

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS**

**Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – CBIot**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**POTENCIAIS RECEPTORES DE *Anthonomus grandis* Boheman  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) PARA TOXINAS CRY DE *Bacillus  
thuringiensis* Berliner**

**Erich Yukio Tempel Nakasu**

Dissertação submetida ao Programa de Pós – Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Porto Alegre – RS

### **AGENTES FINANCIADORES:**

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.
- Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (LIMPP).
- Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

## DEDICATÓRIA

Para meus pais, Bonifácio e Ricarda Nakasu.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM**, pelo investimento que fizeram em minha formação.

À **Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, por viabilizar a condução deste trabalho, bem como o contato com os pesquisadores e estudantes que fazem parte desta empresa.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pela bolsa de estudos.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À **Dra. Maria Fátima Grossi de Sá**, pela orientação e superestima.

Aos membros da banca examinadora, **Dr. Thales Rocha, Dr. Alexandre Macedo e Dra. Alejandra Bravo**.

À **Profa. Dra. Célia Carlini** e ao **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, membros da minha comissão de acompanhamento.

À **Dra. Simoni Campos Dias** e ao **Alexandre Firmino**, por me ajudarem no começo do trabalho.

Ao **Hudson Batista** e ao **Gustavo Ramos** pelo grande apoio na expressão e purificação das proteínas.

À **Dra. Débora Pires, Dra. Maria Caroline Moraes e Dra. Ângela Mehta**, pela ajuda nas análises espectrais.

Ao **Dr. Osmundo Brillhante**, pela conduta e retidão nas discussões sobre meu trabalho.

À **Silvia Centeno** e ao **Luciano Saucedo**, pela competência e atenção com que me receberam.

Às pessoas do LIMPP **Rodrigo Fragoso, Dra. Cristina Mattar, Fábio Gurgel, Aulus Barbosa, Djair Souza, Érico Vasconcelos, Fernando Fonseca, José Edilson, José Dijair, Paulo Henrique, Rafael Del Sarto, Magda Beneventi, Ariane Lacerda, Isabela Tristan, Caroline Bezerra, Carlos Eduardo, Luciane Mourão, Máira Grossi, Raquel Sampaio, Roberta Coelho, Vanessa Olinto,**

**Vívian Miranda, Angelina Basso, Anne Winne, Charles Dayler, Tiago Siqueira, Natália Lamas, Marcelo Reis, Larissa Tancredi** e várias outras pessoas, entre amigos e colegas de trabalho, que passaram por este laboratório.

Ao meu primo **Felipe Stumpf** e minha tia **Íris** e meu tio **Éverton Costa**, por me acolherem em minhas estadias em Porto Alegre.

“In science, self-satisfaction is death. Personal self-satisfaction is the death of the scientist. Collective self-satisfaction is the death of the research. It is restlessness, anxiety, dissatisfaction, agony of mind that nourish science”.

Jacques Lucien Monod (1910–1976)

# ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 Cotonicultura	17
1.1.1 <i>Anthonomus grandis</i> Boheman, 1843	20
1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	23
1.2.1 Toxinas Cry	25
1.2.2 Mecanismo de ação das toxinas Cry	28
1.3 Justificativa	33
1.4 Hipótese	33
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>34</b>
2.1 Estratégias utilizadas	34
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1 Insetos	35
3.2 Produção, ativação e avaliação da toxina Cry1Ac	35
3.3 Produção e purificação da toxina Cry8Ka1	37
3.4 Produção e purificação da toxina Cry8Ka5	38
3.5 Marcação das toxinas com biotina	39
3.6 Extração de proteínas do intestino de larvas de <i>Anthonomus grandis</i>	40
3.7 Ligação das toxinas a proteínas do intestino de <i>A. grandis</i> em condições desnaturantes	40
3.8 Identificação das proteínas ligantes por espectrometria de massa	43
3.9 Bioensaios com <i>A. grandis</i>	46



<b>4 RESULTADOS</b>	<b>47</b>
4.1 Purificação das toxinas	47
4.1.1 Produção, ativação e avaliação da toxina Cry1Ac	47
4.1.2 Produção e purificação de Cry8Ka1	48
4.1.3 Produção e purificação de Cry8Ka5	50
4.2 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry	54
4.2.1 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry utilizando géis unidimensionais.	54
4.2.2 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry utilizando géis Bidimensionais	58
4.3 Avaliação do potencial de competição entre as toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 por receptores <i>in vivo</i>	63
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>
<b><i>Curriculum Vitae</i></b>	<b>88</b>
<b>ANEXO (Artigos publicados e submetidos no período)</b>	<b>97</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Referente à eletroforese unidimensional
2DE	Referente à eletroforese bidimensional
Å	Ângstron
ABS	Absorbância
APN	Aminopectidase N
BBMV(s)	<i>Brush border membrane vesicle(s)</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina de soro bovino
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray Ionization
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HSP	Heat-Shock Protein
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Quilo Daltons
LB	Meio Luria-Bertani
<i>m/z</i>	Massa/Carga
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinamida
NTA	Ácido nitroacético
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS	Tampão fosfato salino
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TOF	Time of Flight
V	Volts
V-ATPase	ATPase vacuolar
Vh	Volts/Hora
w	Watt

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do bicudo do algodoeiro	22
<b>Figura 2:</b> Microscopia de contraste de fase demonstrando os esporos	24
<b>Figura 3:</b> Estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa e Cry4Ba	27
<b>Figura 4:</b> Moléculas receptoras das proteínas Cry1A.	29
<b>Figura 5:</b> Modo de ação das toxinas Cry – modelo da formação de poro	30
<b>Figura 6:</b> Modo de ação das toxinas Cry – modelo da transdução de sinal.	32
<b>Figura 7:</b> Equipamentos utilizados para eletroforese bidimensional	43
<b>Figura 8:</b> SDS – PAGE 10% da expressão e ativação da toxina Cry1Ac	47
<b>Figura 9:</b> Primeira etapa para purificação de Cry8Ka1	48
<b>Figura 10:</b> Segunda etapa de purificação de Cry8Ka1	49
<b>Figura 11:</b> Análise da purificação de Cry8Ka1 por SDS-PAGE 10%.	50
<b>Figura 12:</b> Purificação de Cry8Ka5, utilizando cromatografia de afinidade	51
<b>Figura 13:</b> Etapa de polimento da toxina Cry8Ka5	52
<b>Figura 14:</b> Análise da purificação da toxina Cry8Ka5	53
<b>Figura 15:</b> Ensaio de ligação das toxinas Cry1Ac, Cry8Ka1 e Cry8Ka5	55
<b>Figura 16:</b> Alinhamento dos peptídeos derivados da banda B	57
<b>Figura 17:</b> Eletroforese bidimensional de BBMV de <i>A. grandis</i>	59.
<b>Figura 18:</b> Identificação de prováveis receptores para Cry utilizando 2DE	60
<b>Figura 19:</b> Superposição dos peptídeos derivados da banda C	62
<b>Figura 20:</b> Representação gráfica dos tratamentos do bioensaio	64

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Condições eletroforéticas utilizadas para focalização isoelétrica	<b>42</b>
<b>Tabela 2:</b> Proteínas identificadas por espectrometria de massa.	<b>56</b>
<b>Tabela 3:</b> Identificação do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular	<b>61</b>
<b>Tabela 4:</b> Experimento de competição entre toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5	<b>63</b>
<b>Tabela 5:</b> Comparação entre os tratamentos do experimento de competição	<b>64</b>

## RESUMO

As toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* apresentam atividade inseticida e alto grau de especificidade a certos grupos de insetos, sendo inócuas para vertebrados. Estas características vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para o controle de pragas. O inseto-praga de maior importância na cotonicultura brasileira é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), inseto de hábitos larvais endofíticos, e, por isso, de difícil controle. O objetivo deste trabalho foi identificar os prováveis receptores deste inseto para toxinas Cry. O gene para a toxina Cry8Ka1 foi clonado e um mutante com alta toxicidade foi obtido pelas técnicas de *DNA Shuffling* e *Phage Display*. Este mutante, Cry8Ka5, foi utilizado para identificação dos receptores. Experimentos de ligação realizados após SDS-PAGE indicam que as toxinas Cry1Ac, Cry8Ka1 e Cry8Ka5 marcadas com biotina são capazes de ligação às mesmas proteínas presentes no epitélio intestinal do inseto. Destas, uma HSP70 *cognate* e uma V-ATPase, foram identificadas via seqüenciamento *de novo*, enquanto um ligante de ~120kDa não pôde ser identificado. Cinco spots capazes de reconhecimento pela Cry8Ka5 foram identificados em 2DE, demonstrando capacidade de ligação a diferentes isoformas ou a proteínas apresentando modificações pós-translacionais. Como Cry1Ac não é tóxica para *A. grandis* e é capaz de ligação às mesmas proteínas, um bioensaio foi conduzido com o objetivo de validar o papel funcional dos ligantes. Foram feitos quatro tratamentos: 1) Controle negativo (H<sub>2</sub>O); 2) Cry1Ac; 3) Cry8Ka5; 4) Cry8Ka5+Cry1Ac. Apenas o tratamento 3 diferiu estatisticamente dos demais, indicando que a ligação de Cry1Ac a estas proteínas bloqueia o mecanismo de ação de Cry8Ka5.

## ABSTRACT

The Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* display insecticidal activity and are highly specific to certain groups of insects, being harmless to vertebrates. These characteristics have been used to the development of genetically modified plants to control economically important insect-pests. The insect pest of major importance in the Brazilian cotton culture is the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*), insect of endophytic larval habits, and therefore difficult to control. The aim of this work was to identify putative receptors of this insect to Cry toxins. A gene for Cry8Ka1 toxin was cloned and a mutant with high toxicity against *A. grandis* was obtained by *DNA Shuffling* and *Phage Display* techniques. This mutant, called Cry8Ka5, was used to identify the receptors. Ligand blot experiments performed after SDS-PAGE indicated that biotin-labeled Cry1Ac toxin (not toxic to *A. grandis*), Cry8Ka5 and Cry8Ka1 are able to recognize the same proteins from the midgut of *A. grandis*. Two of them, a HSP70 cognate and a V-ATPase were identified by *de novo* sequencing, whereas a ~120kDa protein was not identified. The characterization of these proteins via two-dimensional gel electrophoresis revealed the presence of five spots capable of binding to Cry8Ka5, demonstrating its ability to recognize different isoforms or showing post-translational modifications. As Cry1Ac is not toxic to *A. grandis* and is able to bind to the same proteins, a bioassay was conducted to evaluate the functional role of the ligands. Four treatments were conducted: 1) negative control (H<sub>2</sub>O); 2) Cry1Ac, 3) Cry8Ka5 4) Cry8Ka5 + Cry1Ac. Only treatment 3 presented statistical difference, indicating that the Cry1Ac binding to these proteins blocks Cry8Ka5 mechanism of action.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior país em área disponível para expansão agrícola, com cerca de 328 milhões de hectares (SALOMÃO & SEIBEL, 2005), estando entre os três maiores importadores de inseticidas no mundo (HASENCLEVER & ANTUNES, 2008). O uso da biotecnologia para contornar os gastos e os impactos causados pelo uso destes defensivos químicos é crescente, assim como a aposta de grupos internacionais em sementes geneticamente modificadas (GM).

Diferentes genes que codificam produtos com atividade inseticida já foram inseridos em plantas, como inibidores de enzimas hidrolíticas digestivas, lectinas, quitinases, entre outros (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002). Entretanto, a utilização de plantas expressando toxinas Cry provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* é a mais amplamente difundida no controle de insetos-praga (GROSSI DE SÁ & ROMANO, 2003). Atualmente, a praga de maior importância na cotonicultura brasileira é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*). O controle químico deste inseto é dificultado pelos hábitos endofíticos das larvas. Desta forma, a utilização de plantas transgênicas expressando toxinas Cry constitui uma alternativa viável. A elucidação do mecanismo de ação e dos fatores envolvidos na toxicidade é vital para o melhoramento destas moléculas, bem como no uso racional desta tecnologia, de forma a evitar o desenvolvimento de resistência.



## 1.1 Cotonicultura

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das principais plantas utilizadas para a produção de fibras naturais no mundo, constituindo uma das cadeias produtivas mais importantes do Brasil. A cotonicultura está classificada entre as dez principais práticas agrícolas do País, sendo que a maior produção ocorre na região Centro Oeste, especialmente em Goiás e Mato Grosso (representando 50% da área plantada e 70% da produção nacional) (CONAB, 2006). Atualmente, o Brasil é o quinto maior produtor mundial, sendo que em 2007, 3,85 milhões de toneladas foram produzidas em 1,1 milhão de hectares, com produtividade de 3,475 Kg/ha (IBGE, 2008).

Atualmente, a cultura está sofrendo um declínio em área plantada e produção. Segundo a CONAB (2008), espera-se que o País colha entre 1,3649 e 1,428 milhão de toneladas de algodão em pluma na safra 2008/2009, uma redução entre 10,9 e 14,8% em relação à safra passada (1,6022 milhão de toneladas). No ano de 2009, está prevista uma redução de até 19,7% da área plantada no Centro Oeste (responsável por 59% da produção nacional de algodão em pluma) e em outros importantes Estados produtores, como Minas Gerais e São Paulo, embora em menor escala. Esta redução deve-se à concorrência com a soja, que possui cotações mais positivas no momento e, principalmente, à alta nos preços dos insumos (CONAB, 2008). Dentre estes, os agentes de controle de insetos merecem destaque, podendo custar até 25% do custo da produção (GALLO *et al.*, 2002).

Pelo menos trinta espécies de insetos e três espécies de ácaros são citadas na literatura como pragas do algodoeiro. GONDIM *et al.* (2001) descrevem que, dentre as pragas da parte aérea do algodão, destacam-se os pulgões *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), além de trips, como pragas da fase inicial devido aos danos diretos e como vetores da doença azul e de outras viroses. Durante a fase vegetativa e o início da fase reprodutiva, lepidópteros desfolhadores como o curuquerê do algodão *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) são as principais pragas. Já durante a fase reprodutiva, o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), a lagarta da maçã *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta rosada *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) são as pragas dominantes, merecendo a maior atenção por parte dos produtores para o seu controle. Assim, há uma demanda por formas menos onerosas para controle de insetos-praga, mais eficientes e que causem menores danos ao meio-ambiente.

Desde o início da década de 90, a biotecnologia permite a geração de plantas geneticamente modificadas expressando altos níveis de resistência específica a pragas primárias em diversas culturas (PERLAK *et al.*, 1993). Até o momento, várias toxinas *Bt* expressas em culturas transgênicas foram selecionadas para controle de lepidópteros e coleópteros, possuindo toxicidade limitada sobre outras ordens de insetos (BERNAL *et al.*, 2002). Uma das vantagens da adoção de plantas transgênicas é a elevada redução no uso de pesticidas químicos, provendo benefícios à saúde humana e ao meio-ambiente

(SHELTON *et al.*, 2002). CATANNEO *et al.* (2006) relatam menor aplicação de inseticidas de amplo espectro em campos de algodão *Bt* expressando a toxina Cry1Ac, e maior produção de fibras nos EUA. MEN *et al.* (2003) observaram menor diversidade de pragas e outros artrópodes em campos de algodão *Bt* (Delta & Pine NuCOTN 33B, expressando Cry1Ac) aliado ao uso de pesticidas em relação a plantios convencionais na China. Isso devido, principalmente, à forte pressão de seleção da toxina expressa na planta, aliado ao uso de agroquímicos de amplo espectro. Assim, uma menor diversidade de pragas contribuiu para um decréscimo em populações de inimigos naturais, devido a fatores como mortalidade e migração. Efeitos mínimos são relatados na utilização da mesma variedade GM sobre comunidades de inimigos naturais em relação aos danos causados por inseticidas de amplo espectro (NARANJO, 2005). Isso porque a efetividade da variedade no controle de pragas primárias do algodão nos EUA diminuiu a necessidade das inúmeras aplicações de defensivos agrícolas. Na China, o plantio de algodão expressando a toxina Cry1Ac para controle de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) diminuiu a ocorrência desta praga em outras plantações, como milho e amendoim (WU *et al.*, 2008).

Em outras culturas, como a do milho *Bt* e da soja transgênica, o efeito sobre insetos não-alvo não é significativo (JASINSKI *et al.*, 2003). Dessa forma, pragas não suscetíveis aos produtos dos transgenes e de importância secundária podem se alimentar em culturas GM, e com uso reduzido de pesticidas essas populações podem ser naturalmente reguladas por predadores e parasitóides (ASHOURI *et al.*, 2001).

Em março de 2005, a CTNBio aprovou o cultivo e a comercialização do algodoeiro geneticamente modificado para resistência a insetos Bollgard I®, contendo a proteína Cry1Ac. O evento tem resistência a alguns dos principais insetos-praga da ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão no Brasil, como o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), embora não possua efeitos sobre outros insetos-praga, como *A. grandis*. Atualmente, o Brasil é o terceiro em maior área plantada com transgênicos, sendo que no mundo plantas GM expressando resistência contra insetos ou dupla resistência (contra insetos e herbicidas) respondem por cerca de 30% de área plantada com transgênicos, sendo o algodoeiro o terceiro mais cultivado (JAMES, 2007).

