

Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry?

Gislayne Trindade Vilas-Bôas¹, Rita C. Alvarez², Clelton A. dos Santos¹ & Laurival A. Vilas-Boas¹

1. Universidade Estadual de Londrina, e-mail: gyboas@uel.br (Autor para correspondência), cleltonsto@gmail.com, lavboas@uel.br. 2. Universidade Federal da Bahia, e-mail: alvarezbio@yahoo.com.br.

EntomoBrasilis 5 (1): 1-10 (2012)

Resumo. As proteínas Cry produzidas pela bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner são bem conhecidas devido a alta citotoxicidade que exibem a uma variedade de insetos-alvo. O modo de ação destas proteínas é específico e torna os produtos à base de *B. thuringiensis* os mais amplamente utilizados em programas de controle biológico de pragas na agricultura e de importantes vetores de doenças humanas. Contudo, embora as proteínas Cry sejam os fatores de virulência inseto-específico mais conhecidos, linhagens de *B. thuringiensis* apresentam também uma ampla gama de fatores de virulência, os quais permitem à bactéria atingir a hemolinfa e colonizar eficientemente o inseto hospedeiro. Dentre estes fatores, destacam-se as proteínas Vip, Cyt, enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases, proteases, enzimas de degradação, além das recentemente descritas parasporinas. Essa revisão aborda a ação desses fatores de virulência, bem como a caracterização e o controle da expressão de seus genes. Adicionalmente, são discutidos aspectos relacionados ao nicho ecológico da bactéria com ênfase nas características envolvidas com a biossegurança da utilização dos produtos à base de *B. thuringiensis* para o controle biológico de insetos-alvo.

Palavras-chave: Controle Biológico; Fatores de virulência; Biossegurança.

Virulence Factors of *Bacillus thuringiensis* Berliner: Something Beyond of Cry Proteins?

Abstract. The Cry proteins produced by the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner are widely known due to its high toxicity against a variety of insects. The mode of action of these proteins is specific and becomes *B. thuringiensis*-based products the most used in biological control programs of insect pests in agriculture and of important human disease vectors. However, while the Cry proteins are the best-known insect-specific virulence factor, strains of *B. thuringiensis* show also a wide range of other virulence factors, which allow the bacteria to achieve the hemolymph and colonize efficiently the insect host. Among these factors, we highlight the Vip proteins, Cyt, enterotoxins, hemolysins, phospholipases, proteases and enzymes of degradation, in addition to the recently described parasporin. This review explores the action of these virulence factors, as well as, the characterization and control of expression of their genes. Additionally, we discuss aspects related to the ecological niche of the bacteria with emphasis on the characteristics involved in the biosafety of the use of *B. thuringiensis*-based products for biological control of target insects.

Keywords: Biological control; Biosafety; Virulence factors.

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) foi descoberta no início do século XX e é utilizada na agricultura para o controle de insetos pragas em culturas de importância agrônômica, como algodão, milho, soja, batata, tomate, grãos armazenados e áreas de reflorestamento. Além disso, os produtos à base de *B. thuringiensis* são os principais inseticidas biológicos utilizados em programas de larga escala para o controle de mosquitos vetores de doenças, como dengue e malária (WHO 1999).

O modo de ação específico e a remarcável segurança dos produtos à base de *B. thuringiensis* são relacionados com a produção de uma inclusão cristalina parasporal na célula bacteriana durante a esporulação ou na fase estacionária (VILAS-BÔAS *et al.* 2007). A produção destes cristais protéicos representa uma característica típica de *B. thuringiensis* e confere atividade entomopatogênica para várias espécies pertencentes a inúmeras ordens de insetos, destacando-se Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Porém, há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Himenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthiraphera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros (SCHNEPF *et al.* 1998; GLARE & O'CALLAGHAN 2000; BRAR *et al.* 2006).

Os cristais de *B. thuringiensis* são formados principalmente por proteínas denominadas Cry, anteriormente chamadas δ -endotoxinas (BRAVO *et al.* 2007). Ao final da esporulação, o

cristal protéico corresponde a cerca de 20% a 30% do peso seco da célula, sendo liberado no momento da lise celular (GLARE & O'CALLAGHAN 2000; ARANTES *et al.* 2002).

Embora o cristal protéico seja o principal determinante de patogenicidade da bactéria, preparações comerciais baseadas em *B. thuringiensis* são, na maioria das vezes, compostas de esporos e cristais. Além do fato de ser difícil a separação dos mesmos, diversos estudos relatam que a presença do esporo aumenta a atividade entomopatogênica da bactéria. O potencial efeito de esporos sobre a toxicidade de uma linhagem de *B. thuringiensis* é conhecido há muitos anos (BURGES *et al.* 1976), embora o entendimento dos mecanismos que geram este efeito estejam apenas começando a ser descritos.

A influência dos esporos da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 sobre a toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1C contra larvas suscetíveis e resistentes da traça *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) foi investigada por JOHNSON *et al.* (1996). Os resultados deste estudo demonstraram que quando as larvas suscetíveis foram alimentadas com suspensão contendo os esporos de *B. thuringiensis* na presença de proteínas Cry purificadas o tempo necessário para a intoxicação e conseqüentemente morte das larvas foi significativamente reduzido quando comparado ao grupo de larvas que havia recebido suspensão contendo apenas as proteínas Cry1Ab e Cry1C na ausência dos esporos.

A influência dos esporos da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 sobre a toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1C contra larvas suscetíveis e resistentes da traça *Plodia interpunctella* Hübner foi investigada por JOHNSON *et al.* (1996). Os resultados deste estudo demonstraram que quando larvas suscetíveis são alimentadas com suspensão contendo esporos e proteínas Cry purificadas o tempo para a intoxicação e consequentemente morte da larva foi reduzido. Sem esporos, o tempo para intoxicação e eventual morte de larvas tratadas apenas com as proteínas Cry1Ab e Cry1C foi relativamente maior do que de larvas tratadas com uma preparação contendo esporos e cristais em conjunto.

Em outro exemplo, foi necessária a toxicidade das proteínas Cry e a multiplicação das células vegetativas de três subespécies de *B. thuringiensis* para um controle eficaz de larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Pieris brassicae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) (LI *et al.* 1987). Estes resultados mostram que os esporos contribuem para a patogenicidade de algumas linhagens de *B. thuringiensis*. Assim, em algumas situações, as proteínas Cry agem apenas no enfraquecimento dos insetos suscetíveis, criando condições para a germinação dos esporos, multiplicação das células vegetativas e para o desenvolvimento de septicemia.

LIU *et al.* (1998) também investigaram a ação sinérgica entre esporos e cristais de *B. thuringiensis*, mostrando que a combinação de ambos pode apresentar atividade tóxica para larvas de *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae), mesmo quando cristais e esporos têm pouca ou nenhuma toxicidade. Estes autores sugeriram que, para as larvas deste inseto, a extensão de sinergismo entre os esporos e cristais de *B. thuringiensis* depende da linhagem do inseto, da linhagem bacteriana, do conjunto de proteínas Cry, e de outros fatores, tais como ingredientes da formulação e das concentrações de esporos e proteínas Cry.

Em acréscimo, corroborando estes estudos, os resultados de ASANO *et al.* (2000) demonstram que a irradiação de esporos, a fim de torná-los inviáveis, resulta em uma redução drástica de seus efeitos sinérgicos, sugerindo a importância da germinação dos esporos. Num outro estudo, os resultados de JOHNSON *et al.* (1998) demonstraram que proteínas de revestimento dos esporos também são importantes contribuintes para o efeito sinérgico, enquanto que DU & NICKERSON (1996) encontraram que a capa dos esporos de *B. thuringiensis* pode conter toxinas incorporadas. Estas toxinas parecem ter um efeito direto sobre o inseto, uma vez que podem facilitar a germinação dos esporos da bactéria no tubo digestivo do inseto, permitindo que a célula bacteriana passe ou comece a expressar outros fatores de virulência, que podem aumentar o efeito das proteínas Cry e permitir o acesso à hemolinfa das larvas, e consequente multiplicação de suas células vegetativas no inseto hospedeiro.

