) ou superior àquela da respectiva toxina marcada, não provocou um aumento da ligação à BBMF, demonstrando a ausência de sinergia entre as toxinas para o reconhecimento do receptor, nestas condições experimentais.

Cinéticas de ligação

Em função da ausência do equilíbrio da ligação, no período de 16 h, observado nos experimentos de saturação, foram realizados ensaios para determinar a cinética de associação total (TO), de associação não específica (NE) e a cinética de dissociação (DI) das toxinas- I¹²⁵ em relação à preparação de BBMF. As cinéticas de associação total apresentaram, após 24 horas de incubação, uma capacidade de associação máxima de 5 pmol/mg para as toxinas Cry11Aa e Cry4Aa, e de aproximadamente 3,5 pmol/mg para a toxina Cry4Ba (Fig. 3). A associação não específica manteve-se estável em cerca de 1 pmol/mg para as três toxinas- I¹²⁵ (Fig. 3). Estes resultados mostram que a associação das toxinas Cry à BBMF de *Ae. aegypti* não atinge um equilíbrio durante o tempo observado, pois as curvas de associação das toxinas Cry11Aa e Cry4Aa, ao final de 24 h, não apresentam uma tendência de estabilização (Fig. 3, A e B). Não se pode afirmar a partir destes dados, se a associação contínua observada ao longo do ensaio resulta integralmente da ligação entre a toxina-I¹²⁵ e seus receptores ou se, parte de ligação observada, pode ser uma consequência da oligomerização de moléculas de toxina-I¹²⁵. Para a toxina Cry4Ba, a capacidade de associação é menor e se mostrou mais estável a partir de 8 h de incubação (Fig. 3C).

A cinética de dissociação foi feita para determinar se a ligação do complexo toxina-receptor após 24 horas de associação é reversível, mediante a adição do competidor não marcado ao meio. Nos três casos estudados a adição de um excesso do competidor homólogo não marcado não provocou um deslocamento significativo da toxina- I¹²⁵ ligada à BBMF (Fig. 3). Podem ser observadas apenas pequenas oscilações em torno do valor de associação total atingido aos 24 h de associação. A ausência de dissociação indica que a toxina, após

ligar-se ao receptor, tem a capacidade de inserir-se nas membranas, impossibilitando assim o seu deslocamento, devido à presença do competidor no meio.

DISCUSSÃO

Atividade larvicida individual das toxinas

A análise do grau de esporulação do Bti, em UFC/ml, mostrou que as biomassas das cepas recombinantes apresentaram uma qualidade adequada e similar. Os seus potenciais tóxicos divergiram quando testadas para larvas de *Ae. aegypti*, e observou-se que a atividade larvicida da biomassa Cry4Ba foi a mais alta frente às larvas, nas condições testadas, seguida pela Cry11Aa e Cry4Aa. Esses resultados reproduzem alguns dos achados de Poncet *et al.*, (1995) no tocante à atividade individual das toxinas Cry do Bti em bioensaios para larvas de *Ae. aegypti*, sendo observada a mesma seqüência de toxicidade encontrada neste trabalho. Crickmore *et al.*, (1995) observaram em estudos semelhantes, que a toxina Cry11Aa apresentou a mais alta toxicidade (LC₅₀) para larvas de *Ae. aegypti*, seguida pela Cry4Ba e Cry4Aa. Hughes *et al.* (2005), analisando as contribuições individuais destas toxinas para larvas do díptero *Chironomus tepperi* observaram que a Cry11Aa e Cry4Ba eram as mais tóxicas para essa espécie. As diferenças observadas nestes estudos podem ser devido a vários fatores que influenciam os resultados, como forma de criação das larvas utilizada e oscilações naturais da susceptibilidade das populações de insetos utilizadas nos bioensaios (WIRTH; FERRARI; GEORGHIOU, 2001). Apesar de haver alguma variação quanto à capacidade individual de cada toxina Cry do Bti para as larvas de dípteros, todos os trabalhos apontam que as toxinas Cry11Aa e Cry4Ba são as que possuem melhores atividades individuais. Deve ser lembrado ainda que, o cristal nativo é sempre mais tóxico do que as frações individuais ou combinações de toxinas. De fato, a ação inseticida elevada do cristal nativo nos bioensaios, deve-se à ação sinérgica das toxinas Cry componentes, incluindo a toxina Cyt que tem um papel importante na toxicidade (WU; CHANG, 1985; CHILCOTT; ELLAR, 1988; ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992).