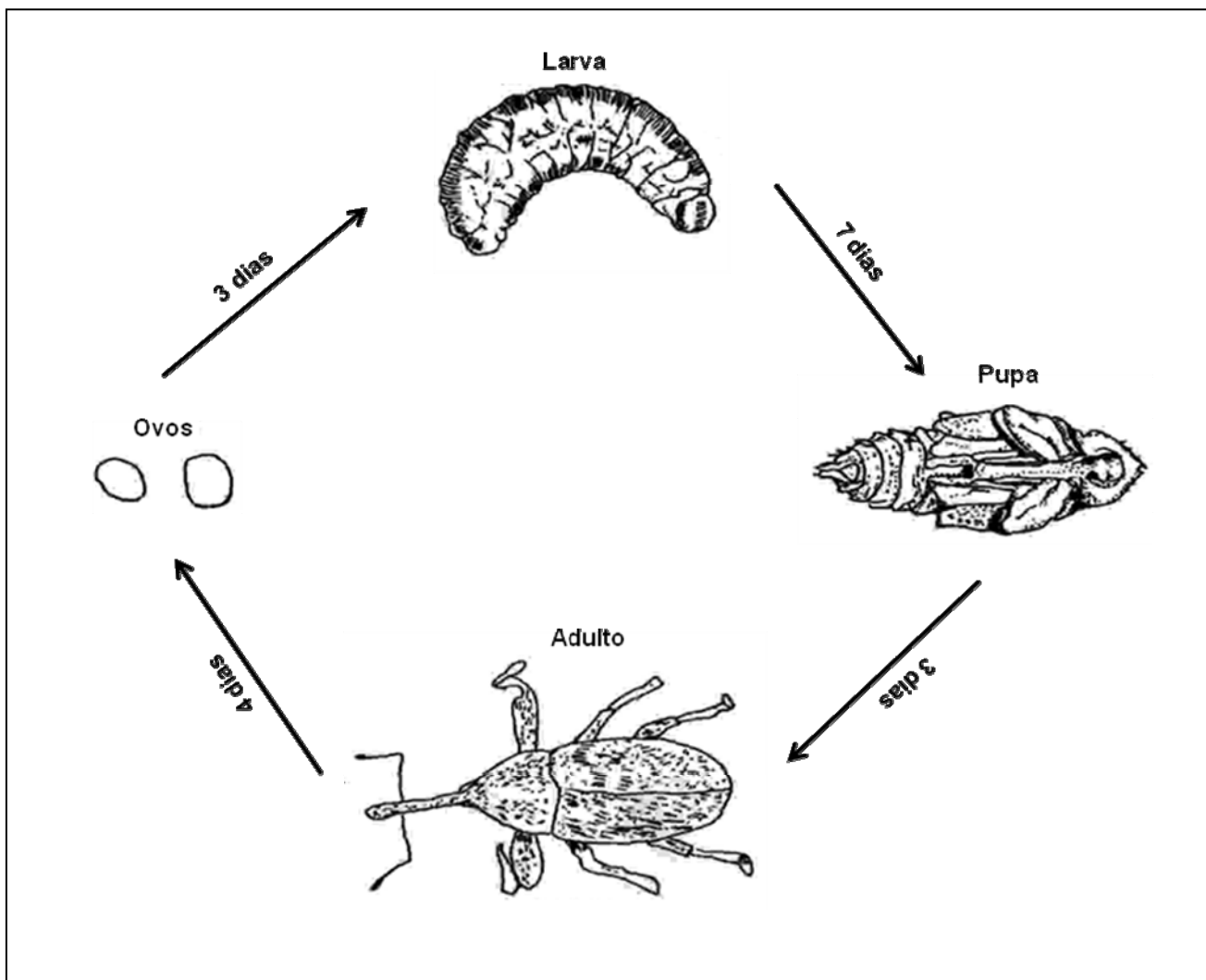
### **1.1.1 *Anthonomus grandis* Boheman, 1843**

O bicudo do algodoeiro *A. grandis* (Coleoptera: Curculionidae) é considerado a maior praga da cotonicultura no continente americano, provocando queda de botões florais e redução na qualidade das fibras. Originário da América Central, o inseto foi registrado nos Estados Unidos da América pela primeira vez em 1892, infestando toda a área sudeste do país em menos de 30 anos. Posteriormente, o bicudo do algodoeiro disseminou-se para a Venezuela em 1949 e Colômbia, em 1950. O Brasil foi o último país americano a registrar a ocorrência desse inseto, em fevereiro de 1983, na região de Santa Bárbara do Oeste, São Paulo (LOZADA *et al.*, 1987). Em 1985, o bicudo do algodoeiro já havia se

dispersado por cerca de 350 mil hectares de algodão, nos Estados de São Paulo, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

O ciclo de vida do bicudo do algodoeiro é relativamente curto. O processo de infestação tem início quando os botões florais do algodão atingem cerca de 6 mm de diâmetro. Os ovos são elípticos e opacos, medem cerca de 1 mm e são ovipositados individualmente no interior de botões florais e maçãs, atingindo um total de até 300 por fêmea (LEONARD *et al.*, 1999). As larvas são curculioniformes, eclodindo entre três a cinco dias após a oviposição, alimentando-se por sete a 12 dias no interior de botões florais e maçãs, até o estágio de pupa. Após a emergência, os adultos alimentam-se por três a sete dias, até copularem e produzirem mais ovos, reiniciando o ciclo (Figura 1).

Considerando que os adultos alimentam-se inserindo seu aparelho bucal em partes abaixo da superfície da planta, e que todo o desenvolvimento do inseto é endofítico, o bicudo do algodoeiro é considerado um dos insetos-praga de mais difícil controle (METCALF & METCALF, 1993). Entre as estratégias empregadas, destaca-se a utilização de inseticidas químicos, chegando a 17 aplicações em um ciclo de cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2008), causando danos ao meio-ambiente e aumentando os custos de produção. A utilização de plantas de ciclo curto e agentes de controle biológico, como fungos entomopatogênicos (SILVA, 2001) e parasitóides (ARAÚJO & AZEVEDO, 1997) ainda é incipiente, embora possuam potencial como alternativa ao controle químico. Neste cenário, a utilização de plantas transgênicas expressando genes de resistência a insetos apresenta algumas vantagens, como redução de aplicações, tanto de agentes de controle químico como biológico, além de resistência durante todo o ciclo de produção.



**Figura 1:** Ciclo de vida do bicudo do algodoeiro. Os ovos são individualmente depositados no interior de botões florais ou de maçãs. Após a eclosão, as larvas desenvolvem-se no interior da planta, até o estágio de pupa. Os adultos podem acasalar e ovipositar em apenas quatro dias após a emergência. (imagem adaptada de <http://www.indea.mt.gov.br/html/internas.php?codigoPagina=62> acesso em 01/01/2009).

## 1.2 *Bacillus thuringiensis* Berliner

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva e flagelada. As células medem entre 1 a 1,2 µm de largura e 3 a 5 µm de comprimento, capazes de produzir um esporo por célula. Estes esporos são resistentes ao calor, dessecação e substâncias desinfetantes (RABINOVITCH *et al.*, 2000), podendo permanecer no ambiente por longos períodos (SLEPECKY & LEADBETTER, 1983). Durante a etapa de esporulação, o *Bt* produz inclusões cristalinas protéicas contendo uma ou várias toxinas Cry (BENINTENDE & MARQUEZ, 1996), que possuem atividade inseticida. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas em microscópio de contraste de fases, e o diferenciam de outras espécies da família Bacillaceae (Figura 2). Além das δ-endotoxinas, que incluem as toxinas Cry e Cyt, o *B. thuringiensis* pode produzir outros fatores de entomotoxicidade, como α-exotoxinas, β-exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e toxinas Vip (HANSEN E SALAMITOU, 2000), atuando ou não em sinergia com as toxinas Cry.

As toxinas Cry contidas nesses cristais compreendem pelo menos 50 subgrupos, com mais de 200 membros (BRAVO *et al.*, 2005). Uma ou mais toxinas Cry podem estar contidas em um cristal protéico, os quais possuem formas variadas, podendo ser bipiramidais, esféricos, cubóides, romboidais, retangulares ou irregulares (MAAGD *et al.*, 2003). Classicamente, as cepas de *Bt* são caracterizadas conforme a sorologia flagelar e às toxinas Cry produzidas (LECADET *et al.* 1999).



**Figura 2:** Microscopia de contraste de fase demonstrando os esporos (campo claro) e os cristais de *Bacillus thuringiensis*. (imagem adaptada de <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/bt.htm> acesso em 04/01/2009)

Formulações microbianas contendo  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* têm sido utilizadas como uma alternativa a métodos convencionais de controle químico por quase 60 anos (ROMEIS *et al.*, 2006), principalmente contra insetos da ordem Lepidoptera.

Adicionalmente, *B. thuringiensis* sor. israelensis tem sido utilizado com sucesso no controle de mosquitos e borrachudos na África e em diversos países, como Alemanha, China, Peru, Indonésia, Equador e Brasil (RABINOVITCH *et al.*, 2000). A relativa popularidade da utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico advém de sua inocuidade a plantas e vertebrados, efeito não poluente ao meio ambiente e alta especificidade a insetos suscetíveis (WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Entretanto, as formulações à base de *Bt* possuem algumas limitações, como dificuldade de acesso a pragas que se



alimentam no interior das plantas, baixa persistência no campo e ação letal lenta em relação aos inseticidas químicos.

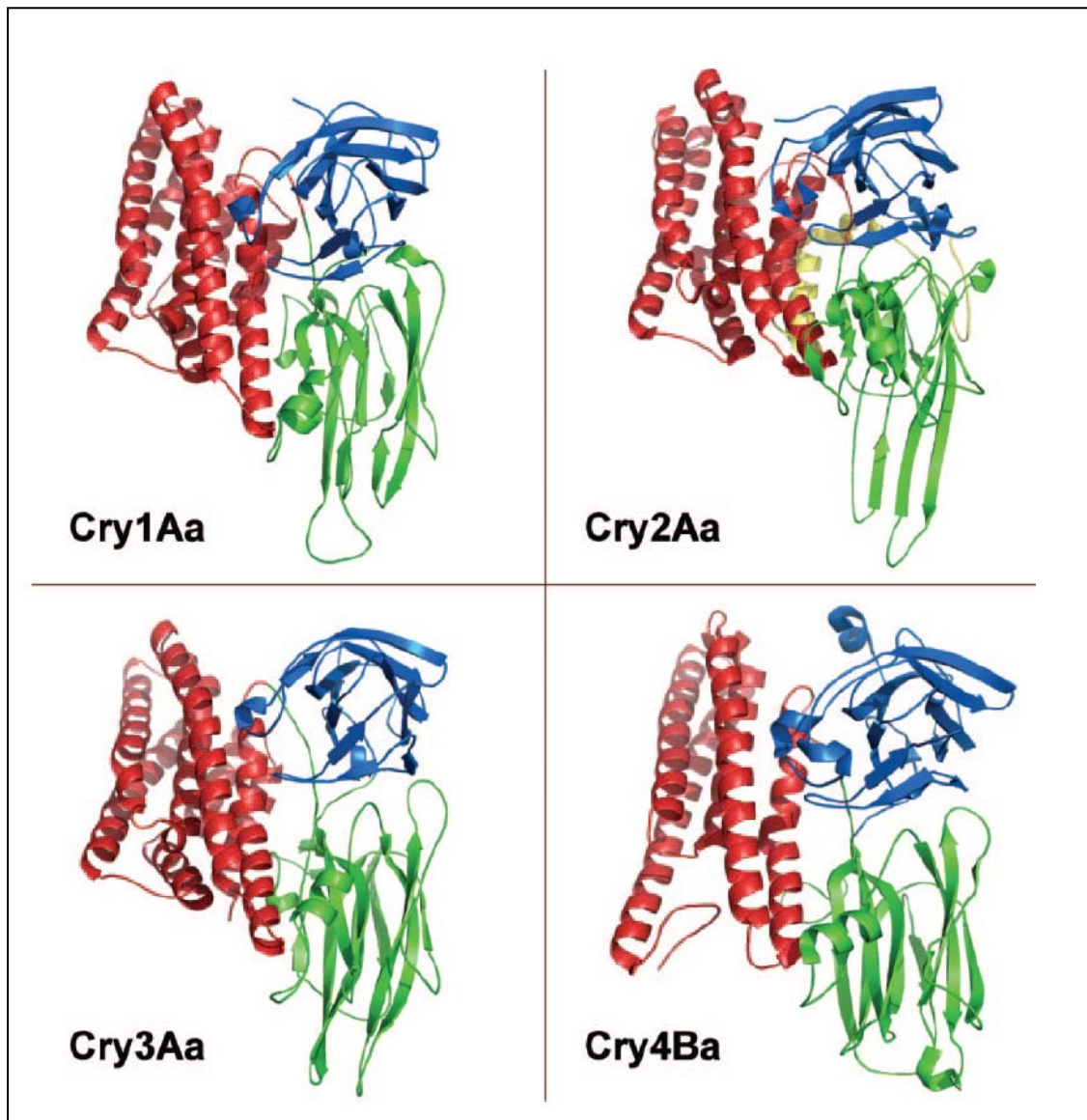
Uma forma de contornar estes problemas é utilizar plantas GM expressando toxinas Cry. Até o momento, as toxinas *Bt* expressas em culturas transgênicas (Cry3A e vários tipos de Cry1) foram selecionadas para controle de lepidópteros e coleópteros, possuindo toxicidade limitada sobre outras ordens de insetos (BERNAL *et al.*, 2002). Desde o final da última década, algodão, soja, milho, batata, arroz e outras importantes culturas estão sendo geneticamente modificadas para aumentar a resistência contra herbivoria de insetos (BELL *et al.*, 1999).

### **1.2.1 Toxinas Cry**

As toxinas Cry, assim como as estirpes de *Bt* que as produzem, apresentam um espectro muito restrito de toxicidade, afetando poucas espécies dentro de uma Ordem. Até o momento, já foram descritas toxinas ativas contra insetos das Ordens Diptera, Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera (GOMEZ *et al.*, 2007), além de nematóides (WEI *et al.*, 2003). A viabilidade de sua utilização para fins agronômicos e em saúde pública teve como resultado um grande número de estirpes isoladas e caracterizadas, sendo que mais de 140 seqüências de toxinas Cry, classificadas conforme as seqüências de aminoácidos, estão depositadas no sítio [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

A maior parte das toxinas possui cinco blocos de aminoácidos conservados na sua estrutura primária (MAAGD *et al.*, 2001), sugerindo sua importância na estabilidade e função da proteína. De forma geral, as toxinas Cry podem ter apenas um dos dois tamanhos: entre 130 e 140kDa, ou cerca de 70kDa, sendo que os blocos conservados estão presentes na metade N-terminal das toxinas maiores, enquanto a parte C-terminal constitui um domínio de protoxina não presente nas toxinas menores (PIGGOT & ELLAR, 2007).

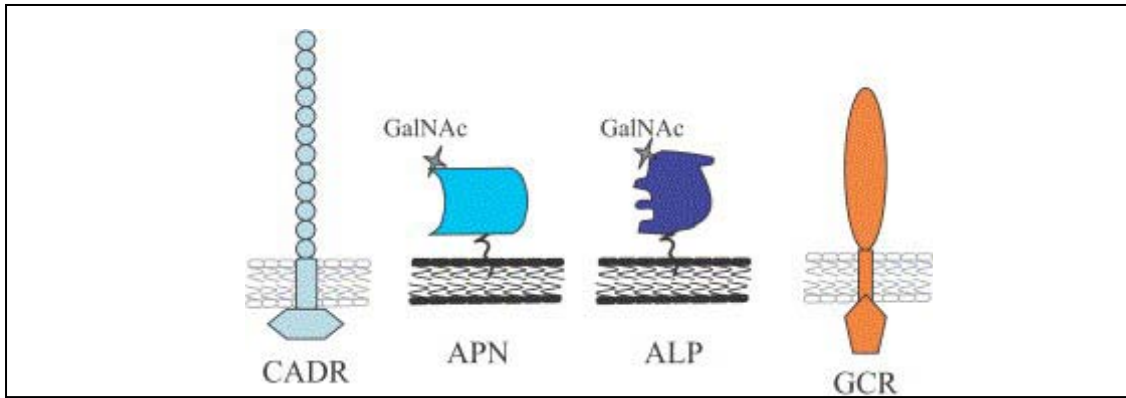
A estrutura tridimensional de oito toxinas Cry foi resolvida por cristalografia e difração de raios-X: Cry1Aa (GROCHULSKI *et al.*, 1995), Cry1Ac (LI *et al.*, 2001), Cry2Aa (MORSE *et al.*, 2001), Cry3Aa (LI *et al.*, 1991), Cry3Ba (GALITSKY *et al.*, 2001), Cry4Aa (BOONSERM *et al.*, 2006), Cry4Ba (BOONSERM *et al.*, 2005) e Cry8Ea1 (GUO *et al.*, 2008). Apesar das diferenças entre as seqüências de aminoácidos, todas elas apresentam uma estrutura comum, formada de três domínios (Figura 3). O domínio I é constituído por seis  $\alpha$ -hélices anfipáticas ( $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4,  $\alpha$ -6 e  $\alpha$ -7) circundando uma hélice central ( $\alpha$ -5). O domínio II possui três folhas  $\beta$ -antiparalelas formando um  $\beta$ -prisma. O domínio III é formado por duas folhas  $\beta$  antiparalelas, forma um  $\beta$ -sanduíche e possui similaridade a moléculas capazes de ligação a carboidratos (PIGGOT & ELLAR, 2007), estando relacionado à estabilidade da toxina. O papel de cada um destes domínios está descrito com mais detalhes no próximo item.



**Figura 3:** Estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa e Cry4Ba, resolvidas por cristalografia e difração de raios-X. Os domínios I, II e III estão representados em vermelho, azul e verde, respectivamente. Em amarelo, o domínio N-terminal da protoxina Cry2Aa. PIGGOT & ELLAR, 2007.

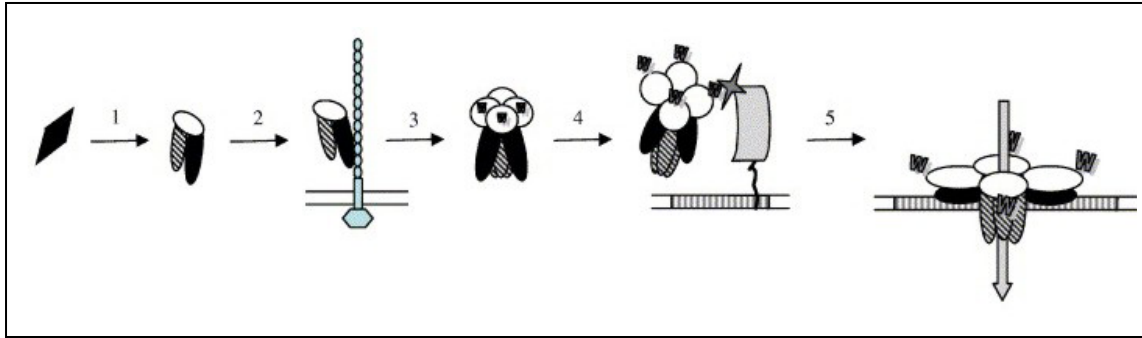
### 1.2.2 Mecanismo de ação das toxinas Cry

O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em diferentes etapas. Em um primeiro momento, ocorre a solubilização dos cristais no intestino dos insetos, devido ao pH alcalino, e, conseqüentemente, a liberação de protoxinas. Essas protoxinas são, então, ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos pela clivagem das porções N-terminal e C-terminal da proteína, liberando um monômero de aproximadamente 60-70 kDa (GROCHULSKI *et al.*, 1995). Em Lepidópteros, as principais enzimas digestivas envolvidas na clivagem das proteínas Cry são as proteases serínicas, como a tripsina e a quimiotripsina (SCHNEPF *et al.*, 1998) e em coleópteros, as proteases cisteínicas e aspárticas (MAAGD *et al.*, 2001). O monômero se liga, então, a receptores específicos presentes na região apical da membrana das células do intestino médio do inseto (BRAVO *et al.*, 2002). No caso das toxinas Cry1A, foram descritos pelo menos cinco diferentes receptores: proteínas tipo caderinas, aminopeptidases, além de uma fosfatase alcalina e duas proteínas não-caracterizadas, P252 e um glicoconjugado de 270kDa (BTR-270) (GARNER *et al.*, 1999; INGLE *et al.*, 2001; HARA *et al.*, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2004; BUDATHA *et al.*, 2007; GOMEZ *et al.*, 2007) (Figura 4). Outros receptores descritos incluem um glicolípido em *Caenorhabditis elegans* Maupas (Nematoda: Rhabditidae) capaz de ligação a Cry5B (GRIFFITTS *et al.*, 2005), e uma ADAM metaloprotease de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) como receptor para Cry3Aa (OCHOA-CAMPUZANO *et al.*, 2007), o único descrito em coleópteros.