As proteínas Vip (proteínas inseticidas vegetativas) compõem outra família de proteínas com ação inseticida produzidas por algumas linhagens de *B. thuringiensis*. Tais proteínas não apresentam qualquer semelhança com as proteínas Cry e são produzidas durante a fase vegetativa da bactéria (ESTRUCH *et al.* 1996), além de serem solúveis, não formam cristais e possuem toxicidade de mesma magnitude que as proteínas Cry. O espectro inseticida das proteínas Vip inclui coleópteros (Vip1 e Vip2) e lepidópteros (Vip3), incluindo algumas espécies de insetos praga que são insensíveis à ação das proteínas Cry (ESTRUCH *et al.* 1996; CHEN *et al.* 2003; SHI *et al.* 2004).

Os genes *vip2A(a)* e *vip1A(a)* de algumas linhagens de *B. thuringiensis* estão localizados em um *operon* (WARREN 1997). As proteínas codificadas por estes genes contêm na região N-terminal um peptídeo sinal típico de proteínas de secreção. Ambas as proteínas, exibem atividade entomopatogênica contra larvas de coleópteros e mostram similaridade de sequência com outras

toxinas produzidas por outras espécies bacterianas (DE MAAGD *et al.* 2003) e, provavelmente, um modo de ação semelhante, baseado na ligação a receptores específicos na membrana celular de células epiteliais do intestino médio dos insetos alvo e na consequente formação de poros (YU *et al.* 1997; LOGUERCIO *et al.* 2002; LEE *et al.* 2003).

O gene *vip3A(a)* codifica uma proteína ativa contra larvas de diversas espécies de lepidópteros. Esta proteína não apresenta similaridade de sequência com qualquer proteína conhecida (ESTRUCH *et al.* 1996). Não contém uma sequência sinal típica no N-terminal, e não é processado durante a secreção (DE MAAGD *et al.* 2003). Observações histopatológicas indicam que as células do epitélio do intestino médio dos insetos suscetíveis são o principal alvo para a proteína inseticida Vip3A, causando paralisia intestinal, lise completa das células e consequente morte das larvas. Assim, a ruptura das células do intestino parece ser o principal mecanismo de letalidade das proteínas Vip (YU *et al.* 1997). Adicionalmente, a produção da proteína Vip3A por células vegetativas em seguida à germinação dos esporos, é um fator importante na toxicidade combinada de esporos em espécies de insetos em que as proteínas Cry são relativamente inativas (DONOVAN *et al.* 2001).

Linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* apresentam atividade entomopatogênica contra espécies da Ordem Diptera, devido à formação de cristais compostos pelas proteínas Cry4A, Cry4B, Cry10A e Cry11A, além de um citolisina denominada Cyt1A, a qual é codificada pelo gene *cyt1A*. A estrutura tridimensional da proteína CytB homóloga a CytA, revela que tais toxinas apresentam uma estrutura completamente diferente das proteínas Cry (LI *et al.* 1996). As toxinas Cyt, ao contrário das toxinas Cry, são capazes de provocar a lise de uma ampla gama de tipos de células *in vitro* (HOFTE & WHITELEY 1989) e uma revisão dos mecanismos tóxicos de Cyt1A e Cyt2A foi descrita por SCHNEPF *et al.* (1998).

No entanto, a proteína Cyt1A parece não ser essencial para a atividade entomopatogênica de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, uma vez que a interrupção do gene *cyt1A*, o qual codifica um polipeptídeo de 28 kDa, resultou em uma linhagem com atividade entomopatogênica similar à linhagem selvagem (DELÉCLUSE *et al.* 1991). No entanto, a presença frequente da proteína Cyt1A em cristais sugere que esta proteína pode ser um componente importante do arsenal entomopatogênico de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

RAVOAHANGIMALALA & CHARLES (1995) adicionaram a proteína Cyt1A purificada a seções do aparelho digestivo de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) e verificaram a capacidade de ligação da mesma às microvilosidades de células do estômago e do intestino anterior. Em contraste, nas mesmas condições, as proteínas Cry ligaram-se apenas fracamente a estas células. No entanto, quando o conjunto completo de toxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* foi fornecido aos insetos *in vivo*, a proteína Cyt1A não foi encontrada ligada às células do estômago anterior (RAVOAHANGIMALALA *et al.* 1993). Apesar deste resultado, negativo poder ter sido um artefato da metodologia utilizada, o mesmo pode apontar para a possível existência de uma forte associação entre as proteínas Cry e Cyt, como base de uma interação sinérgica (SCHNEPF *et al.* 1998).

Outros genes codificantes para fatores de virulência foram identificados em linhagens de *B. thuringiensis*, incluindo enzimas de degradação, como a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), hemolisinas (como os complexos triméricos enterotóxicos HBL e NHE), citotoxinas (como a citotoxina CytK) e proteases. Vários estudos têm mostrado que algumas dessas moléculas têm uma escala variável de contribuição para a virulência (IKEZAWA & TAGUCHI 1981; GRANUM 1994; BAIDA & KUZMIN 1996; LUND & GRANUM 1996; LUND *et al.* 2000; CALLEGAN *et al.*

al. 2002; POMERANTSEV *et al.* 2003; BUDARINA *et al.* 2004).

Estes genes são regulados positivamente pela expressão de um gene regulador pleiotrópico denominado *plcR* (LERECLUS *et al.* 1996), o qual é específico das linhagens pertencentes ao grupo *Bacillus cereus*, um grupo de bactérias Gram-positivas que apresentam alta similaridade genética (VILAS-BÔAS *et al.* 2007), incluindo *B. thuringiensis* (AGAISSE *et al.* 1999). Este regulador pleiotrópico é o principal ativador de genes de virulência, ativando a produção de vários genes dispersos no cromossomo, não constituindo, portanto, uma ilha de patogenicidade. Cerca de 80% das proteínas extracelulares produzidas durante a fase estacionária depende da ação do gene regulador pleiotrópico *plcR* (GOHAR *et al.* 2002, 2008).

A atividade da proteína PlcR depende de PapR, um pequeno peptídeo de sinalização que atua como um efetor de *quorum sensing*, ou seja, que regula a expressão gênica de acordo com a densidade populacional da bactéria, permitindo a coordenação do comportamento de toda comunidade populacional. O gene *papR* está localizado 70 pb *downstream* do gene *plcR* e é positivamente regulado pela proteína PlcR, codificando uma sequência denominada PapR, a qual contém 48 aminoácidos com um peptídeo sinal no N-terminal. O peptídeo PapR é exportado pela célula bacteriana, processado presumivelmente como um pentapeptídeo e, posteriormente, reintroduzido na célula bacteriana através do sistema permease Opp-oligopeptídeo, o qual está envolvido na importação de pequenos peptídeos para o ambiente celular (SLAMTI & LERECLUS 2002).

Quando são alcançadas altas densidades de células bacterianas, aumenta a concentração do pentapeptídeo PapR no interior das células bacterianas, promovendo a sua interação com a proteína PlcR. O complexo PapR:PlcR então se liga ao seu sítio de reconhecimento no DNA, desencadeando um ciclo de *feedback* positivo que regula a expressão de vários genes, incluindo *plcR*, *papR*, e de vários outros fatores de virulência (SLAMTI & LERECLUS 2002; GOHAR *et al.* 2008). No entanto, a base molecular para

o controle da transcrição pelo complexo PapR:PlcR ainda é desconhecida (DECLERCK *et al.* 2007) (Figura 1).