Processamento *in vitro* das toxinas

Nos ensaios de processamento *in vitro* dos cristais contendo as protoxinas Cry do Bti foram obtidos perfis bem definidos de fragmentos ativos para cada uma das três protoxinas. De acordo com trabalhos prévios acerca do processo de ativação das protoxinas Cry do Bti e sua toxicidade para larvas de dípteros, os fragmentos tripsina-resistentes obtidos neste trabalho,

seriam aqueles formados durante o processo *in vivo* e que se ligam aos receptores do epitélio intestinal das larvas desencadeando o processo citopatológico.

No processo de ativação das protoxinas Cry1 de sorovariedades de Bt inseticidas para lepidópteros de aproximadamente 130 kDa, observa-se ao final a formação de um fragmento de aproximadamente 60-70 kDa protease-resistente (DE MAAGD *et al.*, 2003). Já para as protoxinas Cry do Bti de 130 e 70 kDa ativas contra dípteros, observa-se normalmente, ao final do processo de ativação, a formação de dois fragmentos que juntos têm a capacidade de se ligar e formar um dímero de aproximadamente 60-70 kDa (YAMAGIWA *et al.*, 1999; REVINA *et al.*, 2004).

Para a protoxina Cry11Aa, de 70 kDa, observou-se que após sua ativação existe a formação de dois fragmentos de 33 e 36 kDa, correspondendo respectivamente à região N-terminal contendo o domínio I e à região C-terminal englobando os domínios II e III da molécula. Também foi observado nesse trabalho que os fragmentos isolados não possuem atividade tóxica para as larvas-alvo, mas que juntos determinam a presença de toxicidade (REVINA *et al.*, 2004). Conclui-se portanto, que após a proteólise deve-se assegurar a presença de fragmentos que contenham os três domínios estruturais, indispensáveis para a ação desta toxina. Trabalhos prévios já demonstram que as toxinas Cry4Aa e Cry4Ba também possuem estruturas tridimensionais com três domínios (ANGSUTHANASOMBAT *et al.*, 2004).

Para as protoxinas de 130 kDa, observou-se, após o processo de ativação da protoxina Cry4A, a formação de fragmentos de 20 kDa e 45 kDa (YAMAGIWA *et al.*, 1999) e da protoxina Cry4B, a formação de fragmentos de 45 e 18 kDa (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992). Foram testados os efeitos na ação tóxica dos fragmentos da Cry4A e, de forma semelhante aos fragmentos da Cry11Aa, eles apresentaram atividade unicamente quando testados em associação, mostrando novamente que o dímero formado por eles era o responsável pela toxicidade para as larvas-alvo (YAMAGIWA *et al.*, 1999). A Cry4B, a exemplo dos fragmentos anteriores, também é capaz de formar um dímero (YAMAGIWA *et al.*, 1999). A ausência de toxicidade do fragmento de 45 kDa para larvas indica também que nesse caso, a presença de dois fragmentos, contendo todos os domínios, é necessária para desencadear as ações tóxicas da Cry4Ba (CHUNGJATUPORCHAI *et al.*, 1988).