**Figura 4:** Moléculas receptoras das proteínas Cry1A. CADR, receptor tipo caderina; APN, Aminopeptidase N; ALP, Fosfatase Alcalina; GCR, receptor glicoconjugado. (BRAVO *et al.*, 2007).

Em *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae), as toxinas Cry1A se ligam a proteínas do tipo caderina (Bt-R1) de 210 kDa e a uma aminopeptidase N (APN) de 120 kDa (VADLAMUDI *et al.*, 1995; LORENCE *et al.*, 1997). Estudos de interação e especificidade das toxinas Cry com estes receptores revelaram diferenças de afinidade de ligação, sugerindo que o primeiro evento de interação da toxina com as microvilosidades da membrana é a ligação do domínio II da toxina ativa à caderina Bt-R1. Esta ligação provoca uma mudança conformacional, facilitando a clivagem de uma  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -1) do domínio I, levando à formação de uma estrutura oligomérica conhecida como pré-poro (BRAVO *et al.*, 2004; RAUSELL *et al.*, 2004). Este oligômero se liga, então, a uma aminopeptidase, ancorada na membrana por meio de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que direciona o complexo para a membrana, causando a inserção e subsequente formação do poro (BRAVO *et al.*, 2004) (Figura 5).



**Figura 5:** Modo de ação das toxinas Cry – modelo da formação de poro: **(1)** Solubilização e ativação da toxina; **(2)** Ligação da toxina Cry monomérica no primeiro receptor (Caderinas ou Glicoconjugado), mudança da conformação e clivagem da  $\alpha$ -hélice 1; **(3)** Formação do oligômero; **(4)** Ligação da toxina oligomérica ao segundo receptor (GPI-Aminopeptidase ou GPI-Fosfolipase). Ocorre uma mudança da conformação e a toxina assume um estágio globular; **(5)** Inserção da toxina na membrana e formação do poro. (BRAVO *et al.*, 2007).

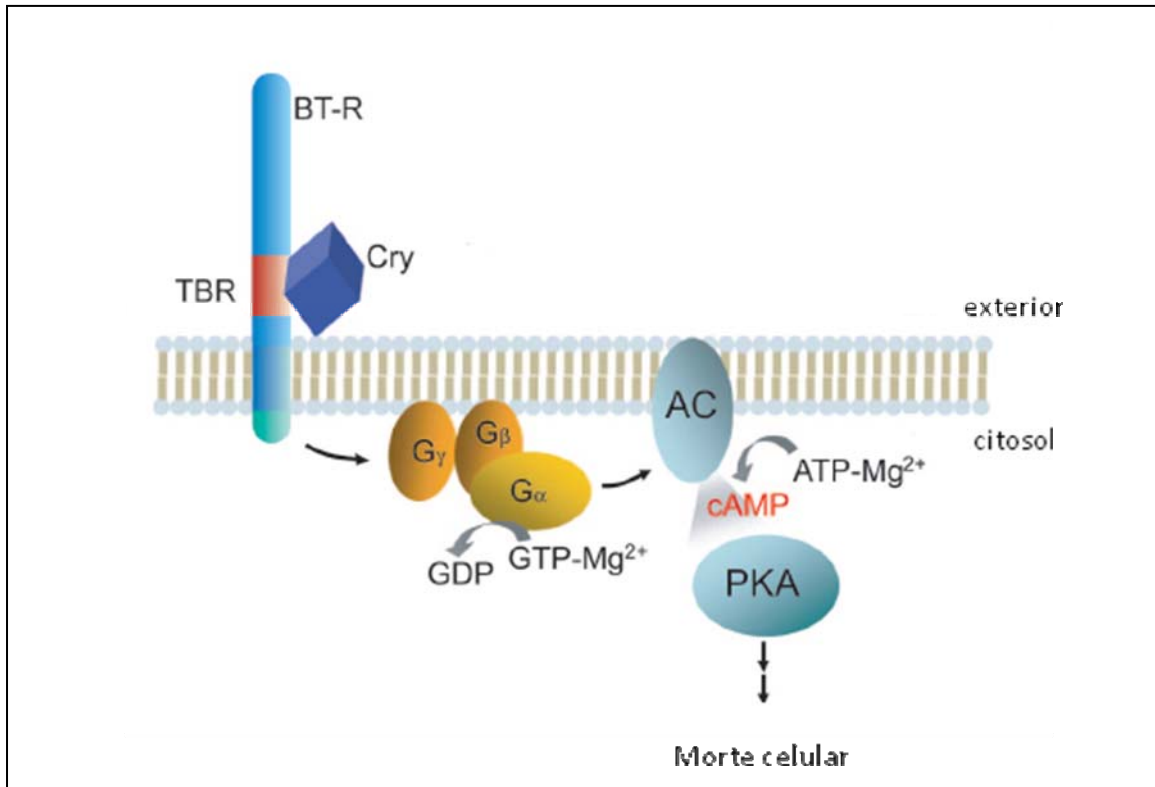
Dois modelos de inserção de toxinas Cry1A na membrana são propostos. O primeiro deles, o modelo ‘canivete’, sugere que duas das hélices do domínio I, afastadas da membrana, girariam do topo do complexo pré-poro e seriam inseridas na membrana (KNOWLES, 1994). No segundo modelo, denominado ‘guarda-chuva’, um par de hélices do domínio I, perto da membrana, seria inserido na membrana, enquanto as demais seriam rearranjadas de forma aberta (GAZIT & SHAI, 1995; GAZIT *et al.*, 1998). Entretanto, atualmente foi demonstrado que todos os domínios das toxinas Cry1A inserem-se na membrana (NAIR & DEAN, 2008).

Experimentos de proteção osmótica demonstraram que, após se unirem ao receptor e se inserirem na membrana, as proteínas Cry formam poros com um diâmetro de 1 a 2 nm. Assim, as células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica (KNOWLES & ELLAR, 1987). O citoplasma adquire então um pH alcalino, interferindo no

metabolismo celular normal e, conseqüentemente, destruindo o epitélio intestinal. Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso à hemolinfa, causando a morte das larvas por inanição e septicemia.

Este modelo de toxicidade proposto foi validado recentemente por SOBERÓN *et al.* (2007). A importância da interação seqüencial foi observada quando a toxicidade de Cry1Ab e Cry1Ac contra *Manduca sexta* foi drasticamente reduzida pelo silenciamento do gene para o receptor do tipo caderina BT-R1. Entretanto, utilizando toxinas modificadas sem a hélice  $\alpha$ -1 do domínio I, as mesmas voltaram a ser ativas. Isto demonstra que (I) a toxina age de modo seqüencial; (II) a ligação a BT-R1, que promove a retirada da hélice  $\alpha$ -1, facilita a oligomerização da toxina e (III) o segundo receptor, APN, tem grande importância na toxicidade.

No entanto, um segundo modelo de ação destas toxinas, proposto por ZHANG *et al.* (2006), sugere a interação entre Cry1Ab monomérica e BT-R1 como suficiente para ativação de um sinal para morte celular via uma cascata  $Mg^{2+}$  - dependente. Neste modelo, a interação toxina-receptor causa um estímulo à proteína G e à adenilil ciclase, causando aumento de AMP cíclico e ativação de proteína kinase A, levando à desestabilização do citoesqueleto e canais iônicos e conseqüente morte celular (Figura 6). Embora controverso, este modelo foi validado com experimentos demonstrando a correlação direta entre a quantidade do primeiro receptor (BT-R1) com a toxicidade (ZHANG *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Modo de ação das toxinas Cry – modelo da transdução de sinal. A toxina Cry interage com a região de ligação (TBR) do receptor (BT-R), estimulando a proteína G e adenilil ciclase, promovendo cAMP intracelular. Assim, a ativação da proteína quinase A (PKA) desestabiliza o citoesqueleto e canais iônicos, levando à morte celular. Adaptado de ZHANG *et al.* (2006).

Enquanto o modo de ação das toxinas Cry1A é amplamente estudado, pouco se sabe comparativamente sobre as outras famílias de toxinas. A validação dos receptores geralmente é feita pela expressão do gene candidato em insetos ou células não suscetíveis (JURAT-FUENTES & ADANG, 2006), ou por silenciamento gênico (SIVAKUMAR *et al.*, 2007). Na maioria dos casos, as caderinas clonadas e expressadas em células de cultura conferem suscetibilidade à família Cry1A. Entretanto, o papel dos outros receptores descritos no mecanismo de ação de outras toxinas Cry continua desconhecido.



### 1.3 Justificativa

A maior ameaça ao uso de toxinas Cry é o desenvolvimento de resistência nos insetos. Os mecanismos mais frequentes de resistência a toxinas Cry são defeitos nas interações toxina-receptores (FERRÉ & VAN RIE, 2002). A caracterização de moléculas de receptores em diferentes insetos-praga é vital para entender o modo de ação destas toxinas. A partir do isolamento e caracterização do gene *cry8Ka1* da cepa *B. thuringiensis*, linhagem S811, que codifica uma toxina com potencial para controle de *A. grandis*, uma biblioteca de genes recombinados foi desenvolvida por meio do uso das técnicas *DNA shuffling* e *Phage display*. Uma seleção permitiu o isolamento de mutantes melhorados, expressando toxinas altamente ativas contra o bicudo do algodoeiro (OLIVEIRA *et al.*, em preparação). Uma das toxinas que apresentou maior porcentagem de mortalidade em bioensaios contra larvas de bicudo, denominada Cry8Ka5, foi utilizada para a identificação e caracterização de prováveis receptores.

A identificação destes receptores contribuirá no desenvolvimento de estratégias para lidar com o problema potencial de resistência e no desenvolvimento de novas toxinas com alta especificidade.

### 1.4 Hipótese

A toxina Cry8Ka5 possui um mecanismo de ação desencadeado por receptores protéicos presentes em membranas celulares no intestino de *A. grandis*.

## **2. OBJETIVO**

Identificar prováveis receptores de *A. grandis* para toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

### **2.1 Estratégias utilizadas**

- Visualização de prováveis receptores utilizando ensaios de ligação de toxinas marcadas a proteínas presentes no intestino de *A. grandis* previamente separadas por eletroforese unidimensional e bidimensional.
- Identificação das proteínas ligantes por espectrometria de massa.
- Bloqueio *in vivo* dos prováveis receptores, visando validar o papel funcional destas proteínas na toxicidade de  $\delta$ -endotoxinas contra *A. grandis*.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Insetos**

Os insetos utilizados neste trabalho foram provenientes de colônias estabelecidas no Laboratório de Insetos da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Os animais são criados em dieta artificial (Agar 2%, Levedo de cerveja 2,72%, proteína de soja 4,48%, gérmen de trigo 2,72%, Pharmamedia 2%, ácido sórbico 0,1%, ácido ascórbico 0,9%, glicose 2,72%, Nipagin® 0,08%, sais minerais 0,05% e solução vitamínica 0,45%), a 28 °C, 70% de umidade relativa (U.R.) e fotoperíodo de 12h. Os ovos de *A. grandis* são espalhados na dieta e ao eclodir, as larvas desenvolvem-se até a emergência. Os adultos são coletados e transferidos para gaiolas destinadas à copulação e oviposição. Os ovos são coletados, esterilizados e espalhados novamente na dieta, conforme MONNERAT *et al.* (2000).

#### **3.2 Produção, ativação e avaliação da toxina Cry1Ac**

A protoxina Cry1Ac (PM≈130 kDa) foi obtida por expressão heteróloga em *Escherichia coli* ECE53, transformada com o plasmídeo recombinante pOS4201, contendo o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD73.

As células foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (NaCl 1%, Extrato de levedura 0,5%, triptona 1%, pH 7,0) contendo ampicilina (1 µg/ml), a 37 °C, 175 rpm. Como indutor de expressão foi utilizado 1 mM de isopropil-1-tiol-β-D-galactopiranosídeo (IPTG), após a D.O.<sub>600</sub>=0,8. Após 72h de indução, as células foram coletadas por centrifugação (20 min, 10 °C, 4500g) e o pellet ressuspendido em tampão de lise (15% sacarose, 2 mg/mL lisozima, 50 mM EDTA, 50mM Tris - HCl, pH 8,0) por 12h a 4 °C. A suspensão foi sonicada em gelo (5x300s, ciclo de 70%) e centrifugada por 15min, 4 °C, 10000g. O pellet foi então lavado por centrifugação (10000g, 30min, 4 °C) três vezes em 30 mL de solução de NaCl 0,5 M contendo Triton X-100 2%, cinco vezes em 30 mL de NaCl 0,5 M e duas vezes em 30 mL de água destilada.

Os corpos de inclusão contendo a protoxina Cry1Ac foram solubilizados em tampão de solubilização (Ditiotreitol 10 mM, carbonato de sódio 50 mM, pH 10,5) por 2h a 37 °C e dializados contra água. A protoxina foi ativada com tripsina 1:50 (m:m) a 37 °C por 18h. A proteólise foi parada com 1 mM Fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e a quantificação de proteínas feita pelo método de BRADFORD (1976). A ativação de Cry1Ac foi monitorada em géis de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) corado com Coomassie Brilliant Blue R250.

A Cry1Ac ativada foi avaliada quanto à toxicidade por bioensaios seletivos contra *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), inseto suscetível a esta toxina. Foram feitos dois tratamentos: (i) controle negativo (água) e (ii) 50 µg da toxina ativada sob dieta artificial cortada em cubos de 1 cm<sup>3</sup>. O bioensaio foi feito com 20 larvas por tratamento, com quatro repetições de cada.

### 3.3 Produção e purificação da toxina Cry8Ka1

O gene que codifica a toxina Cry8Ka1 foi isolado a partir da cepa S811 de *B. thuringiensis* do Banco de Linhagens da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, inserido no vetor bacteriano pET Directional TOPO cloning (Invitrogen) e introduzido por choque térmico em *E. coli* BL21(De) Star (Invitrogen) (MAGALHÃES, 2006). Essa toxina possui atividade moderada contra *A. grandis*, servindo como um modelo para os estudos de interação toxina-receptor.

Para expressão da toxina, células contendo o plasmídeo codificando o gene para Cry8Ka1 foram crescidas a 37 °C, 200 rpm, em meio líquido LB/ampicilina (1µg/ml) até D.O.<sub>600</sub>=0,6-0,8. A indução da expressão foi feita com IPTG 1 mM, por 12h, 37 °C, 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação (20min, 10 °C, 4500g), ressuspensas com tampão de lise (12h, 4 °C) e sonicadas em gelo por três ciclos de um minuto, com intervalos de um minuto. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando 10 mL de resina de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA – QIAGEN), com fluxo de 1 mL/min. A etapa de equilíbrio foi feita com cinco volumes de tampão A (NaCl 0,3 M, imidazol 10 mM, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,5). O sobrenadante obtido a partir do lisado celular foi introduzido na coluna e a fração não-retida lavada com tampão B (NaCl 0,3 M, imidazol 20 mM, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,5). Após a lavagem, a toxina foi eluída com tampão C (NaCl 0,3 M, imidazol 250 mM, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,5). As frações foram coletadas em volumes de 1 mL e a eluição da toxina monitorada espectrofotometricamente em placas de ELISA contendo 10 µL de cada amostra em reagente de Bradford 21,05% por poço.

Após a cromatografia de afinidade, as frações contendo Cry8Ka1 foram concentradas por centrifugação a 2500g por 30min utilizando Centricon® (Millipore) com limite de exclusão de 30 kDa e submetidas à cromatografia de exclusão molecular. Para tal, foi utilizada uma coluna de 100 cm x 2 cm contendo 280 mL de resina Sephacryl™ S-200 (GE Healthcare). A resina foi equilibrada com NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,0 e cada purificação foi feita a partir de 5 mL da toxina a 2 mg/mL, com fluxo constante de 1 mL/min. As frações foram coletadas em alíquotas de 3 mL e o material eluído monitorado em um fotômetro a 280 nm. O intervalo de eluição da toxina pura foi detectado com 15 µL de cada alíquota em SDS-PAGE 10% corado com nitrato de prata.

### **3.4 Produção e purificação da toxina Cry8Ka5**

A toxina Cry8Ka5 é uma variante da toxina Cry8Ka1 de *B. thuringiensis* linhagem S811, obtida a partir de mutações pela técnica de DNA Shuffling. Este mutante apresenta toxicidade superior à selvagem contra larvas de *A. grandis* (OLIVEIRA *et al.*, em preparação), sendo por isto selecionada para este trabalho.

A produção de Cry8Ka5 foi feita por expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o gene mutante inserido em plasmídeo pET101/D TOPO (Invitrogen). As células foram crescidas em placas de Petri contendo meio LB/ampicilina por 12h, 37 °C. Uma colônia foi transferida para Erlenmeyer contendo meio LB líquido/ampicilina 1 µg/mL e crescida a 37 °C, 200 rpm, até D.O.<sub>600</sub>=0,8. A expressão da toxina foi então induzida com IPTG 0,5 mM por seis horas.

A coleta e lise das células, bem como purificação por cromatografia de afinidade utilizando resina Ni-NTA (QIAGEN) foram feitas da mesma forma descrita acima para Cry8Ka1 selvagem. As frações de Cry8Ka5 coletadas após a cromatografia de afinidade foram concentradas por centrifugação a 2500g por 30min utilizando Centricon® (Millipore) com limite de exclusão de 30 kDa e submetidas à cromatografia de exclusão molecular. A coluna, resina, tampão e monitoramento da eluição foram feitos da mesma forma utilizada para purificação de Cry8Ka1.

### **3.5 Marcação das toxinas com biotina**

As toxinas Cry1Ac, Cry8Ka1 e Cry8Ka5 foram marcadas com biotina utilizando o EZ-Link® Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Pierce). A biotina é ligada à *N*-Hidroxisuccinamida (NHS), que reage com grupos amino primários das proteínas. Assim, as proteínas marcadas com biotina via NHS podem ser detectadas com sondas de estreptavidina ou avidina. A biotina foi adicionada em soluções de toxina na proporção 20:1 (M:M) e incubadas em temperatura-ambiente por 1h. O excesso de biotina foi retirado utilizando uma coluna para dessalinização (Zeba™ Desalt Spin Column, Pierce).

### **3.6 Extração de proteínas do intestino de larvas de *A. grandis***

As proteínas periféricas do epitélio intestinal “Brush Border Membranes Vesicles” (BBMV) do bicudo do algodoeiro foram extraídas por precipitação diferencial com cloreto de magnésio, segundo WOLFERSBERGER *et al.* (1987). Larvas de 3º instar foram anestesiadas em gelo e as cabeças retiradas com a ajuda de uma pinça. Os intestinos foram limpos em solução de NaCl 0,9%, congelados em nitrogênio líquido e macerados em dez volumes (m:v) de tampão MET (manitol 250 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,5). Após três minutos em gelo, foram adicionados mais dez volumes de uma solução de MgCl<sub>2</sub> 24 mM. A suspensão foi centrifugada a 2500g por 15min e o sobrenadante submetido à ultracentrifugação a 30000g por 30min, 4 °C. O pellet resultante, contendo proteínas periféricas do epitélio intestinal de *A. grandis*, foi ressuspendido em HEPES 10 mM (pH 7,4) e armazenado a -80 °C.