Os genes que são positivamente regulados pelo regulador pleiotrópico PlcR apresentam uma sequência palindrômica de nucleotídeos altamente conservada na região promotora, denominada caixa *plcR* (TATGNAN₄TNCATA) (AGAISSE *et al.* 1999). A caixa PlcR situa-se entre 20 e 200 nucleotídeos *upstream* à região -10 da região promotora, sendo semelhante à caixa de Pribnow (TATAAT) da região promotora. A transcrição do gene *plcR* e dos genes PlcR-regulados é ativada no final da fase vegetativa em células cultivadas em meio rico, por exemplo LB. Em contraste, a transcrição não é ativada em células cultivadas em um meio específico para esporulação (LERECLUS *et al.* 2000).

O mecanismo de ativação do regulador PlcR é linhagem específico, e essa especificidade é determinada pelos primeiros resíduos de aminoácidos do pentapeptídeo PapR. Alinhamento de sequências PapR provenientes de diferentes linhagens e dos sítios de ativação de PlcR levaram à identificação de quatro grupos de especificidade, com algumas modificações na sequência de aminoácidos do pentapeptídeo: LPFE (F/Y), LPFEH, MPFEF e VP(F/Y)E(F/Y)¹ (SLAMTI & LERECLUS 2005). Além disso, há uma correlação perfeita entre as especificidades dos pentapeptídeos e as sequências de peptídeos do regulador PlcR correspondente, sugerindo co-evolução dos genes *plcR* e *papR*.

Dentre os fatores de virulência com expressão controlada pelo regulador PlcR, destacam-se as enterotoxinas, as quais são os principais fatores de virulência produzidos por linhagens de *B. thuringiensis*, quando não são consideradas as proteínas com atividade entomopatogênica. Cinco enterotoxinas são conhecidas: CytK, EntFM e BceT, codificadas pelos genes *cytK*, *entFM* e *bceT*, respectivamente, e as enterotoxinas HBL e NHE, cada uma codificada por três genes localizados nos *operons hbl* e

¹ Com base no código de convenções internacionais: L para leucina, P para prolina, F para a fenilalanina, E para o ácido glutâmico, Y de tirosina, H para histidina, M para metionina e V para Valina.

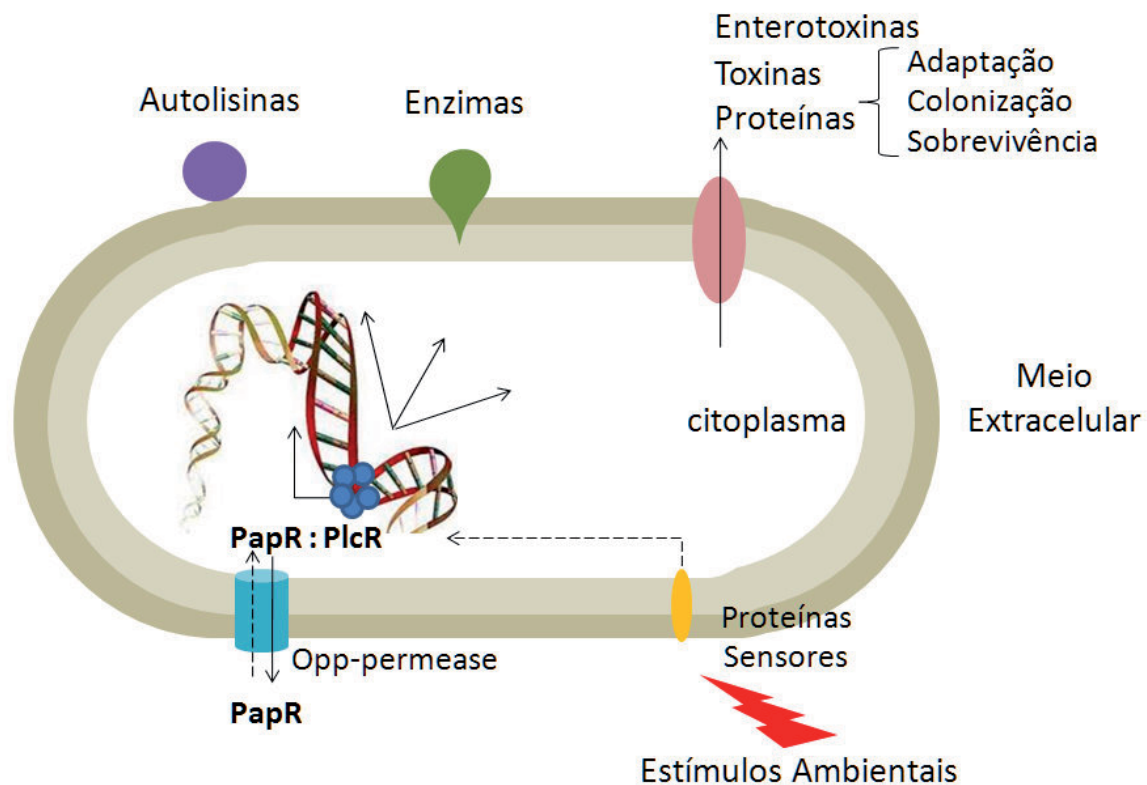


Figura 1. O regulador transcricional PlcR juntamente com PapR regulam positivamente a expressão de genes envolvidos com a produção de inúmeras proteínas e toxinas envolvidas com adaptação, colonização e sobrevivência bacteriana. PapR também funciona como uma molécula efetora de *quorum sensing* sendo secretada para o meio extracelular e posteriormente re-importada na forma de um pentapeptídeo. Os mecanismos pelos quais os estímulos ambientais modulam a expressão de *plcR* ainda não são conhecidos, porém quando expresso PlcR tem papel preponderante para o controle de mais de 100 genes (Adaptado de GOHAR *et al.* 2008).

nhe, respectivamente (VILAS-BÓAS *et al.* 2007).

A enterotoxina hemolítica BL (HBL) é a mais estudada e apresenta atividades hemolítica e dermonecrotica, sendo composta por três peptídeos, conforme descrito por BEECHER & WONG (1994a). O componente de ligação B (35 kDa) e dois elementos líticos designados L1 (36 kDa) e L2 (45 kDa), codificados pelos genes *hblA*, *hblD* e *hblC*, respectivamente, os quais estão organizados em um *operon* (*hbl*), cuja transcrição, a qual ocorre conjuntamente de forma de policistrônica, é regulada pelo regulador PlcR.

Adicionalmente, existe um quarto peptídeo com função desconhecida, não essencial para a atividade biológica da enterotoxina HBL (RYAN *et al.* 1997), denominado HblB, codificado pelo gene *hblB*. De acordo com CLAIR *et al.* (2010), esta proteína pode complementar ou reforçar a função do componente B (codificado pelo gene *hblA*) da enterotoxina BL em uma determinada fase de crescimento e/ou em uma condição específica de crescimento, constituindo uma proteína acessória que pode estar envolvida com o potencial de virulência de uma dada linhagem.

A enterotoxina não hemolítica (NHE), descrita por LUND & GRANUM (1996), é também um complexo de três componentes que difere da enterotoxina HBL por não apresentar atividade hemolítica. A junção de NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) e NheC (36,5 kDa) apresenta atividade citotóxica mesmo em pequenas quantidades. A máxima atividade citotóxica do complexo NHE foi obtida quando a proporção NheA:NheB:NheC foi de 10:10:1, como determinado por ensaios com células Vero (LINDBÄCK *et al.* 2004). Os genes codificantes para os três componentes foram clonados e caracterizados e como um *operon* (GRANUM *et al.* 1999; LINDBÄCK *et al.* 2004).