As etapas de solubilização e ativação das protoxinas são fundamentais para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos observados. Uma alteração no pH intestinal das larvas ou no processamento proteolítico pode acarretar uma mudança na ativação *in vivo* das protoxinas

e conseqüentemente na diminuição dos efeitos tóxicos observados. E, até em certos casos, ser o responsável pela resistência em insetos (OPPERT, 1999). O êxito na obtenção dos fragmentos Cry ativos para larvas de *Ae. aegypti* descritos nesse trabalho, foi etapa fundamental para os estudos posteriores de sua capacidade de ligação à BBMF, *in vitro*.

Capacidade de ligação das toxinas, in vitro

Os resultados obtidos demonstraram que as toxinas Cry do Bti possuem sítios de ligação específicos na BBMF de *Ae. aegypti*, porém foi observada uma baixa afinidade do complexo toxina-receptor. Este parâmetro diz respeito à primeira etapa do modo de ação das toxinas, o reconhecimento do receptor. A toxina Cry11Aa foi aquela que obteve melhor afinidade nos ensaios de competição homóloga, cujo o IC₅₀ foi de 88 nM. Entretanto, este valor indica um nível de afinidade fraca, se quando comparado a alguns modelos de interação entre toxinas Cry1 e BBMF de lepidópteros-alvo. Nestes modelos de ligação, as toxinas Cry1 mostram uma alta afinidade da toxina pelos receptores das larvas-alvo. Trabalhos avaliando a interação de toxinas Cry1 com BBMF de diferentes lepidópteros, como *Bombix mori*, *Spodoptera littoralis*, *S. exigua* entre outros, registraram valores de afinidade da ordem de 10 nM, apontando uma afinidade bem superior àquelas encontradas neste trabalho para as toxinas Cry do Bti e BBMF de *Ae. aegypti* (RAUF; ELLAR, 1999; SANCHIS; CHAUFAX; PAURON, 1994).

Estes achados corroboram a idéia de que existem outros fatores que permeiam a interação das toxinas Cry do Bti com o epitélio intestinal das larvas, visto que a afinidade foi baixa e a toxicidade *in vivo* é alta. Um fato importante em relação à atividade *in vivo* do cristal nativo, é a presença da toxina Cyt1A. Trabalhos relativos a larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes à toxina binária do *B. sphaericus*, demonstraram que o uso da toxina Cyt1A em combinação com a toxina binária, reduziu drasticamente o aparecimento da resistência nas larvas. De fato, a Cyt1A parece agir sobre as células fazendo com que a toxina Bin possa agir sem ser mediada por seus receptores, visto que estes estão ausentes da *microvilli* dos insetos resistentes (WIRTH *et al.*, 2005). Sabe-se que a atividade da toxina Cyt, *in vitro*, é de natureza citolítica e parece não envolver receptores específicos, podendo inserir-se espontaneamente em membranas contendo fosfolipídeos insaturados e formar poros ou, alternativamente, ter ação do tipo detergente na superfície das membranas celulares (LI; KONI; ELLAR, 1996; BUTKO, 2003). Na presença das toxinas Cry do Bti, a ligação da Cyt1A parece ser direcionada para as regiões do intestino médio, nas quais as toxinas Cry ligam-se a receptores específicos (LI; KONI; ELLAR, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998). Tal fato

sugere uma elevada associação entre as toxinas Cry e a Cyt1A, o que pode ser a base das interações sinérgicas para larvas de dípteros (TABASHNIK, 1992; GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992). De fato, um trabalho recente mostrou que a toxina Cry11Aa e Cyt1A têm a capacidade de se ligar através de epítomos existentes em ambas as moléculas e, ensaios de interação mostraram que a ligação da toxina Cry11Aa à BBMF de *Ae. aegypti* foi otimizada pela presença da Cyt1A. Assim, há evidências de que a Cyt1A serve como receptor e que se liga no domínio II nas alças α 8 e β 4 da Cry11Aa, que estão envolvidas na ligação ao receptor de membrana (PÉREZ *et al.*, 2005). Este dado reforça a idéia da necessidade de associação entre as toxinas Cry e a Cyt, para a interação com o epitélio intestinal das larvas-alvo.