### **3.7 Ligação das toxinas a proteínas do intestino de *A. grandis* em condições desnaturantes**

A identificação de prováveis receptores de *A. grandis* para toxinas Cry em condições desnaturantes foi feita utilizando métodos de ligação toxina-ligante após SDS–PAGE e eletroforese bidimensional.

Para os experimentos em SDS-PAGE, 15 µg de BBMV de *A. grandis* foram submetidos à eletroforese e transferidos para membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF). As transferências foram feitas em sistema úmido a 100 V por



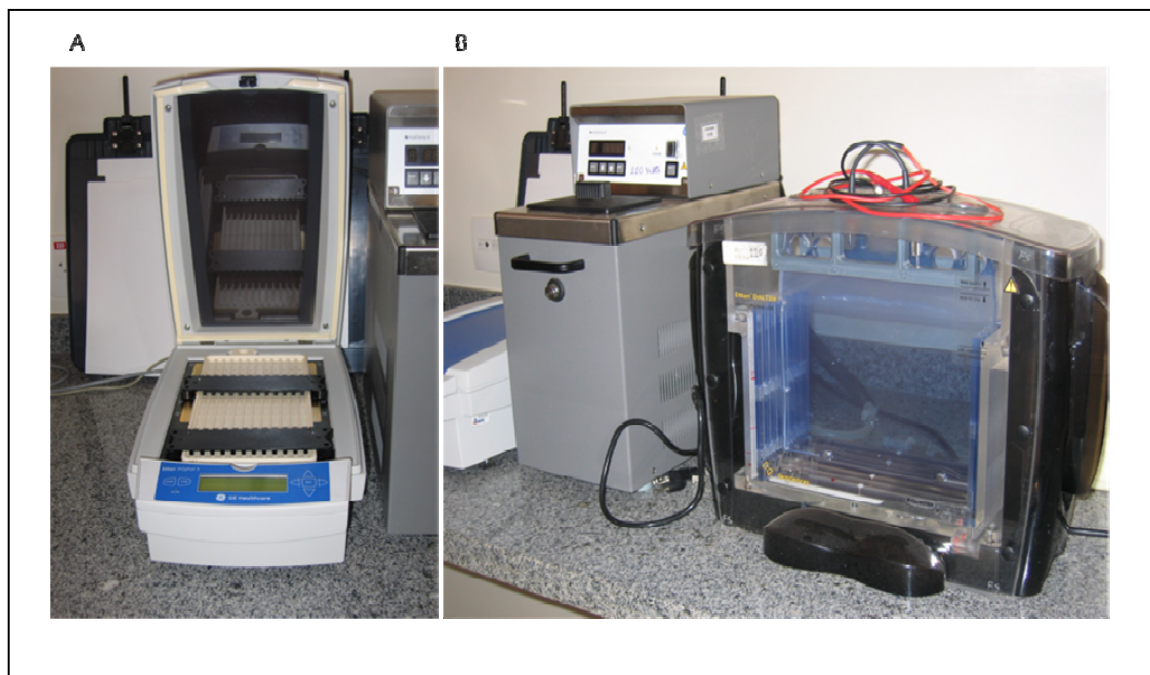
1h, 4 °C em tampão de transferência (metanol 20%, glicina 192 mM, Tris-HCl 24 mM, pH 8,8). As membranas foram coradas com *rouge-ponceau* para confirmar transferência e bloqueadas em tampão de bloqueio (PBS, glicerol 5%, leite em pó desnatado 5%, Tween20 0,05%) por 1h à temperatura-ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 12h, 4 °C em uma das quatro soluções: (i) tampão de bloqueio (controle negativo), (ii) tampão de bloqueio contendo 100 ng/mL Cry1Ac biotinizada, (iii) tampão de bloqueio contendo 100 ng/mL Cry8Ka5 biotinizada ou (iv) tampão de bloqueio contendo 100 ng/mL Cry8Ka1 selvagem biotinizada. As membranas foram lavadas em PBS e incubadas com estreptavidina/peroxidase (1:1500) por 2h, a 37 °C. Após lavagem, as membranas foram reveladas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo do cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) 0,1%, imidazol 0,1% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05%.

A eletroforese bidimensional das BBMV de *A. grandis* foi feita utilizando strips Immobiline DryStrip 18 cm, pH 3-10. Para cada strip, 700 µg de material foram precipitados com ácido tricloacético (TCA) na concentração final de 10%. A solução foi incubada em gelo por 1h e centrifugada a 10000g por 10min. O sobrenadante foi descartado e a fração insolúvel lavada três vezes com acetona. Após secar sob temperatura ambiente, os *pellets* foram ressolubilizados em 350 µL de solução de re-hidratação (Uréia 8 M, tiouréia 2 M, CHAPS 20 mg/mL, DTT 10 mg/mL, IPG Buffer 3-10 5 µL/mL, azul de bromofenol 0,05%). O material resultante, contendo as proteínas do intestino médio de *A. grandis*, foi utilizado para a etapa de re-hidratação das strips, por 12h, sob temperatura ambiente. A focalização isoeétrica foi feita conforme a Tabela 1 no aparelho Ettan IPGphor 3.

**Tabela 1:** Condições eletroforéticas utilizadas para focalização isoeétrica de BBMs de *A. grandis* em strips Immobiline DryStrip 18 cm. V=voltagem; Vh=Volts/hora

Passo	V	tempo	Vh
Constante	500	1h	500
Gradiente	1000	1h	800
Gradiente	10000	3h	16500
Constante	10000	35min	6200
Constante	300	1h	300

Após a focalização isoeétrica, as strips foram equilibradas por 15min em tampão de equilíbrio (Uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 75 mM, pH 8,8) contendo 10 mg/mL DTT e 15min em tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL iodoacetamida. As strips foram lavadas com tampão de corrida e a segunda dimensão feita em SDS-PAGE 10% no sistema Ettan DALT (Figura 7), com uma pré-corrída a 2 W/gel por 45min e então 17 W/gel por 4h, a 15 °C. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e analisados com o programa ImageMaster 2D Platinum (GE).



**Figura 7:** Equipamentos utilizados para eletroforese bidimensional de proteínas do intestino de *A. grandis*. **A)** Ettan IPGphor 3, utilizado para focalização isoelétrica. **B)** sistema Ettan DALT, utilizado para a segunda dimensão (SDS-PAGE).

A transferência dos géis foi feita em sistema semi-seco, a 25 V por 2h para membranas de PVDF. O bloqueio, incubação com toxinas e revelação foram feitos da mesma forma descrita acima para a eletroforese unidimensional. Os géis não submetidos à transferência foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

### 3.8 Identificação das proteínas ligantes por espectrometria de massa

As bandas (SDS-PAGE) ou spots (2DE) correspondentes às proteínas capazes de ligação às toxinas Cry foram retiradas manualmente dos géis e descoradas em solução de acetonitrila 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. Os fragmentos dos géis foram desidratados com acetonitrila 100% e secados a vácuo. As

proteínas foram reduzidas com DTT 10 mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM por 30min, 56 °C. A alquilação foi feita em iodoacetamida 55 mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM por 20min, sob temperatura ambiente no escuro. Os géis foram novamente secados em acetonitrila 100% e reidratados com solução de tripsina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 12h, a 37 °C. Após a incubação, a solução foi recolhida e os peptídeos extraídos dos géis com solução de acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 5% (TFA) /  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. A solução foi secada a vácuo para um volume de cerca de 10  $\mu\text{L}$  e dessalinizada utilizando ZipTips® C18(Millipore).

Todas as amostras foram submetidas à técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) via MALDI-TOF para averiguar a qualidade da digestão. Os dados obtidos por esta técnica foram avaliados utilizando o programa MASCOT ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)) contra as bases de dados MSDB, Swissprot e NCBIInr.

Os produtos de digestão de géis unidimensionais foram analisados em um Q-TOF <sup>Micro</sup> da Waters (voltagem capilar= 3500 V; voltagem do cone= 30 V) com fonte de ionização eletrospray, calibrado na região de massa/carga ( $m/z$ ) de 50 a 2000 Da utilizando ácido fosfórico. A separação dos peptídeos por cromatografia líquida foi feita no aparelho Nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) equipado com as colunas Symmetry C18 e BEH 130-C18 (Waters), em gradiente linear 0 – 90% acetonitrila em ácido fórmico 0,1%. Os dados espectrométricos foram coletados para peptídeos com  $m/z$  entre 400-2000 Da (tempo de escaneamento=1s; intervalo entre escaneamentos=0,1s). Os espectros MS/MS foram interpretados automaticamente utilizando o programa MassLynx 4.0 (Waters).

Os peptídeos provenientes dos spots dos géis bidimensionais foram analisados via MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) operando com laser na frequência de 50 Hz no modo refletor. Os parâmetros de voltagem para MS foram ajustados como IS1 19 kV, IS2 16,8 kV, lentes 8 kV, Refletor 20 kV, Refletor2 9,54 kV. A calibração externa foi feita com uma mistura de peptídeos contendo ACTH (1-24), ACTH (28-39), Somatostatina, Angiotensina I e Angiotensina II (Sigma), com aquisição de massa entre 300 e 3200 Da. As análises MS/MS foram feitas no modo refletor LIFT. Os parâmetros de voltagem foram IS1 6 kV, IS2 5,3 kV, lentes 3,15 kV, Refletor 23,5 kV, Refletor2 9,7 kV, LIFT1 19 kV e LIFT2 4 kV, com aquisição de massa entre 40 e 2400 Da. As listas de picos foram geradas utilizando o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Em todas as análises espectrais foi considerada oxidação parcial ou total de metionina e carbamidometilação de cisteínas.

As seqüências derivadas dos peptídeos foram analisadas com o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), utilizando o algoritmo BLASTp na base de dados de seqüências de proteínas não-redundantes (NCBI nr), disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. As seqüências também foram alinhadas pelo “CLUSTALW” (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) (THOMPSON *et al.*, 1994).

### 3.9 Bioensaios com *A. grandis*

Os bioensaios seletivos foram realizados segundo DIAS *et al.* (2000), incorporando-se as toxinas em 5 mL de dieta artificial (a ~50°C), vertida em placas de células de 6 poços NUNC™.

Após solidificação da dieta, foram feitos 12 orifícios de aproximadamente 0,6 mm<sup>2</sup>, onde as larvas neonatas (uma por orifício) foram inseridas e mantidas a 27 °C (±1), 80 % de UR, 14h de fotoperíodo, sendo realizada a leitura do ensaio no quarto dia. Foram feitos quatro tratamentos: (i) controle negativo (água); (ii) Cry1Ac (160 µg); (iii) Cry8Ka5 (160 µg); e (iv) Cry1Ac (160 µg) e Cry8Ka5 (160 µg).

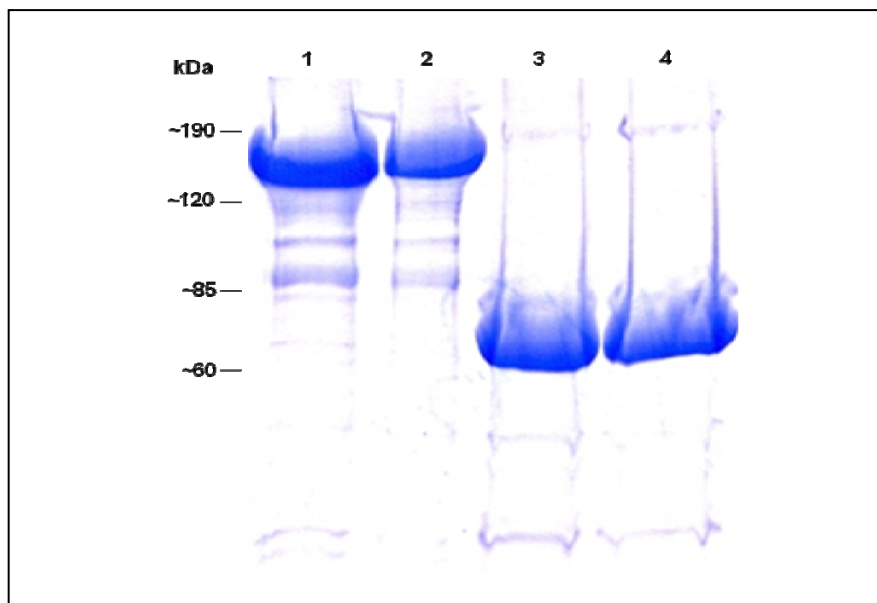
Os tratamentos foram repetidos seis vezes, com doze larvas por repetição. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa SigmaStat, versão 3.1.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção das toxinas

#### 4.1.1 Produção, ativação e avaliação da toxina Cry1Ac

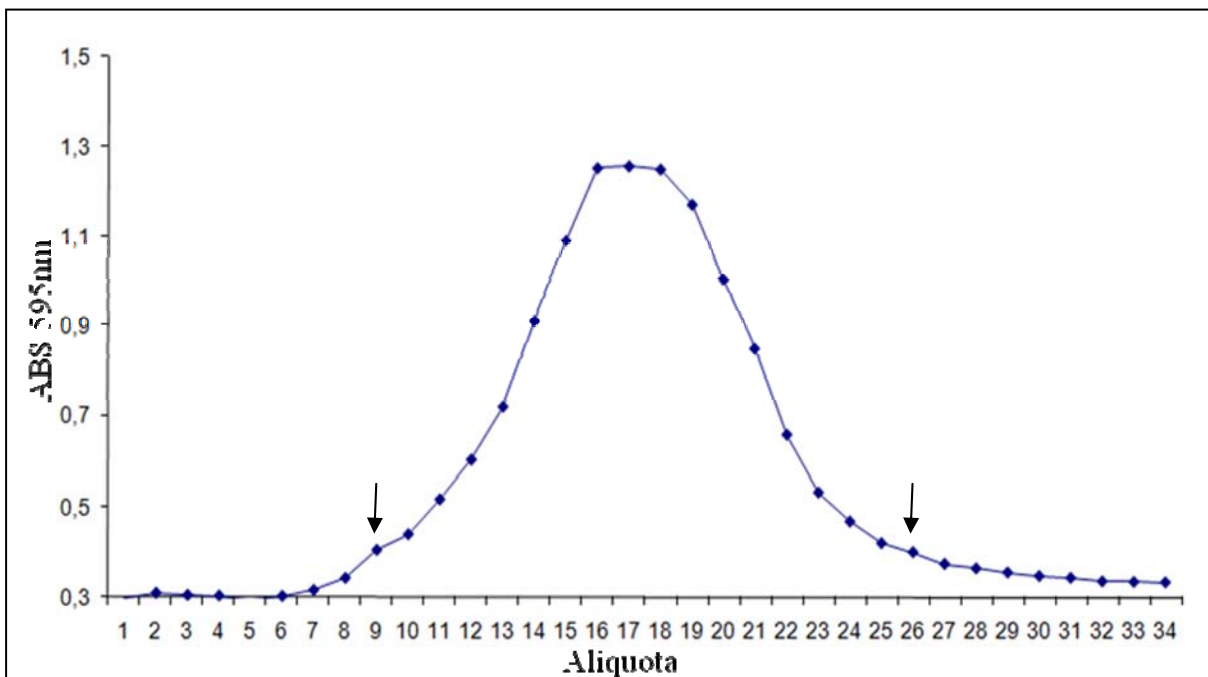
A protoxina Cry1Ac foi expressa em sistema heterólogo *E. coli* e ativada com tripsina. O fragmento tóxico resultante, de cerca de 65 kDa (Figura 8), se mostrou ativo contra larvas de *A. gemmatalis*, com índice de mortalidade de  $93.0 \pm 6.7\%$  no tratamento com 50  $\mu\text{g}$  de toxina, comparado com  $8.0 \pm 4.5\%$  de mortalidade no controle ( $|t_{calc}| = 18.22$ ;  $P < 0.0001$ ). Com a atividade confirmada, a toxina ativa poderia ser utilizada nos ensaios de ligação e nos bioensaios sem depender de enzimas proteolíticas do bicudo do algodoeiro.



**Figura 8:** SDS – PAGE 10% da expressão e ativação da toxina Cry1Ac com tripsina. A toxina foi expressa em *E. coli* na forma inativa de 130 kDa. Os corpos de inclusão foram solubilizados em pH alcalino e a toxina foi ativada com tripsina bovina. **1)** 100  $\mu\text{g}$  da toxina inativa; **2)** 50  $\mu\text{g}$  da toxina inativa; **3)** 100  $\mu\text{g}$  da toxina ativada e **4)** 50  $\mu\text{g}$  da toxina ativada. Marcador BenchMark™ 10748-010.

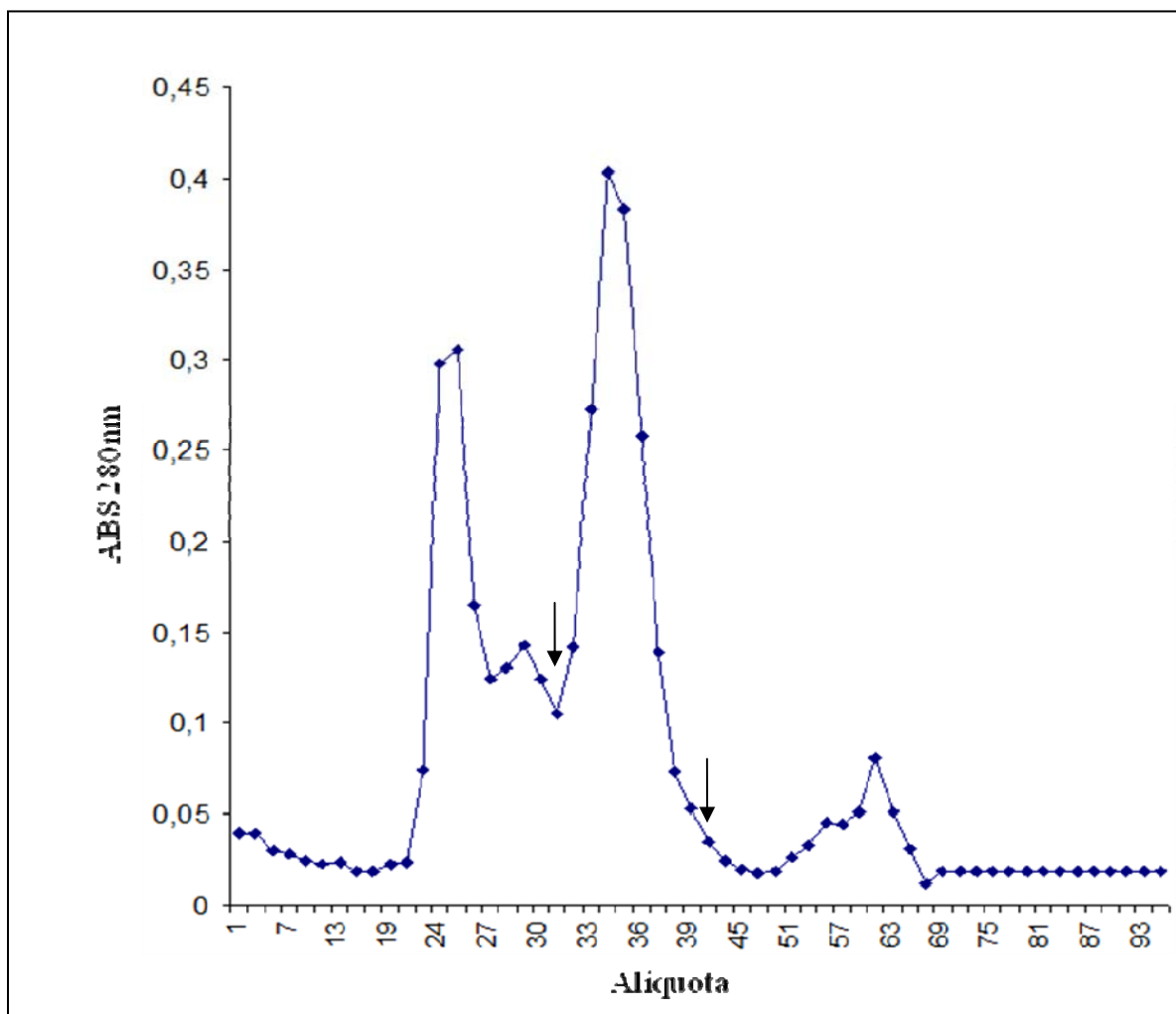
#### 4.1.2 Produção e purificação de Cry8Ka1

A toxina recombinante Cry8Ka1, obtida por expressão heteróloga em *E. coli*, foi purificada com duas etapas cromatográficas. Na primeira delas, utilizando cromatografia de afinidade, a toxina eluiu nas frações 9 a 26 (Figura 9) com poucos contaminantes. Estas frações foram misturadas e concentradas por centrifugação utilizando Centricon® para um volume final de 5 mL. Os contaminantes foram então removidos por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-200, que apresentou dois picos majoritários (Figura 10). O intervalo de eluição da toxina pura, nas frações 20 a 29, foi detectado em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata (Figura 11).