As enterotoxinas HBL e NHE apresentam alta semelhança na natureza de seus três componentes e nas estruturas dos dois *operons* (MICHELET *et al.* 2006). As maiores similaridades foram encontradas entre as sequências dos genes *nheA* e *hblC*, *nheB* e *hblD* e entre *nheC* e *hblA* (Figura 2), nas regiões correspondentes ao N-terminal das proteínas correlatas (GRANUM & LUND 1997; GRANUM *et al.* 1999).

Os dois complexos de enterotoxina podem ser detectados por testes comerciais de imunoenaios. O componente L2 da toxina HBL é detectado pelo *B. cereus* Enterotoxin-Reversed Passive Latex Agglutination kit (BCET-RPLA kit, Oxoid, Inglaterra) (BEECHER & WONG 1994b). Da mesma forma, o kit *Bacillus Diarrheal Enterotoxin Visual Immunoassay* (BDE, Tecra, Austrália) é reportado como utilizado para a detecção do componente de 41 kDa, correspondente a NheA do complexo de enterotoxinas NHE.

A enterotoxina Citotóxica K (CytK), é composta por um único peptídeo de 34 kDa e possui, além da capacidade de formar poros em membranas celulares, atividade necrótica e hemolítica. CytK foi isolada inicialmente por LUND *et al.* (2000) sendo posteriormente identificada duas formas diferentes desta enterotoxina, denominadas CytK-1 e CytK-2, descritas por

FAGERLUND *et al.* (2004). Estas formas exibem 89% de homologia de sequência de aminoácidos e a principal diferença entre essas duas proteínas é o efeito biológico. A toxina CytK-1 apresenta elevada toxicidade, enquanto a CytK-2 pode também contribuir para a enterotoxicidade, de acordo com a linhagem (FAGERLUND *et al.* 2004).

Estas três toxinas (NHE, HBL e CytK) formadoras de poros parecem ser as principais responsáveis por quadros de diarreia provenientes de intoxicação alimentar provocado pelas linhagens do grupo *B. cereus*. No entanto, outras enterotoxinas também são conhecidas, como a enterotoxina FM (entFM), a qual também é uma toxina monomérica, hemolítica, codificada por um único gene (*entFM*), relativamente desconhecida com atividade citotóxica para células Vero (ASANO *et al.* 1997) e a enterotoxina monomérica T (BceT), cujo gene, denominado *bceT* foi clonado, sequenciado e expresso em *Escherichia coli*. A proteína recombinante de 41 kDa, correspondente a enterotoxina BceT exibiu atividade citotóxica para células Vero, causando permeabilidade vascular e acúmulo de fluido em alças ilíacas de camundongos, sendo letal para estes animais quando injetadas na veia caudal, apresentando, portanto, atividades biológicas consideradas características de enterotoxinas diarreicas (AGATA *et al.* 1995).

No entanto, CHOMA & GRANUM (2002) questionaram a sua classificação como enterotoxina. Assim, HANSEN *et al.* (2003) sequenciaram a região *bceT* de 16 linhagens do grupo *B. cereus* e concluíram que o fragmento *bceT* clonado foi criado por uma incidental junção de fragmentos de DNA durante a ligação nos experimentos de clonagem. Esses autores sugerem que a atividade enterotóxica do gene *bceT* originalmente clonado (AGATA *et al.* 1995) pode ser devida à fusão gênica ou a um fragmento com homologia a ORF 101 do plasmídeo de virulência pXO1 de *Bacillus anthracis* Cohn. Contudo, o gene *bceT* continua sendo amplamente empregado como uma das ferramentas para se caracterizar o perfil toxigênico de linhagens pertencentes ao grupo *B. cereus* (BATCHOUN *et al.* 2011).

A segunda classe de toxinas expressas por linhagens de *B. thuringiensis*, inclui as hemolisinas, que são responsáveis pela atividade hemolítica e consideradas importantes em processos infecciosos. As hemolisinas da família citolisinas colesterol-dependentes (CDC) (também conhecidas como citolisinas tiol-ativadas) são toxinas formadoras de poros, e foram identificadas no grupo *B. cereus*. Em linhagens de *B. thuringiensis* são representadas pela thuringiolisina O (Tlo) (GRANUM 1994).

Algumas linhagens de *B. thuringiensis* produzem também uma hemolisina denominada hemolisina II (HlyII) (BUDARINA *et al.* 1994), uma proteína com propriedades hemolíticas que forma poros em bicamadas lipídicas sintéticas e não tem receptor específico em uma ampla gama de hemácias (ANDREVA *et al.* 2006). Adicionalmente, esta proteína apresenta capacidade de induzir apoptose de macrófagos de ratos e insetos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TRAN *et al.* 2011). A sequência de aminoácidos de HlyII é similar à sequência de CytK (até 37% de identidade) (FAGERLUND *et al.* 2004). No entanto, em contraste com o gene

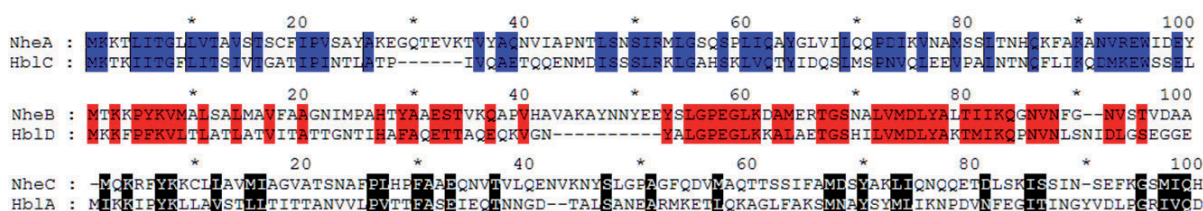


Figura 2. Múltiplo alinhamento sequencial da região N-terminal das proteínas NheA (YP_036059.1) e HblC (BAE72885.1); NheB (ACM18212.1) e HblD (BAE72886.1); e NheC (ACM18213.1) e HblA (CAI77443.1). Regiões conservadas entre as sequências são mostradas em azul para NheA e HblC, vermelho para NheB e HblD, e preto para NheC e HblA. As sequências de aminoácido das proteínas foram obtidas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o número de acesso encontra-se em parênteses. O múltiplo alinhamento foi obtido utilizando o servidor ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) sendo usado o programa GeneDoc (NICHOLAS *et al.* 1997) para edições posteriores.

cytK, a expressão do gene *hlyII* não é regulada pelo regulador pleiotrópico PlcR, mas controlada pelo regulador transcricional HlyIIR (BUDARINA *et al.* 2004).

O gene *hlyIIR* está localizado imediatamente *downstream* ao gene *hlyII*, e codifica uma proteína de 201 aminoácidos. A proteína HlyIIR (na forma dimérica) se liga especificamente a uma região invertida e repetida do DNA, em duas subrepetições localizadas na região do operador do gene *hlyII*. Em experimentos *in vivo* tem demonstrado que a HlyIIR é um regulador transcricional negativo do gene da hemolisina II de linhagens de *B. thuringiensis* (BUDARINA *et al.* 2004).

Outro gene de hemolisina, *hlyIII*, codificando para a hemolisina III, foi sequenciado e caracterizado (BAIDA & KUZMIN 1995). Esta hemolisina atua através da formação de poros transmembrana com diâmetro de cerca de 3 a 3,5 nm, provocando a lise de eritrócitos (BAIDA & KUZMIN 1996).