Nos ensaios de saturação preliminares (dados não apresentados) observou-se que a ligação da toxina marcada a seus receptores não se estabilizou. A ausência de saturação na ligação pode estar associada à formação de oligômeros da toxina. Estudos com a toxina Cry1Ab e BBMF do lepidóptero *Manduca sexta*, mostram que a oligomerização é um passo necessário para a formação de poros e, portanto, para a toxicidade (SOBERÓN *et al.*, 2000). Estudos relativos à estrutura e distribuição da toxina Cry4Ba em membranas lipídicas mostram que a toxina insere-se na membrana preferencialmente através de estruturas oligoméricas (tetrâmeros), ao invés da molécula monomérica (PUNTHEERANURAK *et al.*, 2005). Nas cinéticas de associação ficou claro que a tendência de agregação da toxina-I¹²⁵ era um processo que prosseguiria por um tempo indeterminado. O fato de não ter sido observada a dissociação das toxina-I¹²⁵ mostrou que a sua ligação à membrana é um processo irreversível correspondente à segunda etapa do modo de ação, quando ocorre a inserção da toxina na membrana levando à formação de poros nas células. Em alguns modelos de ligação a alta afinidade *in vivo* não está correlacionada à afinidade inicial da ligação, observada a partir da formação do complexo toxina-receptor (IHARA *et al.*, 1993). Os nossos resultados sugerem que as toxinas Cry do Bti se enquadram nesta categoria. Neste trabalho, por exemplo, um competidor heterólogo com atividade específica para lepidópteros, Cry1Ac, foi capaz de deslocar as toxinas-I¹²⁵ do Bti ligados à BBMF (dados não apresentados). Depois, constatou-se que já havia relato de ligação de toxinas Cry à BBMF de insetos que não são susceptíveis, como o exemplo de Cry1Ac para larvas de *S. frugiperda* (GARCZYNSKI; ADANG, 2000). Isso sugere mais uma vez, que em alguns modelos, os efeitos *in vivo* das toxinas Cry não estão necessariamente relacionados à capacidade inicial de reconhecimento e ligação aos receptores, mas sim ao caráter irreversível da ligação.

A ausência de sinergia entre as toxinas nos ensaios de ligação *in vitro*, mostra que a afinidade pelos receptores não é melhorada na presença de mais de uma toxina Cry. De fato, a sinergia das toxinas Cry observada nos ensaios de atividade *in vivo* não foi detectada nos ensaios de ligação *in vitro* no modelo estudado. É possível que para a interação das toxinas Cry com os receptores, a toxina Cyt seja um fator determinante para a sinergia (PEREZ *et al.*, 2005). Também deve ser considerada a hipótese das toxinas Cry do Bti interagirem com outras biomoléculas, como glicolipídeos, antes da etapa de reconhecimento dos receptores, como foi estudado no modelo de ligação de toxinas ativas para o nematóide *Caenorhabditis elegans* (CRICKMORE, 2005).

Outro aspecto a ser investigado é o estudo da afinidade através de outra metodologia, visto que a incorporação de iodo na tirosina presente nas toxinas marcadas poderia ter algum efeito sobre a sua capacidade de ligação, visto que foi demonstrado que a presença da tirosina (Tyr-202) nas alças $\alpha 4$ e $\alpha 5$ do domínio II da Cry4Aa, é essencial para a toxicidade (PORNWIROON *et al.*, 2005). Entretanto, não sabemos ao certo se esse achado para a Cry4Aa pode ser válido para as demais toxinas, uma vez que a baixa afinidade foi observada para todas as toxinas Cry do Bti. Os conjuntos de achados neste trabalho, no entanto, apontam preferencialmente que a toxicidade das proteínas Cry do Bti não estaria relacionada a um padrão de alta afinidade com receptores, mas sim com a etapa irreversível do modelo de ligação que corresponderia à inserção da toxina na membrana celular, seguida pela formação de poros e danos celulares que levariam à morte das larvas.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Armelle Delécluse do Instituto Pasteur, por ter gentilmente cedido as cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis*; ao Dr. Daniel Pedro Udrisar, do Departamento de Fisiologia da UFPE por ceder as instalações para a marcação de proteínas; ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, V.; ELLAR, D.J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 94, p. 63-68, 1992.