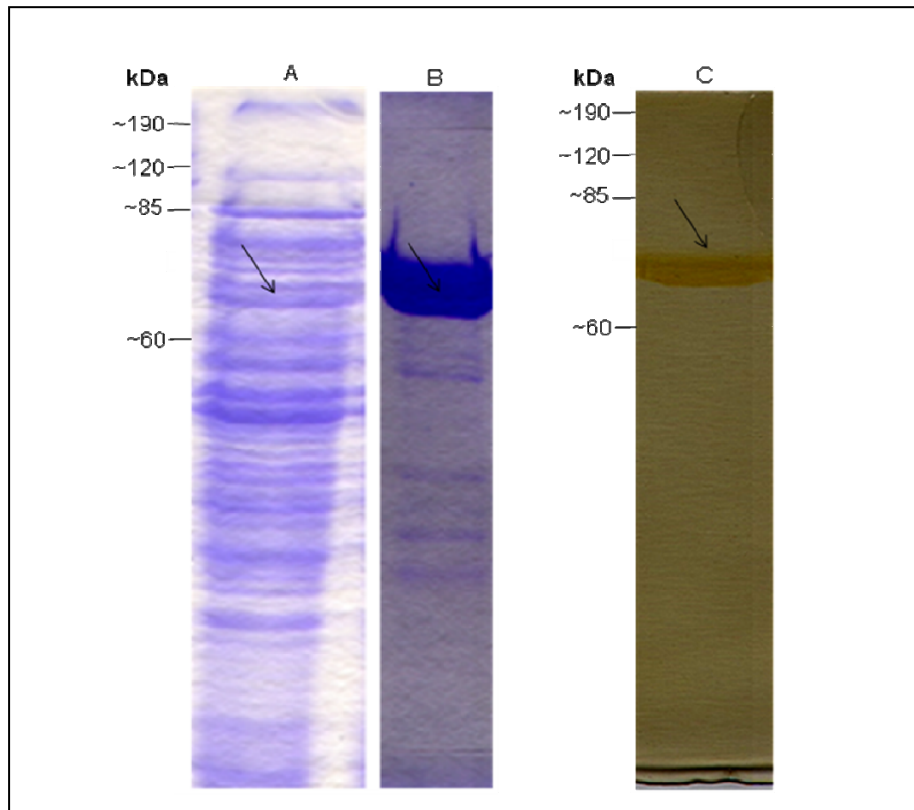


**Figura 9:** Primeira etapa para purificação da toxina Cry8Ka1, utilizando cromatografia de afinidade Ni-NTA. A toxina foi expressa em *E. coli*, as células foram lisadas e o extrato contendo Cry8Ka1 utilizado nesta cromatografia. As setas indicam o intervalo em que a toxina é eluída com imidazol 250 mM.





**Figura 10:** Segunda etapa de purificação de Cry8Ka1, utilizando cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200) em tampão  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. Após a cromatografia de afinidade com resina Ni-NTA, a toxina foi concentrada e aplicada na coluna de exclusão molecular. As setas indicam o intervalo de eluição da toxina.

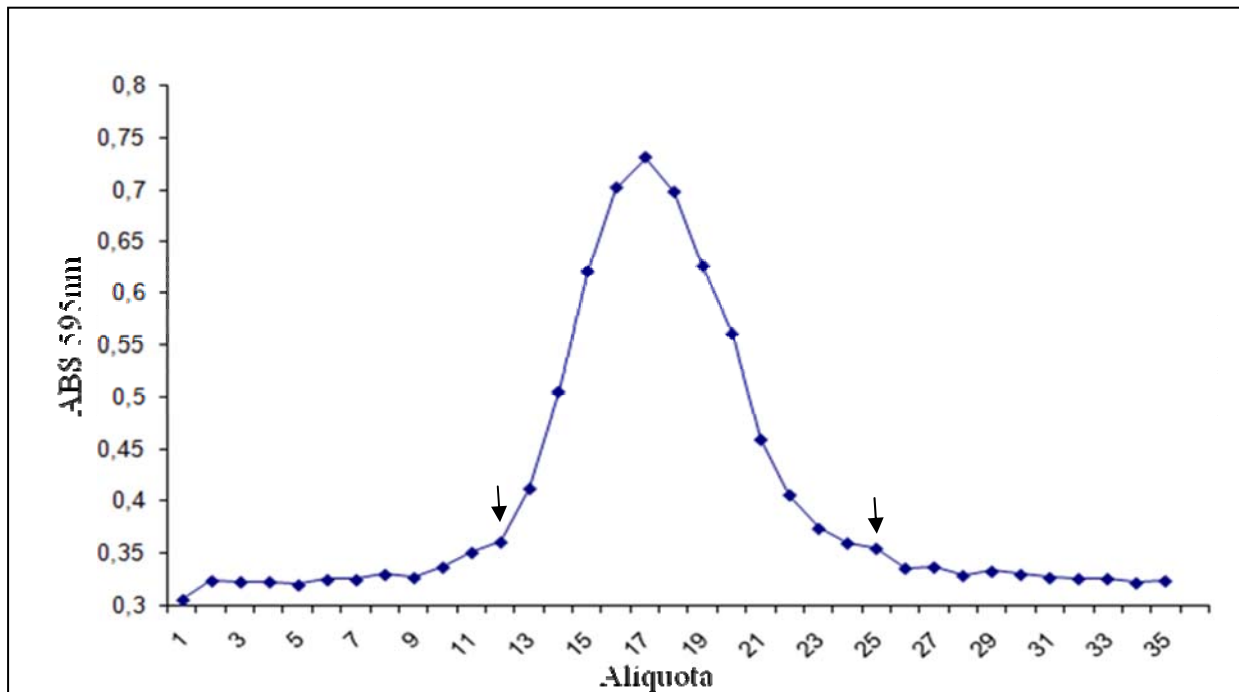


**Figura 11:** Análise da purificação de Cry8Ka1 por SDS-PAGE 10%. A toxina passou por duas etapas cromatográficas. **A)** o material inicial; **B)** toxina Cry8Ka1 após purificação em cromatografia de afinidade Ni-NTA e **C)** toxina Cry8Ka1 após passar pelo segundo passo cromatográfico (Exclusão molecular em Sephacryl S-200). A e B foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250, e C foi corado com prata, demonstrando a pureza da toxina. As setas indicam a posição da banda correspondente à toxina.

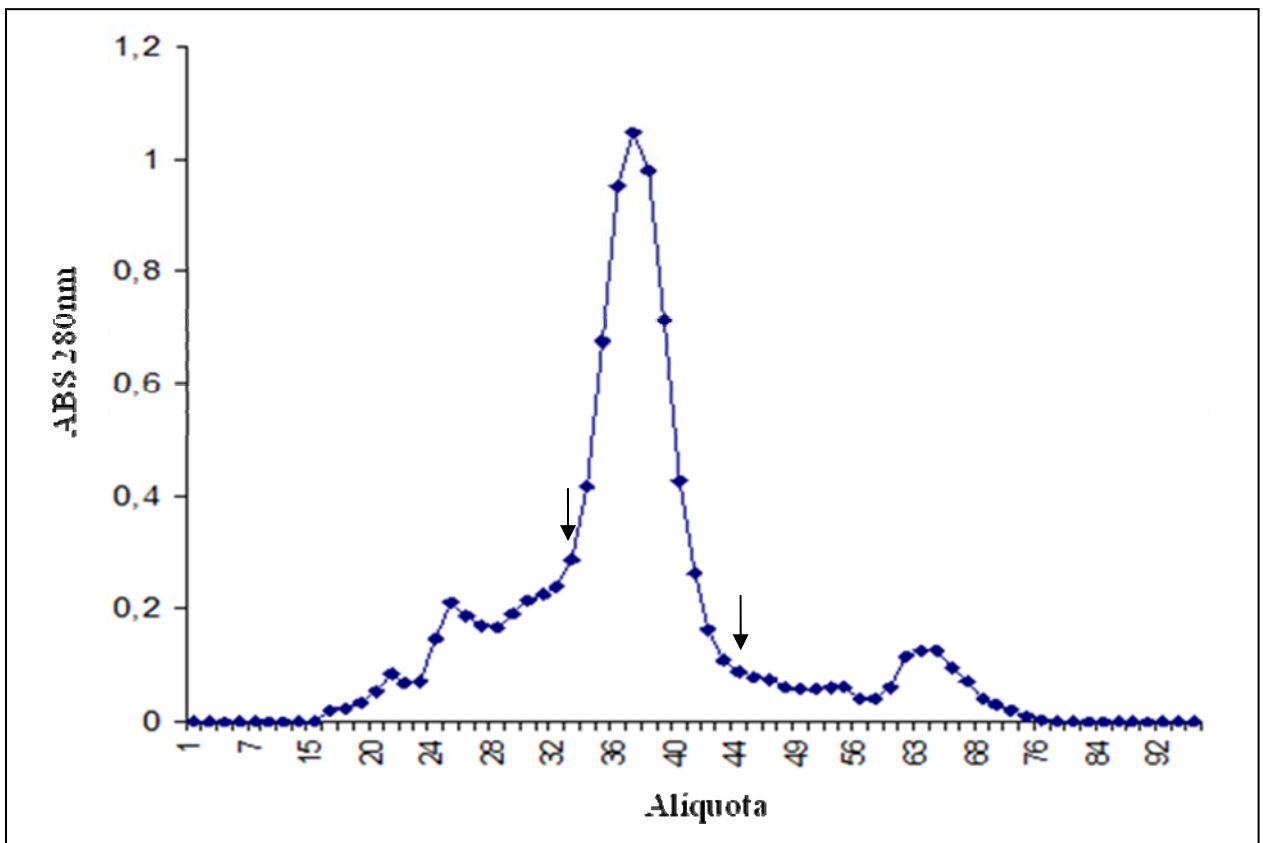
#### 4.1.3 Produção e purificação de Cry8Ka5

A toxina Cry8Ka5 foi purificada seguindo as mesmas etapas cromatográficas de Cry8Ka1. Após a lise das células contendo Cry8Ka5, o material foi submetido à cromatografia de afinidade e a toxina eluiu nas frações de 12 a 25 (Figura 12), que foram agrupadas e concentradas como para a toxina Cry8Ka1. Posteriormente, os contaminantes foram removidos por cromatografia

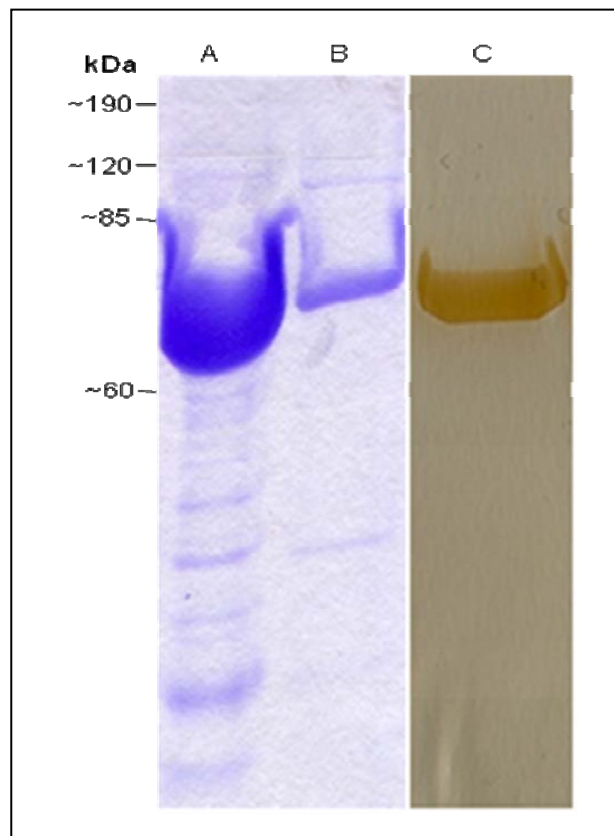
de exclusão molecular utilizando a resina Sephacryl S-200. A toxina eluiu nas frações 26 a 37 (Figura 13), com alto grau de pureza, como visualizado em SDS-PAGE 10% corado com nitrato de prata (Figura 14).



**Figura 12:** Purificação de Cry8Ka5, utilizando cromatografia de afinidade Ni-NTA. A toxina recombinante foi expressa em *E. coli*, as células foram lisadas e o extrato contendo Cry8Ka5 utilizado nesta cromatografia. As setas indicam o intervalo em que a toxina é eluída com imidazol 250 mM.



**Figura 13:** Etapa de polimento da toxina Cry8Ka5, utilizando cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200). Após a cromatografia de afinidade com Ni-NTA, a toxina foi concentrada e aplicada na coluna de exclusão molecular S-200 em tampão  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mM, pH 8,0. As setas indicam o intervalo de eluição da toxina.

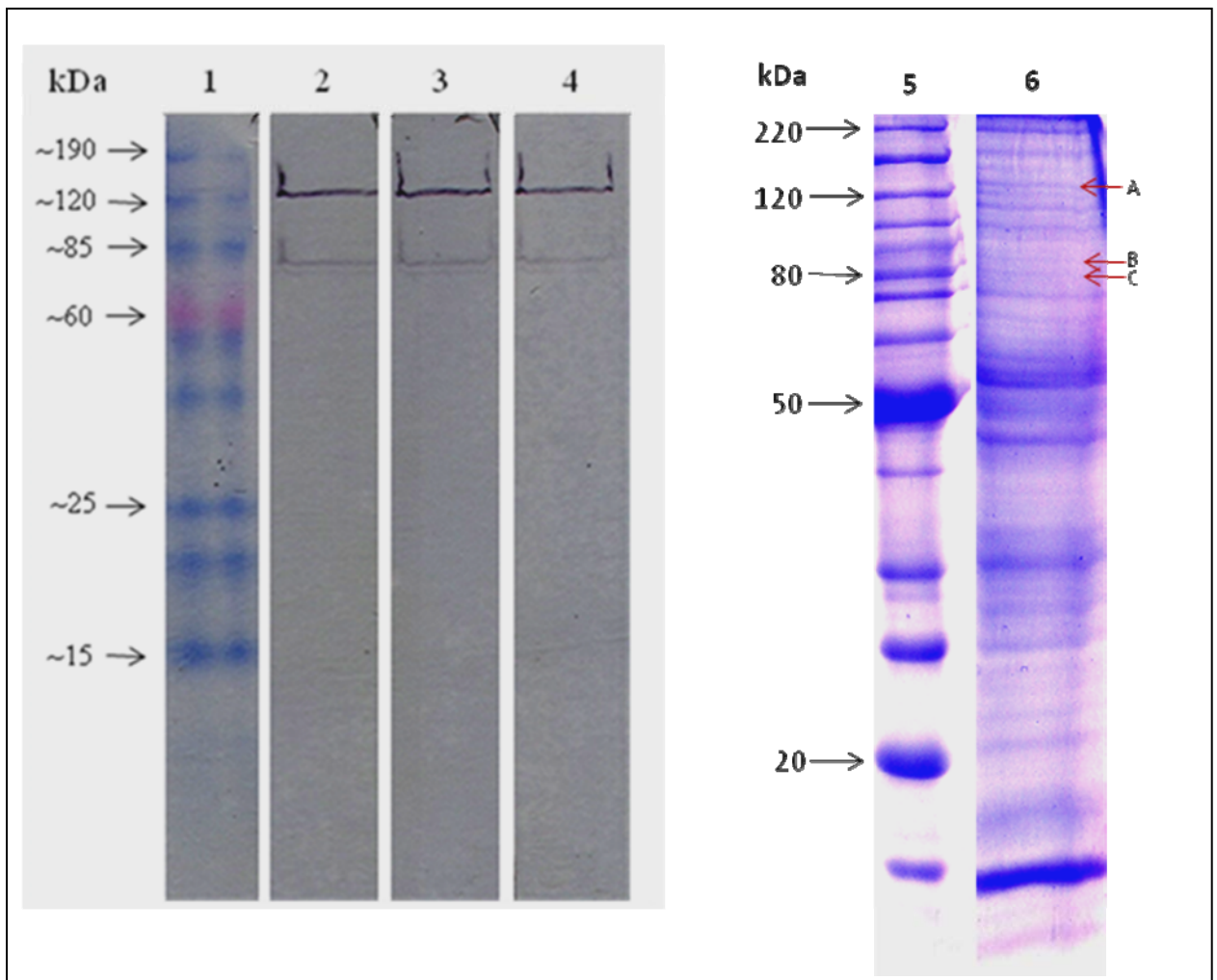


**Figura 14:** Análise da purificação da toxina Cry8Ka5 em SDS-PAGE 10%. **A)** Lisado celular demonstrando material superexpresso em *E. coli*. **B)** toxina após cromatografia de afinidade Ni-NTA, resultando em uma considerável redução de contaminantes. **C)** Toxina purificada, após cromatografia de exclusão molecular S-200. A e B foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250, e C foi corado com prata.