Com relação à classe de toxinas representadas pelas fosfolipases, as fosfolipases C são as mais conhecidas dentro desta família de proteínas expressas por linhagens de *B. thuringiensis*. De acordo com a classe de fosfolipídios que atuam tem-se as fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC) (CALLEGAN *et al.* 2002), fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) (IKEZAWA & TAGUCHI 1981) e esfingomielinase (SPH) (POMERANTSEV *et al.* 2003). PC-PLC e SPH compõem a unidade citolítica cereolisina AB e são codificadas pelos genes *plc* e *sph*, respectivamente.

A toxicidade da PC-PLC pode ser explicada pela hidrólise de diferentes fosfolipídios como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) (HERGENROTHER & MARTIN 1997), os quais podem ocorrer nas membranas de células animais. No entanto, a ação da cereolisina AB é dependente da esfingomielinase, uma vez que a presença de esfingomielina (SM) em membranas inibe a atividade da PC-PLC (RUIZ-ARGUELLO *et al.* 1998).

A fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) é uma enzima importante na transdução de sinal associada à membrana, agindo na superfície externa da célula para gerar um mensageiro para a transdução de sinal intracelular, clivando fosfatidilinositol ou glicosilfosfatidilinositol e facilitando a hidrólise entre o glicerol e a cabeça polar dos fosfolipídeos para gerar fosfato-inositol (e derivados) e diacilglicerol (IKEZAWA & TAGUCHI 1981, KUPPE *et al.* 1989). Por esta razão, a PI-PLC é classificada como um fator de virulência extracelular.

No ano 2000, MIZUKI *et al.*, analisando linhagens de *B. thuringiensis* sem atividade inseticida, descreveram pela primeira vez uma nova classe de citotoxina não hemolítica, denominada parasporina. Interessantemente, esta nova classe de toxina apresenta a mesma característica das proteínas Cry em formar a inclusão protéica cristalina, contudo, os resultados apresentados por estes autores mostraram que o modo de ação desta citotoxina difere de outras citotoxinas já isoladas anteriormente, uma vez que estas exibem alta citotoxicidade contra células cancerígenas humanas.

Subsequentemente, novas parasporinas foram identificadas e caracterizadas (KATAYAMA *et al.* 2005; KITADA *et al.* 2006; JUNG *et al.* 2007; NAGAMATSU *et al.* 2010; GONZALEZ *et al.* 2011) e de maneira similar às proteínas Cry que apresentam um modo de ação espécie-específico, as parasporinas parecem também manter este padrão, tendo sido descrito até agora quatro tipos de parasporinas que reconhecem receptores específicos presentes em células cancerígenas (OHBA *et al.* 2009). As classes de parasporina, assim como os critérios que são levados em consideração para classificá-las, podem ser acessadas no site do Comitê de Classificação e Nomenclaturas das Parasporinas (OKUMURA *et al.* 2010).

Atualmente, as parasporinas são consideradas uma nova classe

de proteínas Cry produzidas por *B. thuringiensis* com atividade citotóxica preferencial contra células cancerígenas humanas. Esta característica faz desta nova classe de toxinas, ferramentas promissoras no tratamento do câncer e tem estimulado novos estudos de identificação e caracterização de outras proteínas parasporais de *B. thuringiensis* para aplicação na medicina.

Além de todos os fatores de virulência já descritos, existem ainda aqueles que podem neutralizar o sistema imune do hospedeiro. O sistema de defesa humoral dos insetos, especialmente dos lepidópteros e dípteros é composto pela produção de cecropinas e atacinas, as quais são as principais classes de peptídeos antibacterianos induzíveis durante a infecção (HULTMARK *et al.* 1982; BOMAN & HULTMARK 1987; INAGAKI *et al.* 1992). A metaloprotease zinco dependente secretada por linhagens de *B. thuringiensis*, denominada InhA, hidrolisa especificamente cecropinas e atacinas na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* Linnaeus (Lepidoptera: Saturniidae) *in vitro* (EDLUND *et al.* 1976; DALHAMMAR & STEINER 1984), sugerindo que InhA é implicada nos mecanismos invasivos de *B. thuringiensis*, permitindo que as bactérias interfiram com o sistema imune do hospedeiro.

Adicionalmente, uma segunda cópia do gene *inhA*, denominada *inhA2*, foi identificada na linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407 Cry (FEDHILA *et al.* 2002). O gene *inhA2* codifica uma metaloprotease que tem 66% de identidade com a proteína InhA1 e contém um domínio de ligação ao zinco. Ensaio com larvas de *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) e de *G. mellonella* infectadas pelo hemocele demonstraram que a metaloprotease InhA2 de *B. thuringiensis* tem um papel vital na virulência quando o hospedeiro é infectado por via oral. Embora em *B. thuringiensis* as metaloproteases InhA e InhA2 não são fatores de virulência primários em infecções intrahemocélicas, estas metaloproteases são primariamente envolvidas nas etapas iniciais da infecção, interagindo com a barreira do hospedeiro. Assim, os autores sugerem que a metaloprotease InhA2 é essencial para proporcionar um efeito sinérgico dos esporos de *B. thuringiensis* sobre a toxicidade da proteína Cry1C contra *G. mellonella* após a infecção por via oral. Uma terceira proteína, InhA3, 72% idêntica a InhA1, também é encontrado no sobrenadante da cultura de *B. cereus*, mas apenas em quantidades residuais (GILOIS *et al.* 2007). Sua função e regulação ainda não foram descritas.

InhA1 é uma metaloprotease encontrada em abundância no exosporium, a camada mais externa do esporo bacteriano, que parece estar envolvida no escape bacteriano dos macrófagos do hospedeiro. Um mutante com os genes *inhA1*, *inhA2* e *inhA3* deletados apresentou uma queda acentuada no nível de virulência sobre insetos. Assim, as metaloproteases InhA são fatores de virulência importantes que podem permitir que as bactérias possam neutralizar o sistema imune do hospedeiro (GUILLEMET *et al.* 2010).

Além de genes de virulência descritos acima, outros importantes fatores de virulência envolvidos na persistência e propagação de *B. thuringiensis* em um hospedeiro infectado podem permanecer ainda desconhecidos. Assim, algumas tecnologias foram desenvolvidas como forma de identificar os genes de bactérias especificamente expressos durante a colonização do hospedeiro. Os principais métodos proporcionam um meio eficiente de identificar genes e promotores seletivamente induzidos após a injeção de células vegetativas dentro do hemocele de larvas de insetos suscetíveis.

Um sistema genético conhecido como *In vivo expression technology* (IVET) foi desenvolvido inicialmente para patógenos Gram-negativos, como um meio de identificar genes bacterianos especificamente expressos durante a colonização de um hospedeiro suscetível (OSBOURN *et al.* 1987; MAHAN *et al.* 1993; CAMILLI *et al.* 1994; para revisão, ver REDDIERS *et al.* 2005). Uma estratégia semelhante a IVET foi desenvolvida (SALAMITOU *et*

al. 1997) e é baseada na recombinase sítio específica TnpI do transposon Tn4430 de *B. thuringiensis* (MAHILLON & LERECLUS 1988) aliada ao uso de dois genes de resistência. O primeiro gene de resistência é flanqueado por duas sequências de recombinação sítio-específica e é perdido após a recombinação e, em contrapartida, o segundo gene torna-se funcional após o evento de recombinação sítio-específica. O desenvolvimento desta tecnologia permitiu a identificação de genes temporariamente e condicionalmente expressos em *Bacillus subtilis* (SALAMITOU *et al.* 1997) e no grupo *B. cereus* (FEDHILA *et al.* 2006).