ANGSUTHANASOMBAT, C.; UAWITHYA, P.; LEETACHEWA, S.; PORNWIROON, W.; OUNJAI, P.; KERDCHAROEN, T.; KATZENMEIER, G.R.; PANYIM, S. *Bacillus*

thuringiensis Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 304-313, 2004.

ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Biological control program against Simuliidae in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 131-133, 1995.

BECKER, V.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, M.J.; HIGGS, S (eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***, John Wiley & Sons Ltd., Londres, 1993, p. 147-169.

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

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.; SOARES, S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 199-203, 2004.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2415-2422, 2003.

CHARLES, J.F.; NIELSEN-LEROUX, C. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **Eur. J. Biochem.**, v. 210, p. 585-590, 1992.

CHILCOTT, C.V.; ELLAR, D.J. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 9, p. 2551-2558, 1988.

CHUNGJATUPORNCHAI, W.; HÖFTE, H.; SEURINK, J.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; VAECK, M. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. **Eur. J. Biochem.**, v. 173, p. 9-16, 1988.

CRICKMORE, V.; BONE, E.J.; WILLIAMS, J.A.; ELLAR, D.J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE, V. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 347-350, 2005.

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

DELÉCLUSE, A.; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Expression of *cry4A* e *cry4B* genes, independently or in combination, in crystal minus strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3922-3927, 1993.

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V.J.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J-F; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds.), **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiiov**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 101-122.

FERNANDEZ, L.E.; AIMANOVA, G.K.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.**, v. 393, p. (no prelo), 2006.

FINNEY, D.J. **Probit analysis – a statistical treatment of the sigmoid response curve** - 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1971, p. 50-80.

GARCZYNSKI, S.F.; ADANG, M.J. Investigations of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds.). **Entomopatogenic bacteria from laboratory to field applicatiiov**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000, p. 181-197.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 615-636, 1992.

HUGHES, P.A.; STEVENS, M.M.; PARK, H.W.; FEDERICI, B.A.; DENNIS, E.S.; AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 88, p. 34-39, 2005.

IHARA, H.; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombix mori*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 200-204, 1993.

LI, J.; KONI, P.A.; ELLAR, D.J. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J. Mol. Biol.**, v. 257, p. 129-152, 1996.

MARDINI, L.B.; SOUZA, M.A.; RABINOVICHT, L.; ALVES, R.S.; SILVA, C.M. Field studies with the bacterial larvicide INPALBAC for *Simulium* spp. in Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 679-681, 1999.

MELO-SANTOS, M.A.V. **Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2001, 74 p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Animal)

OPPERT, B. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 42, p. 1-12, 1999.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L.E.; SUN, J.; FOLCH, J.L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 18303-18308, 2005.

PONCET, S.; ANELLO, G.; DELÉCLUSE, A.; FLIER, A., RAPOPORT, G. Role of the CryIVD polypeptide in the overall toxicity of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3928-3930, 1993.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **J. Invert. Pathol.**, v. 66, p. 131-135, 1995.

PORNWIROON, W.; KATZENMEIER, G.; PPAYNIM, S.; ANGSUTHANASOMBAT, C. Aromaticity of Tyr-202 in the alpha4-alpha5 loop is essential for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, p. 292-297, 2005.

PUNTHEERANURAK, T; STROH, C.; ZHU, R.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; HINDTERDORFER, P. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. **Ultramicroscopy**, v. 105, p. 115-124, 2005.