## 4.2 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry

### 4.2.1 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry utilizando géis unidimensionais.

Duas técnicas diferentes foram empregadas para identificar as proteínas presentes no intestino de *A. grandis* capazes de ligação às toxinas Cry. Na primeira técnica utilizada, empregando SDS-PAGE, as proteínas do intestino do bicudo do algodoeiro foram separadas e transferidas para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas e incubadas com uma das três toxinas marcadas com biotina: Cry1Ac, Cry8Ka1 ou Cry8Ka5. As três toxinas foram capazes de ligação às mesmas três bandas nos géis (Figura 15), denominadas A (~120 kDa), B (~80 kDa) e C (~80 kDa). As bandas foram excisadas dos géis e digeridas com tripsina para análise via seqüenciamento *de novo* utilizando ESI-Q-TOF. Das três bandas, apenas uma não foi identificada (banda A). As bandas B e C foram identificadas como uma *Heat-Shock Protein* (HSP) e ATPase vacuolar (V-ATPase), respectivamente (Tabela 2 e Figura 16). Estes resultados indicam que o mutante de Cry8Ka1, Cry8Ka5, reconhece os mesmos receptores da toxina selvagem, e que Cry1Ac, embora não tóxica, é capaz de interagir com as mesmas moléculas.



**Figura 15:** Ensaio de ligação das toxinas Cry1Ac, Cry8Ka1 e Cry8Ka5 às BBMV de *A. grandis*. As BBMV foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de PVDF, bloqueadas e incubadas com uma das três toxinas, previamente marcadas com biotina. **1)** Marcador BenchMark™ 10748-010; **2)** BBMV de *A. grandis* incubada com Cry1Ac; **3)** BBMV de *A. grandis* incubada com Cry8Ka1; **4)** BBMV de *A. grandis* incubada com Cry8Ka5; **5)** Marcador BenchMark™ 10747-012 e **6)** BBMV de *A. grandis* corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. As setas em vermelho indicam as potenciais bandas protéicas capazes de ligação às toxinas (bandas A, B e C).

**Tabela 2:** Proteínas identificadas por espectrometria de massa. As bandas correspondentes às proteínas capazes de ligação às toxinas Cry foram cortadas de géis de poliacrilamida corados com Coomassie Blue R-250 e digeridas com tripsina. Os peptídeos foram analisados por seqüenciamento *de novo* utilizando espectros provenientes de um aparelho ESI-Q-TOF (Waters). As seqüências foram alinhadas contra o banco de dados NCBI nr utilizando o algoritmo BLASTp.

Banda	peptídeo	Mr (esperado)	Mr(calculado)	Delta	Identificação	código de acesso	organismo	E-value
A	ADPDGGVFYVCNPNPSGTITARK	2549,1338	2549,1969	-0,0631	-	-	-	-
	IPSGGSSGDSGNDTPK	1474,6909	1474,6536	0,0373	-	-	-	-
	DKEEGNGK GK	1060,534	1060,5149	0,0192	-	-	-	-
B	R.NTVIPTKK.S	899,5364	899,544	-0,0076	heat shock cognate 70	ABF18258	<i>Aedes aegypti</i>	4,00E-05
	K.IVITNDQNR.L	1071,5444	1071,5673	-0,0228	heat shock cognate 70	ACD63049.	<i>Loxostege sticticalis</i>	2,00E-09
	K.ELEDVVQPIIAK.L	1352,7424	1352,7551	-0,0127	heat shock cognate 70	ABF18258.	<i>Aedes aegypti</i>	6,00E-12
	K.NQLTTNPENTVFD AK.R	1690,8042	1690,8162	-0,012	heat shock cognate 70	ABP97091.	<i>Copris tripartitus</i>	2,00E-09
C	K.TVISQALSK.Y	945,5404	945,5495	-0,009	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	XP_001604685.	<i>Nasonia vitripennis</i>	7,00E-09
	R.LASFYERAGR.V	1168,5896	1168,5989	-0,0092	similar to V-ATPase subunit A	XP_001604685.	<i>Nasonia vitripennis</i>	8,00E-04



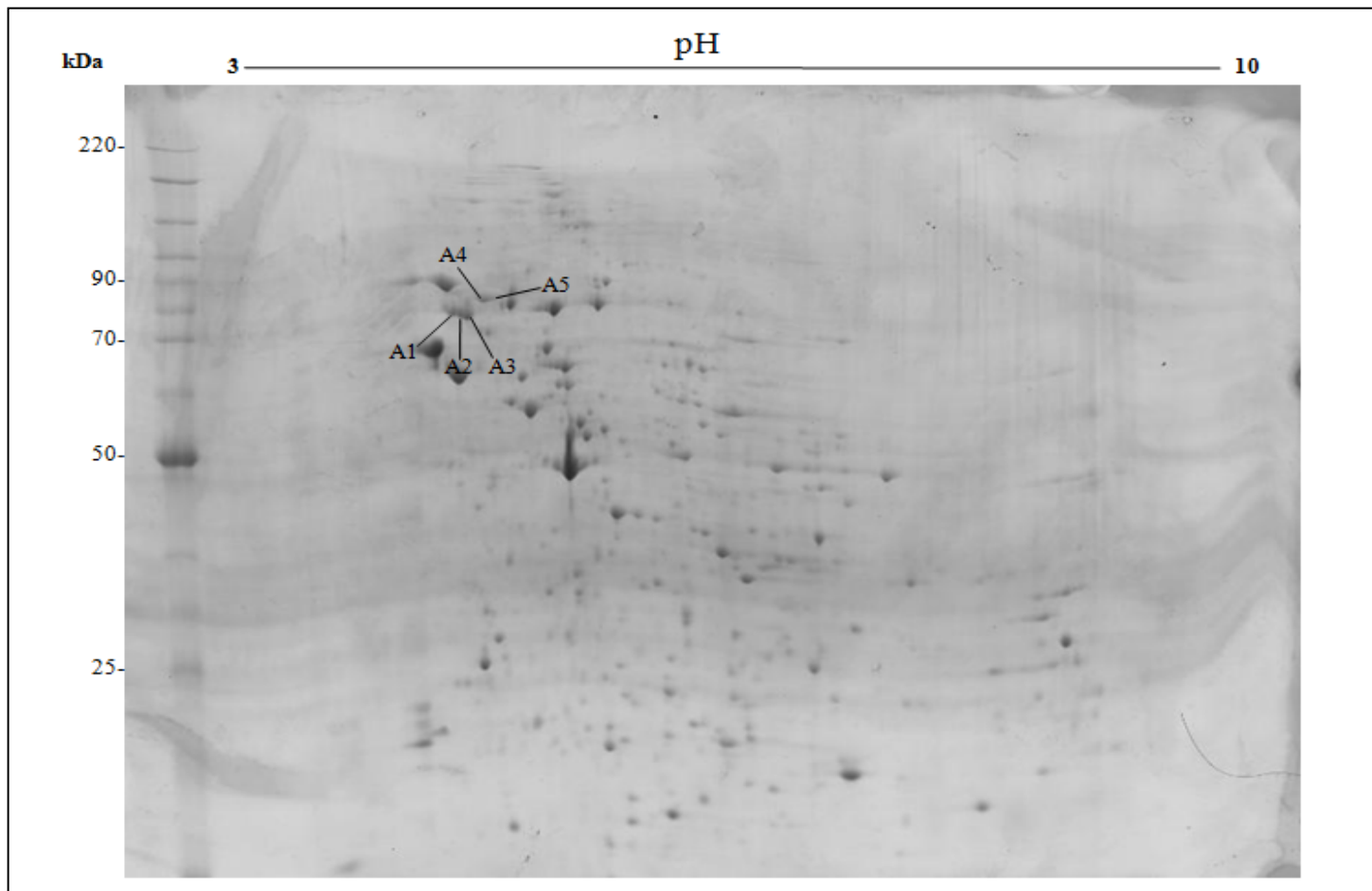
ABF18258.1  [B]	ADGERLIGDAAKNQLTTNPENTVFDARLLIGREFTDSTVQHDAKLLPFKVIKNSKPHIK 60 -----KNQLTTNPENTVFDARL----- 17 ***** Peptídeo 4
ABF18258.1  120 [B]	VSTSQGDKVFAPPEEISAMVLGKMKETAEAYLGKKVTHAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGVI -----
ABF18258.1  180 [B]	AGLNVMRIINEPTAAAIAYGLDKKDGKENVLVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVATNGD -----
ABF18258.1  240 [B]	THLGGEDFDQRVMDHFILYKLYKGGKDIRKDNRAVQKLRREVEKAKRALSSSHQVRIEIE -----
ABF18258.1  300 [B]	SFYEGDDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLADAMNKKDVDEIVLVGGSTRIPK -----
ABF18258.1  360 [B]	VQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGAAVQAGVLSGEQDTEAIVLLDVNPLTMGIETVG -----
ABF18258.1  420 [B]	GVMTKLIPRNTVVIPTKKSQIFSTASDNQHTVTIQVYEGERPMTKDNHLLGKFDLTGIPPA -----RNTVVIPTKKS----- 27 ***** Peptídeo 1
ABF18258.1  480 [B]	PRGIPQIEVSFEIDANGILQVSAEDKGTGNREKIVITNDQNRLTPEDIERMIKDAERFAD -----KIVITNDQNRL----- 38 ***** Peptídeo 2
ABF18258.1  540 [B]	DDKKLKERVEARNELESYAYSLKNQLGDKDKLGAKVADDDKATMEEAIDEKIKWLDENQD -----
ABF18258.1  [B]	ADSEDYKKQKKELEDVVQPIIAKLYASTGGSPPTADDEDLKDEL 585 -----KELEDVVQPIIAKL----- 52 ***** Peptídeo 3

**Figura 16:** Alinhamento dos peptídeos derivados da banda B com a proteína *Heat shock protein 70* (código de acesso ABF18258).

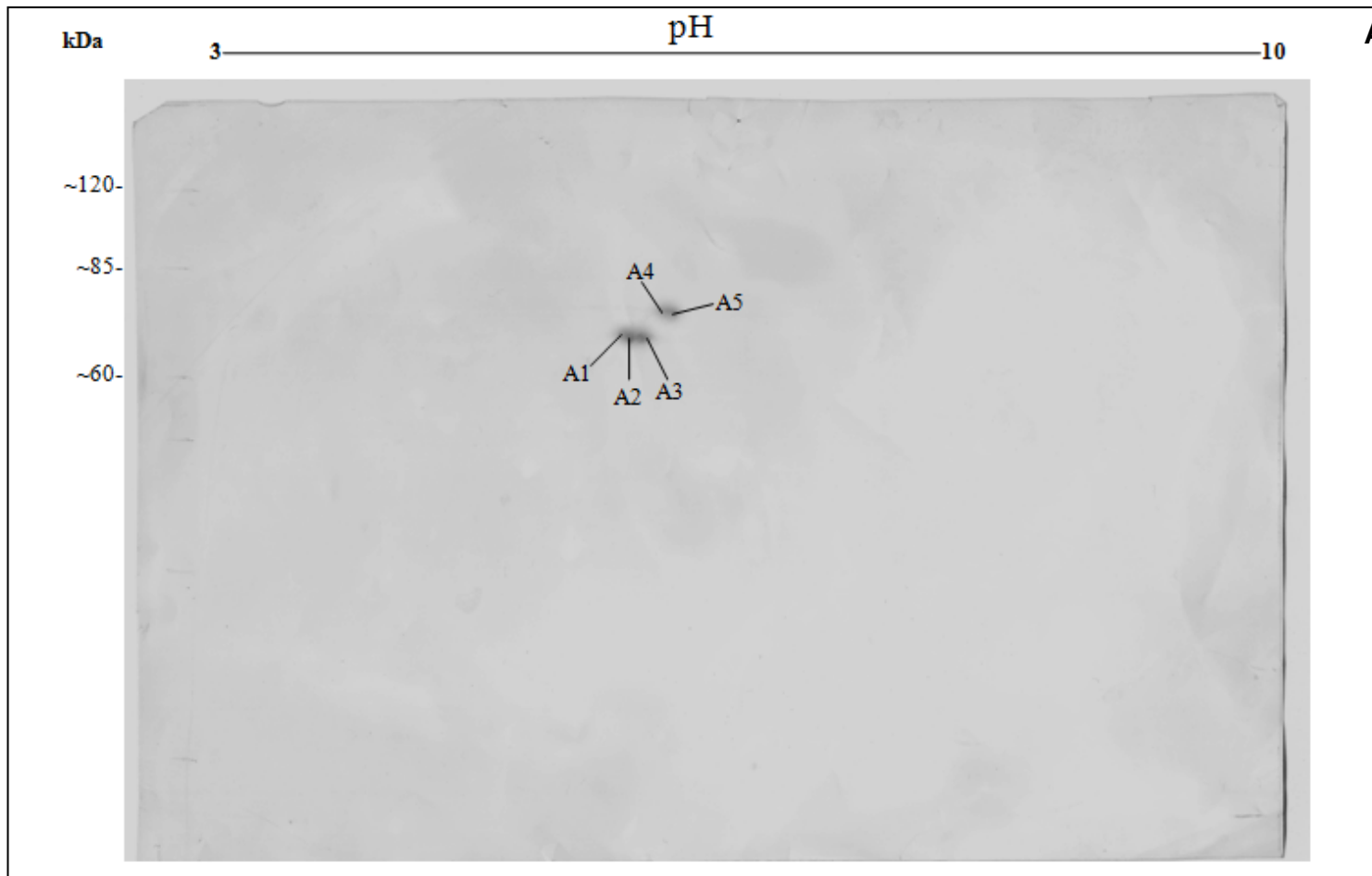
#### 4.2.2 Identificação de proteínas ligantes a toxinas Cry utilizando géis bidimensionais

A técnica de eletroforese bidimensional foi empregada para uma caracterização bioquímica mais completa dos prováveis receptores para toxinas Cry. As BBMV's de *A. grandis* foram eletroforeticamente separadas conforme (i) ponto isoelétrico (*pI*) e (ii) massa molecular. As técnicas de eletroforese unidimensional e bidimensional foram comparadas. As BBMV's separadas por 1D mostram um padrão de bandas discreto, em um intervalo entre menos de 15 kDa e 220 kDa. Quando separadas por 2DE, entretanto, mais de 450 spots foram detectados na mesma faixa, excetuando-se as proteínas acima de 120 kDa (Figura 17). A maioria dos spots foi detectada na faixa de pH 4 a 7, com poucas proteínas migrando para as faixas ácidas e básicas.

Após a eletroforese bidimensional, os géis foram transferidos para membranas de PVDF e incubados com a toxina Cry8Ka5 marcada. Cinco proteínas capazes de ligação a esta toxina foram visualizadas (Figura 18) e os spots correspondentes recortados dos géis corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Figura 17). Estes spots, denominados A1, A2 e A3, com massas similares à banda C identificada no blot unidimensional, e A4 e A5, com massas similares à da banda B, foram caracterizados bioquimicamente com o programa ImageMaster 2D Platinum (GE) (Tabela 3).



**Figura 17:** Eletroforese bidimensional de BBMVs de *A. grandis*. As proteínas (700µg) foram precipitadas e submetidas à focalização isoeétrica em gradiente linear de pH 3-10. Após a focalização, as proteínas foram separadas de acordo com a massa molecular via SDS-PAGE 10%. As setas indicam os spots capazes de ligação à toxina Cry8Ka5.



**Figura 18:** Identificação de prováveis receptores para Cry utilizando 2DE. Após a eletroforese bidimensional, o gel foi transferido para uma membrana de PVDF. A membrana foi bloqueada, incubada com a toxina e os ligantes visualizados com o cromógeno DAB.

**Tabela 3:** Identificação do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular dos spots capazes de ligação à toxina Cry8Ka5.

Spot	pI	Massa
A1	4,17	80,2
A2	4,19	80,2
A3	4,3	78,9
A4	4,44	84,5
A5	4,55	84,5

A partir da análise destes spots via seqüenciamento *de novo* utilizando MALDI-TOF-TOF, apenas uma proteína foi identificada. O restante não pôde ser identificado devido ao baixo número de seqüências de *A. grandis* nos bancos de dados. O peptídeo seqüenciado corresponde a uma V-ATPase (Figura 19) e é derivado do spot A1, indicando que as proteínas visualizadas correspondem a isoformas das mesmas visualizadas no gel unidimensional, ou demonstrando modificações pós-traducionais. Entretanto, A2, A3, A4 e A5 não foram identificadas. Nenhum spot com tamanho correspondente à banda A do gel unidimensional foi identificado nos blots.

XP_001604685.1   [C]	TVGDPVLRITGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLKDINELTGSIIYIPKGVNTPALSRTIAW 60 -----
XP_001604685.1   [C]	EFNPLYIKNGSHITGGDMYGIVHENTLVKHKMILPPKAKGTVTYIAPAGNYTVEDVVLET 120 -----
XP_001604685.1   [C]	EFDGEKTKYTMLQVWPVRQPRPVTEKLPANHPLLTGQRVLDLSLFCVQGGTTAIPGAFGC 180 -----
XP_001604685.1   [C]	GKTVISQALSKEYSNSDVIIYVGCGERGNEMSEVLRDFPELTVEIDGVTESIMKRTALVAN 240 -KTVISQALSKEY----- 11 ***** Peptídeo 1
XP_001604685.1   [C]	TSNMPVAAREASIYTGITLSEYFRDMGYNVSMADSTSRWAEALREISGRLAEMPADSGY 300 -----
XP_001604685.1   [C]	PAYLGARLASFYERAGRVKCLGNPDREGSVSIVGAVSPPGGDFSDPVTSATLGIVQVFWG 360 -----RLASFYERAGRV----- 23 ***** Peptídeo 2
XP_001604685.1   [C]	LDKKLAQRKHFPSINWLSISKYLRALDDFYDKNFQEFVPLRTKVKEILQEEDLSEIVQ 420 -----RALDDFYDKNFAEFVPLRT----- 42 ***** ***** Spot A1
XP_001604685.1   [C]	LVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSYDRFCPFYKTVGMLRNMIAFYDMARHA 480 -----
XP_001604685.1   [C]	VESTAQSDNKITWNVIRDSMGNILYQLSSMKFKDPVKDGEAKIRSDFDQLHEDIQQAFRN 540 -----
XP_001604685.1   [C]	LED 543 ---

**Figura 19:** Superposição dos peptídeos derivados da banda C (Figura 15), em azul, e do spot A1 das figuras 17 e 18, em vermelho, com a proteína V-ATPase subunit A (código de acesso XP\_001604685.1). Os peptídeos derivados de A2, A3, A4 e A5 não foram identificados.

### 4.3 Avaliação do potencial de competição entre as toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 por receptores *in vivo*

Como as toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 são capazes de reconhecer as mesmas proteínas no intestino de *A. grandis*, um bioensaio foi conduzido com o intuito de investigar o papel funcional destes ligantes na toxicidade. Desta forma, se a toxina Cry1Ac fosse capaz de competir pelos receptores de Cry8Ka5, uma alteração na toxicidade deveria ser detectada. O bioensaio com larvas de *A. grandis* foi realizado com quatro tratamentos: 1) controle negativo (água); 2) Cry1Ac (160 µg); 3) Cry8Ka5 (160 µg) e 4) Cry1Ac (160 µg) e Cry8Ka5 (160 µg). Cada tratamento foi repetido seis vezes, com doze indivíduos por repetição. Houve uma diferença significativa entre o tratamento 3 e os demais (Tabela 4), como validado pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (Tabela 5 e Figura 20). Estes resultados indicam que, *in vivo*, a toxina Cry1Ac compete com Cry8Ka5 pelos sítios de ligação aos receptores, inibindo o seu modo de ação.