Outro método denominado *signature-tagged mutagenesis* (STM), descrito por HENSEL *et al.* (1995) e revisado por AUTRET & CHARBIT (2005), permite selecionar, simultaneamente, um grande número de mutantes para a posterior identificação daqueles que possuem atenuada virulência. Desde o seu desenvolvimento, a tecnologia STM levou à identificação de centenas de novos genes necessários para a virulência em uma ampla gama de patógenos bacterianos (AUTRET & CHARBIT 2005). Para linhagens de *B. thuringiensis*, o lepidóptero *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) tem sido utilizado como modelo de infecção para a identificação de linhagens com virulência atenuada, incapazes de sobreviver e se multiplicar no hospedeiro *in vivo* (STEGGLES *et al.* 2006; WANG *et al.* 2008).

O elemento Tn4430 e as sequências de inserção (IS) da família IS231 foram descritos por MAHILLON *et al.* (1994). Atualmente, é consenso na literatura mundial que elementos móveis afetam a arquitetura do genoma bacteriano e desempenham um papel importante na evolução e virulência de muitos patógenos, atuando como veículos para a transferência horizontal de genes (BRÜSSOW *et al.* 2004). Em *B. thuringiensis* as IS tem sido frequentemente encontradas localizadas próximas aos genes *cry*, os quais codificam as proteínas Cry. Desta forma, acredita-se que elas contribuam para a variação da toxicidade de *B. thuringiensis*, por participarem da mobilidade destes genes (MAHILLON *et al.* 1994). Além disso, os resultados de WANG *et al.* (2008) usando STM sugerem que o transposon Tn4430 pode ter um importante papel na virulência de *B. thuringiensis* durante a infecção em *M. sexta*.

Apesar de estudos usando STM identificar elementos transponíveis de várias espécies bacterianas associados com a virulência (HERBERT *et al.* 2002; MARONCLE *et al.* 2002), ainda não está claro por meio de quais mecanismos moleculares os transposons podem contribuir para a virulência. É provável que o uso de tecnologias de genômica funcional, irão ajudar a identificar o papel do transposon Tn4430 e outros elementos móveis na virulência de linhagens de *B. thuringiensis*.

Em acréscimo, fortes evidências suportam a idéia de que a motilidade bacteriana pode conferir vantagens para a adaptação e colonização do hospedeiro, incluindo um aumento da virulência em muitas bactérias patogênicas (OTTEMANN *et al.* 1997). Os resultados de ZHANG *et al.* (1993) indicaram que em *B. thuringiensis* a motilidade e a virulência estão intimamente relacionadas. Subsequentemente, GHELARDI *et al.* (2002) mostraram que a ambos processos, em *B. thuringiensis* são reguladamente coordenados pelo gene *flhA* que codifica uma proteína do aparelho de exportação flagelar e que parece apresentar papel preponderante para a exportação de proteínas flagelares assim como não flagelares.

Em adição, outros genes envolvidos com a adaptação das células de *B. thuringiensis* no ambiente do hospedeiro foram identificados por transposição ou mutagêneses dirigida, dentre estes incluem o gene *fur* que codifica um repressor transcricional que controla a expressão de genes envolvidos com a absorção de ferro (HARVIE & ELLAR 2005; HARVIE *et al.* 2005); o gene *clpP1* que codifica a protease ATP-dependente Clp (FEDHILA *et al.* 2002) e os genes *yqgB*, *yqfZ*, cujas funções permanecem desconhecidas (FEDHILA *et al.* 2004). Os esforços com estes estudos poderão contribuir,

num futuro próximo, para o melhor entendimento da dinâmica de interação *B. thuringiensis*–hospedeiro, assim como esclarecer alguns detalhes ecológicos que permanecem desconhecidos nas bactérias do grupo *B. cereus*.

A grande similaridade genética entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* (VILAS-BÓAS *et al.* 2007) associada com a presença destas bactérias no solo e nos mais diferentes ambientes, e o esporádico envolvimento de linhagens de *B. thuringiensis* em casos de infecções (SAMPLES & BEUTTNER 1983; WARREN *et al.* 1984; JACKSON *et al.* 1995; DAMGAARD *et al.* 1997; HERNANDEZ *et al.* 1998) justificam estes estudos.

Por outro lado, apesar de vários estudos confirmarem a grande similaridade genética entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*, o nicho de *B. thuringiensis* parece ser diferente daquele de *B. cereus*. SANTOS *et al.* (2010) demonstraram que linhagens de *B. thuringiensis* são mais adaptadas à germinação dos esporos e multiplicação das células vegetativas em cadáveres de *B. mori*, quando comparadas a linhagens de *B. cereus*. Uma vez que ocorre a germinação dos esporos, fatores de virulência, dentre os citados e outros ainda não identificados, passam a ser expressos e contribuem para a colonização do hospedeiro. FEDHILA *et al.* (2010) sugerem que a presença de fatores de virulência específicos para a adaptação no intestino de insetos existem em *B. thuringiensis* e *B. cereus* e podem ter co-evoluídos entre o hospedeiro e o patógeno, o que é justificável pela grande similaridade genética encontrada em ambas espécies bacterianas. Contudo, ressalta-se que a modulação da expressão destes fatores, pode sofrer influências ambientais rígidas e estão intimamente relacionados com o nicho destas bactérias.

Atualmente, a principal preocupação concernente a utilização de formulações à base de *B. thuringiensis* é o fato das linhagens utilizadas para este fim poderem produzir, além das proteínas Cry, outras toxinas, visto a alta prevalência destes genes entre isolados de *B. thuringiensis*. Alguns trabalhos têm realizado a bioprospecção de novos isolados, com o intuito de minimizar tais preocupações, entretanto até o momento na há relato em literatura de isolados de *B. thuringiensis* que produzem níveis elevados de enterotoxinas, nas condições de cultivo empregadas para a fabricação do bioinseticida de *B. thuringiensis*, o que confirma a sua remarcável segurança.

Deve-se destacar ainda que apesar de linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas para a fabricação de produtos biotecnológicos possuírem os genes codificantes para os fatores de virulência aqui descritos, estes produtos antes de serem comercializados são avaliados rigorosamente para que não tragam riscos à saúde humana e ao ambiente. Nos Estados Unidos da América, a *Environmental Protection Agency* (US-EPA) e os estados individuais (geralmente a Secretaria de Estado da Agricultura) regulamentam o registro ou a licença de bioinseticidas para o uso em escala comercial. Os testes necessários para a regulamentação incluem: efeitos sobre os mamíferos com a inalação, oral e exposição dérmica, exposição escarificação cutânea, a exposição ocular e intraperitoneal, via subcutânea, e os testes com animais sadios e imunossuprimidos. Os testes também são realizados para avaliar os efeitos sobre as aves, vertebrados aquáticos, incluindo invertebrados não-insetos e insetos não-alvo, insetos aquáticos, insetos terrestres, abelhas, parasitóides e plantas não-alvo EPA (2011). Estes testes de toxicidade não devem indicar quaisquer efeitos adversos significativos nos animais testados e sobre o meio ambiente, garantindo assim a biossegurança dos produtos à base *B. thuringiensis*.

REFERÊNCIAS

- Agaisse, H., M. Gominet, O.A. Okstad, A.B. Kolsto & D. Lereclus, 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 32: 1043–1053.