RAUF, M.A.; ELLAR, D.J. Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from whole *Aedes aegypti* larvae. **J. Invert. Pathol.**, v. 75, p. 45-51, 1999.

RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J.F. *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **FEBS Lett.**, v. 362, p. 111-115, 1995.

REVINA, L.P.; KOSTINA, L.I.; GANUSHKINA, L.A.; MILKHAILOVA, A.L.; ZALUIN, I.A.; CHESTUKHINA, G.G. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to N- and C- moieties restores its original biological activity. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, p. 181-187, 2004.

SANCHIS, V.; CHAUFAX, J.; PAURON, D. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombix mori*. **FEBS Lett.**, v. 353, p. 259-263, 1994.

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

SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.F. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. larvae. **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 754-761, 1997.

SOBERÓN, M.; PÉREZ, R.V.; VALDÉZ, M.E.V.; LORENCE, A.; GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxiv. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 191, p. 221-225, 2000.

TABASHNIK, B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3342-3346, 1992.

WARD, E.S.; ELLAR, D.J. Assignment of the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to a specific plasmid by curing analysis. **FEBS Lett.**, v. 190, p. 232-236, 1985.

WIRTH, M.C.; FERRARI, J.A.; GEORGHIOU, G.P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean islands of Cyprus. **J. Econ. Entomol.**, v. 4, p. 920-928, 2001.

WIRTH, M.C.; JIANNINO, J.A.; FREDERICI, B.A.; WALTON, W.E. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Invert. Pathol.**, v. 88, p. 154-162, 2005.

World Health Organization (WHO). Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvae. **TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.1-24**, 1995.

WU, D.; CHANG, F.V. Sinergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. **FEBS Lett.**, v. 190, p. 232-236, 1985.

YAMAGIWA, M.; ESAKI, M.; OTAKE, K.; INAGAKI, M.; KOMANO, T.; AMACHI, T.; SAKAI, H. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 3464-3469, 1999.

Tabela 1. Atividade tóxica das biomassas produzidas pelas cepas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* expressando isoladamente os cristais contendo as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, e pela cepa IPS-82, para larvas do 3^o/4^o estágio de *Aedes aegypti*.

Toxina	N ^o de replicatas	CL ₅₀ mg/l ² Média ± SD
Cry11Aa	3	1,350 ± 0,230
Cry4Aa	3	13,046 ± 4,040
Cry4Ba	3	0,123 ± 0,050
Bti nativo ¹	3	0,023 ± 0,002

¹ Liofilizado padrão IPS-82 fornecido pelo Instituto Pasteur (França).

² Concentração letal para 50% das larvas após 24 horas de exposição.

Tabela 2. Ensaios de competições homólogas e heterólogas entre as toxinas Cry 11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* marcadas (I¹²⁵) e preparações de frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti* do 3^o/4^o estágio.

Cry-I ¹²⁵	Nº de ensaios	Ligação específica pMol/mg (Média ± SD)	Competidor homólogo/heterólogo	IC ₅₀ ¹ (nM)
11Aa	3	1,64 ± 0,41	11Aa	88 ± 36
	4		4Aa	105 ± 60
	5		4Ba	>5.000
4Aa	6	3,02 ± 1,04	11Aa	162 ± 85
	4		4Aa	99 ± 3
	6		4Ba	411 ± 181
4Ba	3	2,84 ± 1,08	11Aa	141 ± 42
	2		4Aa	161 ± 29
	3		4Ba	521 ± 334

¹ Concentração do competidor que desloca 50% da toxina- I¹²⁵ ligada à BBMF.