**Tabela 4:** Experimento de competição entre toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 por receptores em bioensaios com larvas de *A. grandis*. Tratamentos: 1) Controle negativo; 2) Cry1Ac; 3) Cry8Ka5; 4) Cry8Ka5+Cry1Ac.

Tratamento	N	Média (% mortalidade)	Desv. Pad.	EPM
1	6	22,19a	10,1	4,12
2	6	22,18a	11,37	4,64
3	6	48,6b	13,35	5,45
4	6	20,8a	12,63	5,15

F=7,624, com 3 graus de liberdade

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos.

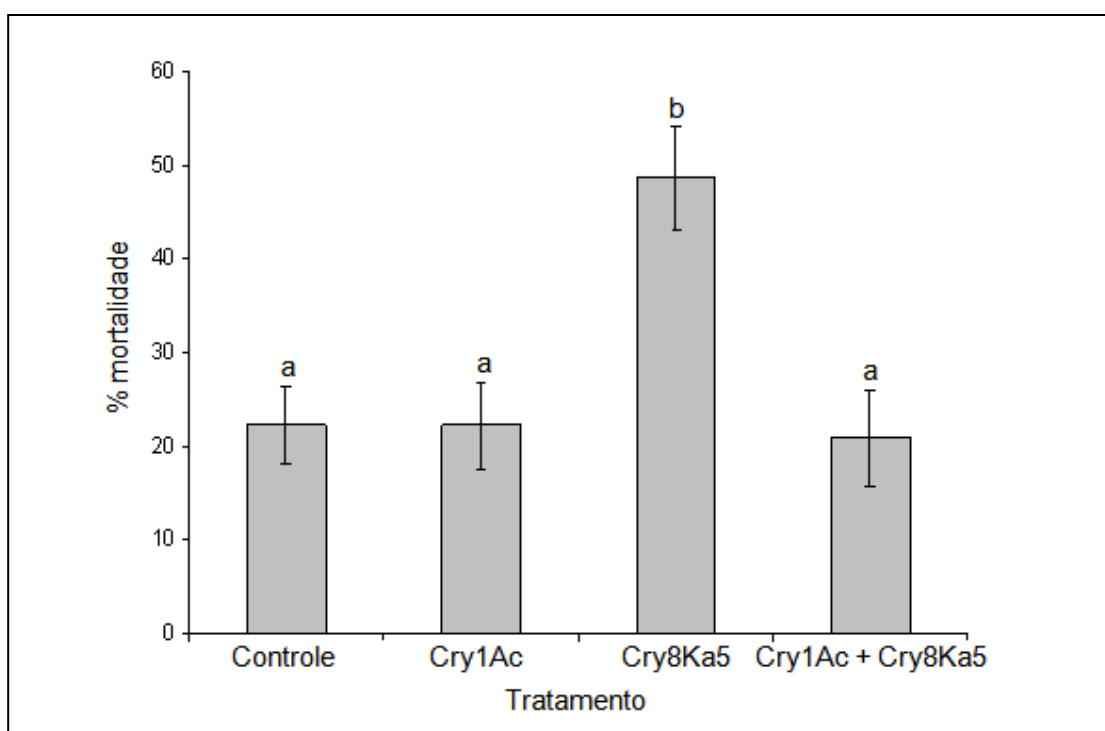
EPM, erro padrão da média; N, número de repetições; Desv. Pad., Desvio Padrão.

**Tabela 5:** Comparação entre os tratamentos do experimento de competição *in vivo* entre as toxinas Cry1Ac e Cry8Ka5 no intestino de *A. grandis*. Houve diferença significativa apenas entre o tratamento 3 e os demais. Tratamentos: 1) Controle negativo; 2) Cry1Ac; 3) Cry8Ka5; 4) Cry8Ka5+Cry1Ac.

Comparação	Diferença de médias (% mortalidade)	P	P<0,050
3 vs. 4	27,778	0,003	Sim
3 vs. 2	26,42	0,005	Sim
3 vs. 1	26,41	0,005	Sim
1 vs. 4	1,368	0,997	Não
1 vs. 2	0,01	1	Não
2 vs. 4	1,358	0,997	Não

Teste de Tukey para comparações múltiplas

P<0,05 indica diferença significativa entre os tratamentos.



**Figura 20:** Representação gráfica dos tratamentos do bioensaio com *A. grandis*. O controle negativo não diferiu estatisticamente com o tratamento contendo Cry1Ac e Cry1Ac+Cry8Ka5. A competição de Cry1Ac pelos receptores parece ter diminuído a toxicidade de Cry8Ka5. Barras indicam o erro-padrão e letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos.



## 5. DISCUSSÃO

A compreensão dos eventos moleculares envolvidos nos receptores de insetos para toxinas Cry é uma parte crucial no controle do uso destes biopesticidas. Estas informações permitem o desenvolvimento de toxinas mais ativas, com maior especificidade, além de controle sobre mecanismos de resistência.

Neste trabalho, foi descrita a identificação de proteínas do proteoma de BBMV de *A. grandis* capazes de interação com toxinas Cry. Para tal, foram utilizadas as técnicas de eletroforese 1D, 2DE e espectrometria de massa. Em ambas as técnicas eletroforéticas, as proteínas estão desnaturadas, embora constituam as estratégias mais utilizadas para caracterização inicial de receptores. Isto aliado ao fato que as toxinas Cry são capazes de reconhecê-los devido à exposição dos epítomos de ligação (DANIEL *et al.*, 2002). Entretanto, como demonstrado por KEETON *et al.* (1998), diversos fatores, como a preparação das BBMVs, a membrana de transferência (nitrocelulose ou PVDF), o agente de bloqueio e o detergente utilizado nos tampões de incubação e bloqueio influenciam os resultados de forma drástica. Desta forma, podem haver outros ligantes para as toxinas testadas, variando-se os métodos utilizados.

Todos os receptores para toxinas Cry descritos até hoje são proteínas de membrana, sendo esta a classe mais difícil de analisar via eletroforese bidimensional, dada sua hidrofobicidade e inserção em bicamadas lipídicas (BRAUN *et al.*, 2007; RABILLOUD *et al.*, 2008). Adicionalmente, a técnica possui limitações quanto a proteínas com peso molecular muito elevado (acima de 120

kDa) (OH-ISHI & MAEDA, 2002). Isto explica o fato da proteína de ~120 kDa, identificada em 1D, não ter sido detectada via 2DE. Outras limitações inerentes à eletroforese bidimensional são proteínas de peso molecular abaixo de 15 kDa (BOSCHETTI *et al.*, 2007) ou pouco abundantes (AHMED & RICE, 2005). Ainda assim, a técnica de eletroforese bidimensional aliada à identificação de proteínas via espectrometria de massa é a abordagem mais utilizada em estudos proteômicos (SÜSS & SOLIMENA, 2008).

A identificação de receptores via cromatografia de afinidade contendo toxinas Cry imobilizadas já foi utilizada por LIAO *et al.* (2005) e KAUR *et al.* (2007). Os autores utilizaram BBMV's de *Helicoverpa armigera* e células de cultura, respectivamente. Entretanto, BBMV's têm natureza lipossômica, podendo formar agregados contendo várias proteínas diferentes, dificultando a purificação por meios cromatográficos. Além disso, dependem de detergentes para aumentar a solubilidade a tampões. Todavia, em ambos os casos, as proteínas identificadas eram também capazes de ligação a toxinas Cry sob condições desnaturantes.

A técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* não se mostrou eficaz para a identificação das proteínas. Isto devido ao escasso número de seqüências de coleópteros e, conseqüentemente, de *A. grandis* depositadas nos bancos de dados, resultando em scores de baixa probabilidade ou não significativos. As informações geradas pelo seqüenciamento *de novo*, entretanto, possibilitaram contornar essa limitação, sendo que homólogos de duas classes de proteínas, V-ATPase e *Heat-Shock proteins*, foram identificadas.

A interação de toxinas Cry com V-ATPases em condições desnaturantes já foi previamente reportada por KRISHNAMOORTHY *et al.* (2007) e por JURAT-FUENTES & ADANG (2007), no lepidóptero *Heliothis virescens*. Estas enzimas estão localizadas nas membranas apicais de células caliciformes, sendo a fonte de energia primária para secreção e absorção, servindo como um transportador de H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> eletrogênico pelo epitélio do intestino dos insetos (WIECZOREC *et al.*, 1999). As diferentes subunidades dessa enzima têm papéis distintos na regulação e atividade catalítica, sendo baixo o número de seqüências conservadas entre elas.

Embora Cry1Ac não possua toxicidade sobre vertebrados, a inibição de V-ATPases de mamíferos foi relatada por ENGLISH & CANTLEY (1986) em cachorro e por RANI & BALARAMAN (1997) em ratos. Em insetos, ENGLISH & CANTLEY (1985) demonstram inibição de uma ATPase K<sup>+</sup> - sensível em *Manduca sexta* por uma  $\delta$ -endotoxina. Estas enzimas de fato desempenham um papel na toxicidade, tendo em vista o modelo de influxo de íons e alcalinização do citoplasma, como revisado por WOLFERSBERGER (1992). CANDAS *et al.* (2003), em um estudo de proteômica, demonstraram aumento de expressão de V-ATPases em larvas resistentes de *Plodia interpunctella*, sugerindo que isto resultaria em um elevado estado energético no tecido intestinal, facilitando a resistência.

As V-ATPases também estão envolvidas no mecanismo de ação de outras toxinas, como a toxina diftérica (UMATA *et al.*, 1990), as toxinas derivadas de *Bacillus anthracis* (antraz) (JEFFERIES *et al.*, 2008), as toxinas fúngicas Destruxin e Efraeptin (BANDANI *et al.*, 2001), além de interiorização de vírus

envelopados, como o Influenza (HINTON *et al.*, 2009). No entanto, o mecanismo de ação de Cry8Ka5 não parece ser mediado pela inibição da V-ATPase, uma vez que (i) Cry1Ac também é capaz de reconhecer esta proteína e (ii) pelo fato de Cry1Ac não ser tóxica para *A. grandis*, como reportado por SIMS (1995) e avaliado no bioensaio deste trabalho, incubando-se as larvas na presença de ambas toxinas. As V-ATPases são responsáveis na regulação do pH citoplasmático, que é um provável sistema de sinalização (DOW *et al.*, 1997). O bloqueio destas enzimas em culturas de células aumenta a suscetibilidade à apoptose (NISHIHARA *et al.*, 1995). Assim, o mecanismo de ação de Cry8Ka5 pode corroborar com o modelo de toxicidade proposto por ZHANG *et al.* (2006), no qual as toxinas Cry agem por um mecanismo de morte celular programada.

Este é o primeiro trabalho demonstrando a interação direta entre toxinas Cry e proteínas Heat-shock. As HSP pertencem a um grupo de chaperonas moleculares que são expressas constitutivamente (Heat shock Cognates) ou induzíveis. Elas estão classificadas em famílias de acordo com a massa molecular aparente. Sob condições adversas, como temperaturas elevadas, estresse oxidativo, infecção ou inflamação, o aumento da expressão de HSP está associada à proteção celular contra os efeitos gerados por essas condições (POLLA *et al.*, 2007). Em mamíferos, as HSP-70 podem estar presentes no meio extracelular, conferindo tolerância a endotoxinas lipopolissacarídicas (ANEJA *et al.*, 2006; KUSTANOVA *et al.*, 2006). Recentemente, uma HSP-70 foi descrita como acoplada à membrana, servindo de receptor para um vírus de encefalite (DAS *et al.*, 2009).

Algumas toxinas protéicas dependem das HSP para atingir as formas ativas. Como exemplo, a ricina na forma inativa interage com uma HSP-70 citoplasmática, podendo ou não atingir a forma catalítica, dependendo das co-chaperonas que regulam a HSP (SPOONER *et al.*, 2008). A toxina diftérica, cuja forma catalítica parte do lúmen de endossomos, depende de HSP-90 para atingir o meio externo das células (RATTS *et al.*, 2003).

No caso das toxinas Cry, HUFFMAN *et al.* (2004) detectaram um aumento na expressão de HSP em *C. elegans* quando em contato com Cry5B, embora neste caso a resposta tenha sido inespecífica. NAIR & DEAN (2008) propuseram que todos os domínios de toxinas Cry1A inserem-se em BBMs de *Manduca sexta*. Assim, pode-se sugerir a HSP-70 encontrada no presente trabalho não deva atuar como receptor, mas como parte do mecanismo de defesa molecular do inseto contra toxinas internalizadas. Todavia, uma vez que é amplamente aceito que as toxinas Cry formam poros na membrana, os estresses osmótico e oxidativo poderiam resultar em aumento da expressão de HSPs. Assim, embora especulativo, também é possível que a interação Cry-HSP desregule o mecanismo de proteção celular do inseto.

A proteína de ~120 kDa, visualizada apenas nos géis unidimensionais, não pôde ser identificada. Um grande número de receptores do tipo aminopeptidase N (APN) foi descrito com esta massa molecular, em experimentos utilizando a mesma técnica baseada em blot do presente trabalho (como exemplo, KNIGHT *et al.*, 1994; SANGADALA *et al.*, 1994; DENOLF *et al.*, 1997; YAOI *et al.*, 2004). As APNs pertencem a uma família de enzimas que clivam aminoácidos neutros das porções N-terminal de polipeptídeos. Em insetos, as APNs são presas à

membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (AGRAWAL *et al.*, 2002), contrastando com os vertebrados, onde um N-terminal hidrofóbico se insere na membrana (SEMENZA, 1986). Como revisado por PIGGOT & ELLAR (2007), Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca e Cry1Fa já foram descritas como ligantes de APN. Os dados baseados na ligação destas enzimas a toxinas Cry são, entretanto, complexos. Muitas APNs são expressas simultaneamente no intestino dos insetos, podendo variar em tamanho, atividade e modificações pós-traducionais, particularmente difíceis de reproduzir via expressão heteróloga (GARNER *et al.*, 1999). Outro problema, descrito por MARTÍNEZ-RAMÍREZ *et al.* (1994), ocorre pelo fato de outra classe de receptores, as caderinas, ser sensível a degradação proteolítica, formando produtos de ~120 kDa. Assim, podem ser confundidas com APNs em experimentos de ligação.

A validação das moléculas identificadas neste trabalho como receptores pode ser feita pela expressão dos genes correspondentes em células de insetos (JURAT-FUENTES & ADANG, 2006) ou em insetos não-suscetíveis (GILL & ELLAR, 2002). Para tal, o desenho de primers a partir da seqüência N-terminal dos ligantes identificados constitui uma boa estratégia. O silenciamento gênico também pode ser utilizado para identificar um receptor (SIVAKUMAR *et al.*, 2007). Entretanto, a utilização da técnica baseada em RNA de interferência pode ser letal em *A. grandis*, particularmente no caso da V-ATPase (BAUM *et al.*, 2007; PRICE & GATEHOUSE, 2008).

A resistência de insetos a toxinas Cry tem sido amplamente reportada em laboratório. Como a deflagração da atividade destas toxinas requer muitos passos, diversos mecanismos de resistência foram descritos. Entre eles estão

alterações nas constantes cinéticas de interação toxina-receptor (VAN RIE *et al.*, 1990; MASSON *et al.*, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 2006), alteração na glicosilação do receptor (JURAT-FUENTES *et al.*, 2002), falta de expressão de receptor (HERRERO *et al.*, 2005) e perda de sítios de ligação (RAUSSEL *et al.*, 2000). Na maior parte destes casos, uma alta afinidade entre toxinas e receptores é correlacionada com alta toxicidade, enquanto baixa afinidade é correlacionada com baixa toxicidade. Embora esta interação seja necessária, ela não é capaz de desencadear a morte celular *per se*, como reportado por LI *et al.* (2004), assim como a alta afinidade entre as moléculas nem sempre denota alta toxicidade (HIGUCHI *et al.*, 2007). Desta forma, é possível inferir que o bloqueio do mecanismo de ação de Cry8Ka5 neste trabalho se deve a uma maior afinidade de Cry1Ac pelas moléculas receptoras, sendo que outros requisitos que não a afinidade são necessários para desencadear o efeito tóxico. Outra hipótese é a de que as toxinas podem interagir entre si formando agregados, resultando na inibição da atividade tóxica.

O único mecanismo de resistência em que os receptores não desempenham papel central na atividade das toxinas é a mudança no perfil de proteinases intestinais descrito por KARUMBIAIH *et al.* (2007). De acordo com este modelo, as protoxinas não seriam ativadas pelo inseto, impedindo as etapas subsequentes de ligação ao receptor e morte das células intestinais. Entretanto, nas variedades transgênicas as toxinas são expressas na forma ativa, não dependendo de ativação prévia por proteinases do organismo-alvo.

Tendo em vista que a resistência é geneticamente recessiva (MORIN *et al.*, 2003), algumas estratégias são empregadas para que estes mecanismos não

ocorram em campo. Entre estas estão as zonas de refúgio, em que uma área é reservada para plantio de variedades não transgênicas (TABASHNIK, 2001). Os insetos provenientes destas áreas têm menor probabilidade de exibir resistência a toxinas Cry. Desta forma, podem acasalar com insetos tolerantes provenientes de plantios transgênicos, diluindo a resistência. Na ausência dessas áreas, uma resposta rápida à seleção é possível (MEIHLS *et al.*, 2008). A alta expressão de toxina pela planta, cerca de 25 vezes a quantidade necessária para matar 99% dos insetos (EPA 1998), é tão importante quanto as áreas de refúgio. Desta forma, os insetos heterozigotos não sobrevivem à exposição ao plantio Bt, mantendo a resistência funcionalmente recessiva.

Outra forma de controle de desenvolvimento de resistência é a piramidização de genes. Nesta estratégia, duas ou mais toxinas são expressas pela planta, diminuindo as chances de um inseto desenvolver resistência.

Este é o primeiro trabalho a relatar a inibição *in vivo* de uma toxina Cry por outra toxina do mesmo grupo. No Brasil, as variedades de algodoeiro transgênico expressam a toxina Cry1Ac, efetiva no controle de lepidópteros-praga. Entretanto, o bicudo do algodoeiro é a praga mais importante, e a inserção do gene que codifica Cry8Ka5 pode ser uma alternativa ao controle químico. Embora as condições de campo não tenham sido simuladas, a inibição do mecanismo de ação de Cry8Ka5 por Cry1Ac demonstrada neste trabalho pode tornar o co-plantio ou co-expressão inviável.

Assim, foram identificadas proteínas de *A. grandis* capazes de interação com toxinas Cry. Isto representa um passo fundamental na compreensão dos eventos moleculares envolvidos no modo de ação desses biopesticidas.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N.; MALHOTRA, P. & BHATNAGAR, R.K. Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4583–4592, 2002.

AHMED, N. & RICE, G.E. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 815(1-2):39-50, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402, 1997.

ANEJA, R.; ODOMS, K.; DUNSMORE, K.; SHANLEY, T.P. & WONG, H.R. Extracellular Heat Shock Protein-70 Induces Endotoxin Tolerance in THP-1 Cells *Journal of Immunology*, 177: 7184-7192, 2006.