- Agata N., M. Ohta, Y. Arakawa & M. Mori, 1995. The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*, 141: 983–988.
- Andreeva, Z., V. Nesterenko, I. Yurkov, Z.I. Budarina, E. Sineva & A.S. Solonin, 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expression and Purification*, 47: 186–193.
- Arantes, O.M.N., D. Capalbo, I. Moraes, L. Regis & L. Rabinovitch, 2002. Bioinsecticide production issues with a focus on latin America. *Documentos Embrapa Soja*, 1: 187–191.
- Asano, S., K. Ogiwara, L.S. Indrasith, M. Takahashi, N. Suzuki & H. Hori, 2000. Synergism of the spore on insecticidal activity of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) is not observed at late stage in bioassay. *Applied Entomology and Zoology*, 35: 583–590.
- Asano, S.I., Y. Nukumizu, H. Bando, T. Iizuka & T. Yamamoto, 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1054–1057.
- Autret, N. & A. Charbit, 2005. Lessons from signature-tagged mutagenesis on the infectious mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:703–717.
- Baida, G.E. & N.P. Kuzmin, 1996. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1284: 122–124.
- Baida, G.E. & N.P. Kuzmin, 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1264: 151–154.
- Batchoun, R., Al-Sha'er, A.I. & Khabour, O.F. 2011. Molecular Characterization of *Bacillus cereus* toxigenic strains isolated from different food matrices in Jordan. *Foodborne Pathogens and Disease*, *In press*, 2011.
- Beecher, D.J. & A.C.L. Wong, 1994a. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 62: 980–986.
- Beecher, D.J. & A.C.L. Wong, 1994b. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4614–4616.
- Boman, H. G. & D. Hultmark, 1987. Cell-free immunity in insects *Annual Review of Microbiology*, 41: 103–126.
- Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi & J.R. Valéro, 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41: 323–342.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435.
- Brüssow, H., C. Canchaya & W.D. Hardt, 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 560–602.
- Budarina, Z.I., D.V. Nikitin, N. Zenkin, M. Zakharova, E. Semenova, M.G. Shlyapnikov, E.A. Rodikova, S. Masyukova, O. Ogarkov, G.E. Baida, A.S. Solonin & K. Severinov, 2004. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* hemolysin II. *Microbiology*, 150: 3691–3701.
- Budarina, Z.I., M.A. Sinev, S.G. Mayorov, A.Y. Tomashevski, I.V. Shmelev & N.P. Kuzmin, 1994. Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Archives of Microbiology*, 161: 252–257.
- Burges, H.D., E.M. Thompson & R.A. Latchford, 1976. Importance of spores and delta-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27: 87–94.
- Callegan, M.C., D.C. Cochran, S.T. Kane, M.S. Gilmore, M. Gominet & D. Lereclus, 2002. Contribution of membrane-damaging toxins to *Bacillus endophthalmitis* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 70: 5381–5389.
- Camilli, A., D.T. Beattie & J.J. Mekalanos, 1994. Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 91: 2634–2638.
- Chen, J., J. Yu, L. Tang, M. Tang, Y. Shi & Y. Pang, 2003. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 310–316.
- Choma, C. & P.E. Granum. 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 115–119.
- Clair, G., S. Roussi, J. Armengaud & C. Duport, 2010. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9: 1486–1498.
- Dalhammar, G. & H. Steiner, 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *European Journal of Biochemistry*, 139: 247–252.
- Damgaard, P.H., P.E. Granum, J. Bresciani, M.V. Torregrossa, J. Eilenberg & L. Valentino, 1997. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 18: 47–53.
- Declerck, N., L. Bouillaut, D. Chaix, N. Rugani, L. Slamti, F. Hoh, D. Lereclus & S.T. Arold, 2007. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 104: 18490–18495.
- Delécluse, A., J.-F. Charles, A. Klier & G. Rapoport, 1991. Deletion in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *Journal of Bacteriology*, 173: 3374–3381.
- De Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore & H.E. Schnepf, 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37: 409–433.
- Donovan, W.P., J.C. Donovan & J.T. Engleman, 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 45–51.
- Du, C. & K.W. Nickerson, 1996. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1ac toxin: physiological and pathogenic consequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3722–3726.
- Edlund, T., I. Siden & H.G. Boman, 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infection and Immunity*, 14: 934–941.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2011. Biopesticide Registration Tools. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools>>. Acesso 10/03/2011.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mulis, G.J. Nye, J.A. Craig & M.G. Koziel, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 93: 5389–5394.
- Fagerlund, A., O. Ween, T. Lund, S.P. Hardy & P.E. Granum, 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150: 2689–2697.

- Fedhila, S., C. Buisson, O. Dussurget, P. Serror, I.J. Glomski, P. Liehl, D. Lereclus & C. Nielsen-LeRoux, 2010. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 24–29.
- Fedhila, S., N. Daou, D. Lereclus, D. & C. Nielsen-LeRoux, 2006. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Molecular Microbiology*, 62: 339–355.
- Fedhila, S., E. Guillemet, P. Nel & D. Lereclus, 2004. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by *in vivo* screening of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4784–4791.
- Fedhila, S., N. Patricia & D. Lereclus, 2002. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *Journal of Bacteriology*, 184: 3296–3304.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A.C.L. Wong & S. Senesi, 2002. Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 184: 6424–6433.
- Gilois, N., N. Ramarao, L. Bouillaut, S. Perchat, S. Aymerich, C. Nielsen-LeRoux, D. Lereclus & M. Gohar, 2007. Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. *Proteomics*, 7: 1719–1728.
- Glare, T.R. & M. O'Callaghan, 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. New York, Wiley, 368p.
- Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O.A. Økstad, M. Gominet, A.B. Kolstø & D. Lereclus, 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3:e2793.
- Gohar, M., O.A. Økstad, N. Gilois, V. Sanchis, A.B. Kolstø & D. Lereclus, 2002. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* 2:784–791.
- Gonzalez, E., J.C. Granados, J.D. Short, D.R. Ammons & J. Rampersad, 2011. Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Current Microbiology*, in press.
- Granum, P.E., K. O'Sullivan & T. Lund, 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 177: 225–229.
- Granum, P.E. & T. Lund, 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157: 223–228.
- Granum, P.E., 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement*, 76: 61S–66S.
- Guillemet, E., C. Cadot, S.L. Tran, M.H. Guinebrière, D. Lereclus & N. Ramarao, 2010. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology*, 192: 286–294.
- Hansen, B.M., P.E. Høiby, G.B. Jensen & N.B. Hendriksen, 2003. The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiology Letters*, 223: 21–24.
- Harvie, D.R. & D.J. Ellar, 2005. A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*, 50: 246–250.
- Harvie, D.R., S. Vilchez, J.R. Steggle & D.J. Ellar, 2005. *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology*, 151: 569–577.
- Hensel, M., J.E. Shea, C. Gleeson, M.D. Jones, E. Dalton & D. Holden, 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269: 400–403.
- Herbert, M.A., S. Hayes, M.E. Deadman, C.M. Tang, D.W. Hood & E.R. Moxon, 2002. Signature tagged mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for *in vivo* survival. *Microbial Pathogenesis*, 33: 211–223.
- Hergenrother, P.J. & S.F. Martin, 1997. Determination of the kinetic parameters for phospholipase C (*Bacillus cereus*) on different phospholipids substrates using a chromogenic assay based on the quantitation of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry*, 251: 45–49.
- Hernandez, E., F. Ramisse, J.-P. Ducoureau, T. Cruel & J.-D. Cavallo, 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkunan* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2138–2139.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley, 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53: 242–255.
- Hultmark, D., A. Engstrom, H. Bennich, R. Kapur & H.G. Boman, 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *European Journal of Biochemistry*, 127: 207–217.
- Ikezawa, H. & R. Taguchi, 1981. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Methods in Enzymology*, 71: 731–741.
- Inagaki, S., M. Miyasono, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda & Y. Hayashi, 1992. Induction of antibacterial activity against *Bacillus thuringiensis* in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 27: 565–570.
- Jackson, S.G., R.B. Goodbrand, R. Ahmed & S. Kasatiya, 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology*, 21: 103–105.
- Johnson, D.E., B. Oppert & W.H. McGaughey, 1998. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the Indian meal moth (*Plodia interpunctella*). *Current Microbiology*, 36: 278–282.
- Johnson, D.E. & W.H. McGaughey, 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current Microbiology*, 33: 54–59.
- Jung, Y.C., E. Mizuki, T. Akao & J.C. Côté, 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 65–79.
- Katayama, H., H. Yokota, T. Akao, O. Nakamura, M. Ohba, E. Mekada & E. Mizuki, 2005. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*, 137: 17–25.
- Kitada, S., Y. Abe, H. Shimada, Y. Kusaka, Y. Matsuo, H. Katayama, S. Okumura, T. Akao, E. Mizuki, O. Kuge, Y. Sasaguri, M. Ohba & A. Ito, 2006. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 26350–26360.
- Kuppe, A., L.M. Evans, D.A. McMillan & O.H. Griffith, 1989. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. *Journal of Bacteriology*, 171: 6077–6083.
- Lee, M.K., F.S. Walters, H. Hart, N. Palekar & J.S. Chen, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab-endotoxin. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 4648–4657.
- Lereclus D., H. Agaisse, C. Grandvalet, S. Salamitou & M. Gominet, 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 290: 295–299.

- Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, S. Salamitou & V. Sanchis, 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of bacteriology*, 178: 2749–2756.
- Li, J., P.A. Koni & D.J. Ellar, 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257:129–152.
- Li, R.S.; P. Jarrett & H.D. Burges, 1987. Importance of spores, crystals, and delta -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50: 277–284.
- Lindbäck, T., A. Fagerlund, M.S. Rodland & P.E. Granum, 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150: 3959–3967.
- Liu, Y.-B., B.E. Tabashnik, W.J. Moar & R.A. Smith, 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins against Resistant and Susceptible Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1385–1389.
- Loguercio, L.L., M.L. Barreto, T.L. Rocha, C.G. Santos, F.F. Teixeira & E. Paiva, 2002. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for *Vip*-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 269–277.
- Lund, T., M.L. De Buyser & P.E. Granum, 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38: 254–261.
- Lund, T. & P.E. Granum, 1996. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology. Letters*, 141: 151–156.
- Mahan, M.J., J.M. Slauch & J.J. Mekalanos, 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 259: 686–688.
- Mahillon, J., R. Rezsöházy, B. Hallet & J. Delcour, 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: A review. *Genetica*, 93:13–26.
- Mahillon, J. & D. Lereclus, 1988. Structural and functional analysis of Tn4430: identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate-resolution process. *The EMBO Journal*, 7: 1515–1526.
- Maroncle, N., D. Balestrino, C. Rich & C. Forestier, 2002. Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 70: 4729–4734.
- Michelet, N., P.E. Granum & J. Mahillon, 2006. *Bacillus cereus* enterotoxins, bi- and tri-component cytolytins and other haemolysins, p 779-790. In: Alouf, J. & M.R. Popoff (Eds.). *The comprehensive sourcebook of bacterial toxins*. London, Academic Press, 1072p.
- Mizuki, E., Y.S. Park, D.H. Saitoh, S. Yamashita, T. Akao, K. Higuchi & M. Ohba, 2000. Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7: 625–634.
- Nagamatsu, Y., S. Okamura, H. Saitou, T. Akao & E. Mizuki, 2010. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain MO19 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74: 494–498.
- Nicholas, K.B., H.B.Jr. Nicholas & D.W. Deerfield, 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW, NEWS* 4:14.
- Ohba, M., E. Mizuki & A. Uemori, 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29: 427–433.
- Okumura, S., M. Ohba, E. Mizuki, N. Crickmore, J.-C. Côté, Y. Nagamatsu, S. Kitada, H. Sakai, K. Harata, & T. Shin, 2010. “Parasporin nomenclature” <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>
- Osborn, A.E., C.E. Barber & M.J. Daniels, 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *The EMBO Journal*, 6: 23–28.
- Ottemann, K.M. & J.F. Miller, 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology*, 24: 1109–1117.
- Parasporin Classification and Nomenclature <<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka-jp/intro.html>> acesso em 08/03/2011.
- Pomerantsev, A.P., K.V. Kalnin, M. Osorio & S.H. Leppla, 2003. Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Sphingomyelinase Activities in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Infection and Immunity*. 71: 6591–6606.
- Ravoahangimalala, O. & J.-F. Charles, 1995. *In vitro* binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *FEBS Letters*, 362: 111–115.
- Ravoahangimalala, O., J.-F. Charles & J. Schoeller-Raccaud, 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae Diptera: Culicidae. *Research in Microbiology*, 144: 271–278.
- Rediers, H., P.B. Rainey, J. Vanderleyden & R. De Mot, 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of *in vivo* expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69: 217–261.
- Ruiz-Arguello, M.B., F.M. Goni & A. Alonso, 1998. Phospholipase C hydrolysis of phospholipids in bilayers of mixed lipid compositions. *Biochemistry*, 37: 11621–11628.
- Ryan, P.A., J.D. Macmillan & B.A. Zilinskas, 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 179: 2551–2556.
- Salamitou, S., H. Agaisse & D. Lereclus, 1997. A genetic system that reports transient activation of genes in *Bacillus*. *Gene*. 202: 121-126.
- Samples, J.R. & H. Beuttner, 1983. Corneal ulcer caused by a biological insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *American Journal of Ophthalmology*, 95: 258–260.
- Santos, C.A., G.T. Vilas-Bôas, D. Lereclus, M.T. Suzuki, E.A. Angelo & O.M.N. Arantes, 2010. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains is not directly correlated with growth of recipient strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105: 171–175.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J.V. Rien, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775–806.
- Shi, Y., W. Xu, M. Yuan, M. Tang, J. Chen & Y. Pang, 2004. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 757–765.
- Slamti, L. & D. Lereclus, 2005. Specificity and Polymorphism of the PlcR-PapR Quorum-Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Bacteriology*, 187: 1182–1187.
- Slamti, L. & D. Lereclus, 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO Journal*, 21: 4550–4559.

- Steggles J.R., J. Wang & D.J. Ellar, 2006. Discovery of *Bacillus thuringiensis* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in an insect model of septicaemia. *Current Microbiology*, 53: 303–310.
- Tran, S.L., E. Guillemet, M. Ngo-Camus, C. Clybouw, A. Puhar, A. Moris, M. Gohar, D. Lereclus & N. Ramarao, 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular Microbiology*, 13: 92–108.
- Vilas-Bôas, G.T., A.P.S. Peruca & O.M.N. Arantes, 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 673–687.
- Wang, J., J.R. Steggles & D.J. Ellar, 2008. Molecular characterization of virulence defects in *Bacillus thuringiensis* mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 280: 127–134.
- Warren, G.W., 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p. 109-121. In: Carozzi, N. & M. Koziel (Eds.). *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. London, Taylor & Francis, 304p.
- Warren, R.E., D. Rubenstein, D.J. Ellar, J.M. Kramer & R.J. Gilbert, 1984. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: protoxin activation and safety. *The Lancet*, 24: 678–679.
- WHO (World Health Organization), 1999. International programme on chemical safety (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Health Criteria*, 217: 1–105.
- Yu, C.G., M.A. Mullins, G.W. Warren, M.G. Koziel & J.J. Estruch, 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3a lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 532–536.
- Zhang, M.Y., A. Lovgren, M.G. Low & R. Landen, 1993. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* - reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infection and immunity*, 61: 4947–4954.

Recebido em: 24/03/2011

Aceito em: 25/09/2011

Como citar este artigo:

Vilas-Bôas, G.T., R.C. Alvarez, C.A. dos Santos & L.A. Vilas-Boas, 2012. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? *EntomoBrasilis*, 5(1): 1-10.

Acessível em: <http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/article/view/146>