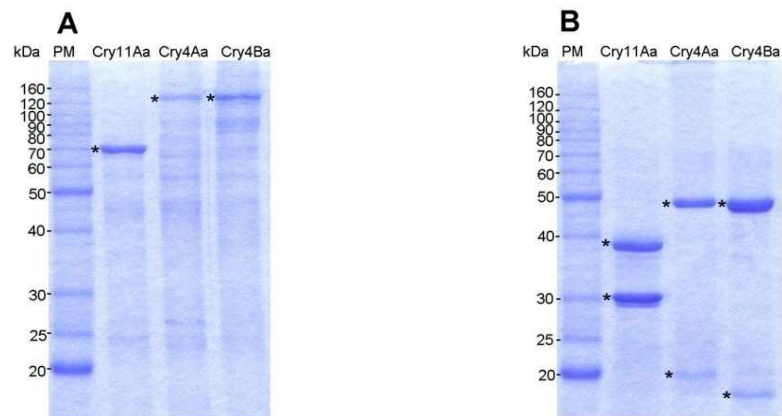


Figura 1. Separação eletroforética (SDS- PAGE) a 12% de amostras de cristais contendo as protoxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* após a solubilização (A) e após a ativação com tripsina bovina (B). Marcador de peso molecular (kDa) à esquerda.

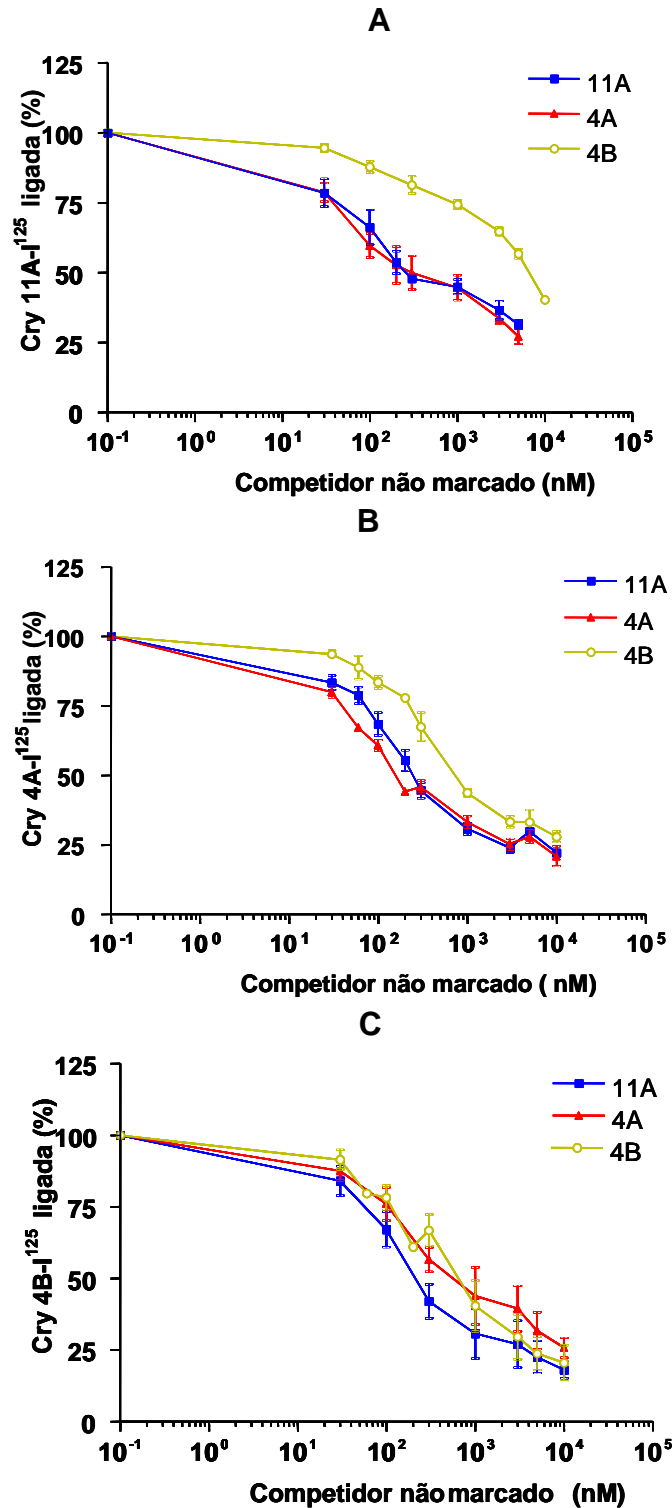


Figura 2. Ensaio de competição *in vitro* entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* marcadas com iodo (I¹²⁵), e frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de *Aedes aegypti*. Competições entre 30 nM de toxina Cry- I¹²⁵, 25 µg de BBMF e concentrações crescentes (0-10 µM) de competidor homólogo ou heterólogo, durante 16 h, à temperatura ambiente. Os gráficos mostram a ligação total da

toxina-I¹²⁵, tomando como ponto máximo (100%) o valor observado na ausência de competidor. Cada ponto representa a média de pelo menos 6 replicatas.

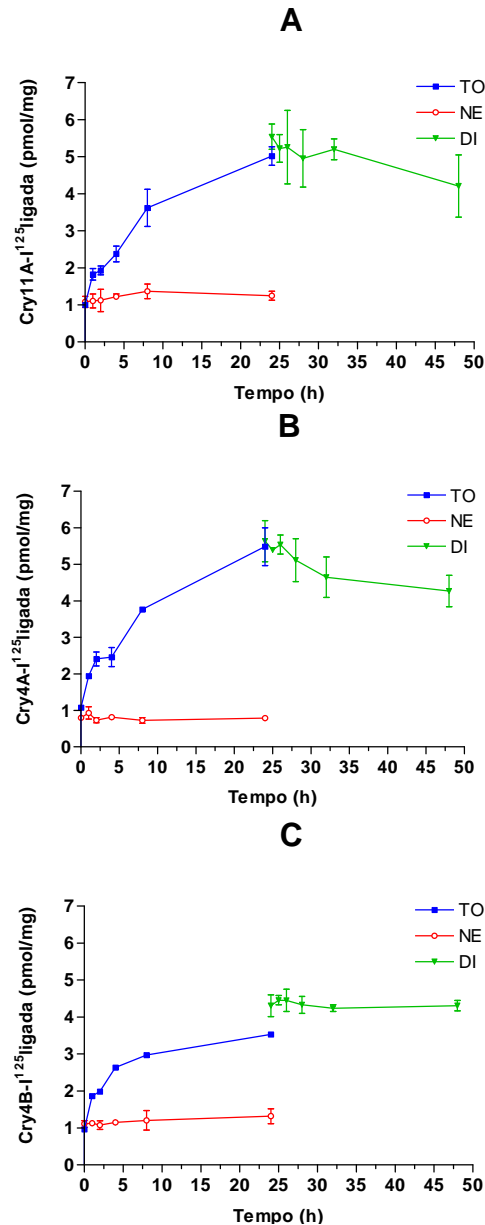


Figura 3. Cinéticas de associação total (TO), de associação não específica (NE) e de dissociação total (DI) entre as toxinas Cry11Aa (A), Cry4Aa (B) e Cry4Ba (C) do *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* marcadas com iodo (I^{125}) e frações de *microvilli* intestinal (BBMF) de larvas de *Aedes aegypti*. Nas amostras de associação, foram incubados 30 nM de toxina- I^{125} e 25 μ g de BBMF na ausência (TO) ou presença (NE) de um excesso (10 μ M) de competidor não marcado, sendo coletadas amostras em diferentes momentos, durante 24 h. Nas amostras de dissociação (DI), após 24 h de incubação, foi adicionado um excesso de competidor homólogo (10 μ M), e foram coletadas diferentes amostras, durante as 24 h subsequentes. Cada ponto analisado é uma média de 4 replicatas. O ensaio foi realizado durante 48 h à temperatura ambiente.