ARAUJO, L.H.A. & AZEVEDO, F.R. Aspectos Biológicos de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera:Pteromalidae), Parasitóide do Bicudo do Algodoeiro *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26(3): 503-506, 1997.

ASHOURI, A.; MICHAUD, D. & CLOUTIER, C. Recombinant and classically selected factors of potato plant resistance to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, variously affect the potato aphid parasitoid *Aphidius nigripes*. *BioControl*, 46: 401-418, 2001.

BANDANI, A.R.; AMIRI, B.; BUTT, T.M. & GORDON-WEEKS, R. Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1510(1-2):367-77, 2001.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T. & ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1322-1326, 2007.

BELL, H.A.; FITCHES, E.C.; DOWN, R.E.; MARRIS, G.C.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. & GATEHOUSE, A.M.R. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*, 45:983-991, 1999.

BENINTENDE, G & MÁRQUEZ, A. M. Bactérias entomopatógenas. In: LECUANA, R. *Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. Capítulo 4: Bacterias Entomopatógenas, p.61-65, 1996.

BERNALL, C.C.; AGUDA, R.M. & COHEN, M.B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipinnis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102:21-28, 2002.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D.J. & LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, 348:363–382, 2005.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C. & LESCAR, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*, 188: 3391–3401, 2006.

BOSCHETTI, E.; LOMAS, L.; CITTERIO, A. & RIGHETTI, P.G. Romancing the "hidden proteome", Anno Domini two zero zero seven. *Journal of Chromatography A*, 1153(1-2):277-290, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

BRAUN, R.J.; KINKL, N.; BEER, M. & UEFFING, M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4):1033-1045, 2007.

BRAVO, A.; GILL, S. S. & SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, Amsterdam, p. 175–206, 2005.

BRAVO, A., GILL, S.S. & SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4):423-35, 2007.

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; ZHUANG, M.; GILL, S.S. & SOBERON, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1667: 38–46, 2004.

BRAVO, A.; SANCHEZ, J.; KOUSKOURA, T. & CRICKMORE, N. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 23985–23987, 2002.

BUDATHA, M.; MEUR, G. & DUTTA-GUPTA, A. A novel aminopeptidase in the fat body of the both *Achaea janata* as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and its comparison with midgut aminopeptidase. *Biochemical Journal*, 405(2):287-97, 2007.

CANDAS, M., LOSEVA, O., OPPERT, B., KOSARAJU, P. & BULLA JR., L.A. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indianmeal Moth Larval Gut Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2: 19–28, 2003.

CARLINI, C.R. & GROSSI DE SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11): 1515-1539, 2002.

CATTANEO, M.G.; YAFUSO, C.; SCHMIDT, C.; HUANG, C.Y.; RAHMAN, M.; OLSON, C.; ELLERS-KIRK, C.; ORR, B.J.; MARSH, S.E.; ANTILLA, L.; DUTILLEUL, P. & CARRIÈRE, Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20):7571-7576, 2006.

CONAB. *Algodão em pluma informativo especial*, 2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/CONJ%20ESPECIAL%20JULHO%202006.pdf>>. Acessado em 10 out. 2007.

CONAB. *NORMAS ESPECÍFICAS DE ALGODÃO – SAFRAS 2008/2009 E 2009, 2008.* Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/moc/titulos/T41s2008-09e2009.pdf>. Acessado em 15 out. 2008.

DANIEL, A.; SANGADALA, S.; DEAN, D.H. & ADANG, M.J. Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes

binding epitopes hidden under nondenaturing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5):2106-12, 2002.

DAS, S.; LAXMINARAYANA, S.V.; CHANDRA, N.; RAVI, V. & DESAI, A. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology*, In Press. DOI 10.1016

DENOLF, P.; HENDRICKX, K.; VAN DAMME, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M.; DEGHEELE, D. & VAN RIE, J. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, 248(3):748-61, 1997.

DIAS, S.C.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; GROSSI DE SÁ, M.F. & MONNERAT, R.G. Desenvolvimento de metodologia de bioensaios utilizando *Bacillus thuringiensis* contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). *Comunicado Técnico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 42: 1-5, 2000.

DOW, J.A.T.; DAVIES, S.A.; GUO, Y.; GRAHAM, S.; FINBOW, M.E. & KAISER, K. MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF V-ATPASE FUNCTION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *The Journal of Experimental Biology*, 200: 237–245, 1997.

ENGLISH, L.H. & CANTLEY, L.C. Delta endotoxin inhibits Rb<sup>+</sup> uptake, lowers cytoplasmic pH and inhibits a K<sup>+</sup>-ATPase in *Manduca sexta* CHE cells. *Journal of Membrane Biology*, 85(3):199-204, 1985.

ENGLISH, L.H. & CANTLEY, L.C. Delta endotoxin is a potent inhibitor of the (Na,K)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 1170–1173, 1986.

EPA – Environmental Protection Agency (1998) *The Environmental Protection Agency's White Paper on Bt Plant-Pesticide Resistance Management* (Environmental Protection Agency, Washington, D.C.), 1998.

FERRÉ, J. & VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Reviews of Entomology*, 47: 501-533, 2002).

GALITSKY, N., CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J.R.; PANGBORN, W. & ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica*, 57:1101–1109, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATIST, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHINI, R. A.; ALVES, S. B. & VENDRAMIN, J. D. *Manual de Entomologia Agrícola*. Editora Ceres, São Paulo, SP, 486p. 2002.

GARNER, K.J.; HIREMATH, S.; LEHTOMA, K. & VALAITIS, A.P. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(6):527-35, 1999.

GAZIT, E.; ROCCA, P.L.; SANSOM, M.S.P. & SHAI, Y. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 12289-12294, 1998.

GAZIT, E. & SHAI, Y. The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6): 2571-2578, 1995.

GILL, M. & ELLAR, D.J. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 619–625, 2002.

GOMEZ, I.; PARDO-LOPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ L.E.; PÉRES, C.; SANCHES J.; SOBERÓN, M. & BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28: 169-173, 2007.

GONDIM, D.M.C, BELOT, J-L, SILVIE, P. & PETIT, N. Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil. COODETEC. 3a ed. Cascavel, PR. 120p. 2001.

GRIFFITTS, J.S.; HASLAM, S.M.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S.F; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER, P.S. DELL, A.; ADANG, M.J. & AROIAN, R.V. Glycolipids as Receptors for *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin. *Science*, 307: 922-925, 2005.

GROCHULSKI, 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. *Journal of Molecular Biology*, 254: 447–464, 1995.

GROSSI DE SÁ, M.F. & ROMANO, E. Genética molecular de plantas para resistência a insetos. In: Pires, C.S.S.; Fontes, E.M.G. & Sujii, E.R. *Impacto*

ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso. 1a ed. Editora Embrapa, cap. 2, p. 49-65, 2003.

GUO, S.Y.; YE, S.; SONG, F.P.; ZHANG, J.; WEI, L. & SHU, C.L. Crystal Structure of Insecticidal Delta-Endotoxin Cry8Ea1 from *Bacillus Thuringiensis* at 2.2 Angstroms Resolution. Número de acesso PDB: 3eb7, 2008.

HANSEN, B.M. & SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Charles, J. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field application*. Kluwer Academic Publishers.p. 41-64, 2000.

HARA, H., ATSUMI, S., YAOI, K., NAKANISHI, K., HIGURASHI, S., MIURA, N., TABUNOKI, N. & SATO, R. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. *FEBS Letters*, 538: 29-34, 2003.

HASENCLEVER, L. & ANTUNES, A. UMA AGENDA DE COMPETITIVIDADE PARA A INDÚSTRIA PAULISTA INDÚSTRIA DE DEFENSIVOS. Nota técnica da Fundação instituto de pesquisas econômicas do Estado de São Paulo. 123pg., 2008.

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

HIGUCHI, M.; HAGINOYA, K.; YAMAZAKI, T.; MIYAMOTO, K.; KATAGIRI, T.; TOMIMOTO, K.; SHITOMI, Y.; HAYAKAWA, T.; SATO, R. & HORI, H. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 147: 716–724, 2007.

HINTON, A.; BOND, S. & FORGAC, M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflügers Archiv*, 457(3):589-598, 2009.

HOSSAIN, D. M.; SHITOMI, Y.; MORIYAMA, K.; HIGUCHI, M.; HAYAKAWA, T.; MITSUI, T.; SATO, R. & HORI, H. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:4604–4612, 2004.

HUFFMAN, D.L.; ABRAMI, L.; SASIK, R.; CORBEIL, J.; VAN DER GOOT, F.G. & AROIAN, R.V. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30): 10995–11000, 2004.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 06/01/09

INGLE, S.S.; TRIVEDI, N.; PRASAD, R.; KURUVILLA, J.; RAO, K.K. & CHATPAR, H.S. Aminopeptidase-N from the *Helicoverpa armigera* (Hubner) brush border membrane vesicles as a receptor of *Bacillus thuringiensis* cryIAc delta-endotoxin. *Current Microbiology*, 43(4): 255-259, 2001.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, ISAAA, N°36, 2007.

JASINSKI, J.R.; EISLEY, J.B.; YOUNG, C.E.; KOVACH, J. & WILLSON, H. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Environmental Entomology*, 32(2):407-413, 2003.

JEFFERIES, K.C.; CIPRIANO, D.J. & FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1):33-42, 2008.

JURAT-FUENTES, J.L. & ADANG, M.J. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry*, 45(32):9688-9695, 2006.

JURAT-FUENTES, J.L. & ADANG, M.J. A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 87–191, 2007.

JURAT-FUENTES, J.L.; GOULD, F.L. & ADANG, M.J. Altered Glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11):5711-5717, 2002.

KARUMBIAIAH, L.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J.L. & ADANG, M.J. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146: 139–146, 2007.

KAUR, R.; AGRAWAL, N. & BHATNAGAR, R. Purification and characterization of aminopeptidase N from *Spodoptera litura* expressed in Sf21 insect cells. *Protein Expression and Purification*, 54: 267–274, 2007.

KEETON, T. P.; FRANCIS, B. R.; MAATY, W. S. A. & BULLA- JR., L. A. Effects of Midgut-Protein-Preparative and Ligand Binding Procedures on the Toxin Binding Characteristics of BT-R1, a Common High-Affinity Receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6): 2158–2165, 1998.

KNIGHT, P.J.; CRICKMORE, N. & ELLAR, D.J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11(3):429-36, 1994.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, 24: 275-308, 1994.

KNOWLES, B. H & ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus-thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924(3): 509-518, 1987.

KRISHNAMOORTHY, M.; JURAT-FUENTES, J.L.; MCNALL, R.J.; ANDACHT, T. & ADANG, M.J. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:189–201, 2007.

KUSTANOVA, G.A.; MURASHEV, A.N.; KARPOV, V.L.; MARGULIS, B.A.; GUZHOVA, I.V.; PROKHORENKO, I.R.; GRACHEV, S.V. & EVGEN'EV, M.B. Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones*, 11(3): 276–286, 2006.

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

LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P. & TIÉRY, I. Updating the H- antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 660-672, 1999.

LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B & ELLSWORTH, P.C. Insect and mite pests of cotton. In: SMITH, C.W. & COTHREN, J.T. *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*, p.489-551, 1999.

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

LI, J.; DERBYSHIRE, D.J.; PROMDONKOY, B. & ELLAR, D.J. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions*, 29:571– 577, 2001.



LI, H.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; OPPERT, B.; FERRÉ, J.; HIGGINS, R.A.; BUSCHMAN, L.L.; RADKE, G.A.; ZHU, K.Y. & HUANG, F. Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323: 52–57, 2004.

LIAO, C.; TROWELL, S.C. & AKHURST, R. Purification and Characterization of Cry1Ac Toxin Binding Proteins from the Brush Border Membrane of *Helicoverpa armigera* Midgut. *Current Microbiology*, 51: 367–371, 2005.

LORENCE, A.; DARSZON, A. & BRAVO, A. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Letters*, 414(2): 303-307, 1997.

LOZADA, R.M.; ALVAREZ, L.A. & WHITCOMB, W.H. El picudo mejicano del algodón, *Anthonomus grandis* Boh: el desafío para la producción algodонера en el Paraguay. Ministerio de Agricultura y Ganadeiro, Paraguay. *Serie Publicacion miscelanea*, 18, 1987.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N. & SCHNEPF, H. E. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Reviews in Genetics*, 37: 409-33, 2003.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A. & CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4): 193-199, 2001.

MAGALHÃES, M.T.Q. Toxinas cry: perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro. Dissertação de mestrado. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GONZÁLEZ-NEBAUER, S.; ESCRICHE, B. & REAL, M.D. Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201:782–787, 1994.

MASSON, L.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R. & TABASHNIK, B. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20): 11887-11896, 1995.

MEIHLS, L.N.; HIGDON, M.L.; SIEGFRIED, B.D.; MILLER, N.J.; SAPPINGTON, T.W.; ELLERSIECK, M.R.; SPENCER, T.A. & HIBBARD, B.E. Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant

greenhouse selection. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49): 19177–19182, 2008.

MEN, X.; GE, F.; LIU, X. & YARDIM, E.N. Diversity of arthropod communities in transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton agroecosystems. *Environmental Entomology*, 32(2):270-275, 2003.

METCALF, R.L. & METCALF, R.A. *Destructive and useful insects: their habits and control*. McGraw-Hill, New York. 1993.

MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRA NETO, O.B.; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O. & GROSSI DE SÁ, M.F. Criação massa do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. *Comunicado Técnico/Embrapa*, 46: 1-4, 2000.

MORIN, S.; BIGGS, R.W.; SISTERTON, M.S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHAN, L.J.; HECKEL, D.G.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; BROWN, J.K. & TABASHNIK, B.E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9): 5004-5009, 2003.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T. & STROUD, R.M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure (Cambridge)* 9:409–417, 2001.

NAIR, M.S. & DEAN, D.H. All Domains of Cry1A Toxins Insert into Insect Brush Border Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39): 26324–26331, 2008.

NARANJO, S.E. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environmental Entomology*, 34(5):1193-1210, 2005.

NISHIHARA, T.; AKIFUSA, S.; KOSEKI, T.; KATO, S.; MURO, M. & HANADA, N. Specific inhibitors of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical Research Communications*, 212: 255–262, 1995.

OCHOA-CAMPUZANO, C.; REAL, M.D.; AMPARO, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C.; BRAVO, A. & RAUSELL, C. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(2):437-42, 2007.

OH-ISHI, M. & MAEDA, T. Separation techniques for high-molecular-mass proteins. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 771(1-2):49-66, 2002.

OLIVEIRA, G.R.; BRUNETTA, P.S.F.; RAMOS, H.B.; SILVA, M.C.M.; FIRMINO, A.A.P.; NAKASU, E.Y.T.; SOUZA, D.S.L.; ANTONINO-DE-SOUZA JR., J.; CRAVEIRO, K.I.C.; GOMES JR, J.E.; RIGDEN, D. J. & GROSSI DE SA, M.F. Novel Cry toxin with improved activity towards cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). Em preparação.

OLIVEIRA, M.E.C.R.; CARDOSO, U.P.; BRITO, A.F.; SANTOS, V.C.; MENEZES Jr., A.O. & CASTELLANI, M.A. Infestação, Parasitismo E Predação Do Bicudo-Do-Algodoeiro *Anthonomus Grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) Em Cultivo De Algodão No Semi-Árido Do Sudoeste Da Bahia. In: *60º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC*, Campinas. **Anais eletrônicos** São Paulo: SBPC/UNICAMP, 2008. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/60ra/resumos/resumos/R3171-1.html>. Acessado em 25 nov. 2008.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, L.J.; PETERSEN, G.B.; PARKER, S.A.; McPHERSON, J.W.; LOVE, G.; REED, G.; BIEVER, D. & FISCHHOFF. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, 22:313-321, 1993.

PIGOTT & ELLAR. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(2):255-281, 2007.

POLLA, B.S.; GABERT, F.; PEYRUSSE, B.M-N & JACQUIER-SARLIN, M.R. Increased proteolysis of diphtheria toxin by human monocytes after heat shock: a subsidiary role for heat-shock protein 70 in antigen processing. *Immunology*, 120(2): 230–241, 2007.

PRICE, D.R.G. & GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26(7): 393-400, 2008.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S. & LELONG, C. Fully denaturing two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a critical update. *Proteomics*, 8(19): 3965-3973, 2008.

RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B. & ALVES, R.S.A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S. &

AZEVEDO, J.L. (Eds). *Controle Biológico*, vol. 2, p.17-85. Embrapa Meio Ambiente, 2000.

RANI, S.S. & BALARAMAN, K. Effect of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the enzymes of rat intestinal brush border membrane vesicles. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35(11):1191-3, 1997.

RATTS, R.; ZENG, H.; BERG, E.A.; BLUE, C.; MCCOMB, M.E.; COSTELLO, C.E.; VANDERSPEK, J.C. & MURPHY, J.R. The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *Journal of Cell Biology*, 160(7): 1139-1150, 2003.

RAUSELL, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.C.; GARCÍA-ROBLES, I. & REAL, M.D. A Binding Site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Is Lost during Larval Development in Two Forest Pests. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1553-1558, 2000.

RAUSELL, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; MIRANDA-CASSOLUENGO, R.; GMEZ, I.; RUDIÑO-PIÑERA, E.; SOBERÓN, M. & BRAVO, A. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane insertion intermediate. *Biochemistry*, 43: 166–174, 2004.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M. & BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 24(1):63-71, 2006.

SALOMÃO, A. & SEIBEL, Felipe. Os 10 novos pólos do agronegócio: Exame ouviu os principais especialistas do setor para identificar quais municípios brasileiros possuem maior potencial de crescimento dos negócios ligados ao campo. *Revista Exame*, 849,10-15, 2005.

SANGADALA, S.; WALTERS, F.S.; ENGLISH, L.H. & ADANG, M.J. A Mixture of *Manduca sexta* Aminopeptidase and Phosphatase Enhances *Bacillus thuringiensis* Insecticidal CryIA(c) Toxin Binding and  $6Rb^+-KE^+$  flux *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13): 10088-10092, 1994.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. & DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 775-806, 1998.

SEMENZA, G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annual Reviews of Cell Biology*, 2:255–313, 1986.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z. & ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Reviews in Entomology*, 47:845-881, 2002.

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(2): 243-247, 2001.

SIMS, S.R. *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki [CryIA(c)] protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist*, 20(4):493-500, 1995.

SIQUEIRA, H.A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; FLANNAGAN, R. & SIEGFRIED, B.D. Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8):5318-24, 2006.

SIVAKUMAR, S.; RAJAGOPAL, R.; VENKATESH, G.R.; SRIVASTAVA, A. & BHATNAGAR, R.K. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10):7312-7319, 2007.

SLEPECKY, R.A. & LEADBETTER, E.R. on the prevalence and roles of sporeforming bacteria and their spores in nature. In: Hurst, A. & Gould, G.W. *The bacterial spore*. Vol. 2, Londres: Academic Press. p. 79-99, 1983.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B.E. & BRAVO, A. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. *Science*, 318: 1640-1642, 2007.

SPOONER, R.A.; HART, P.J.; COOK, J.P; PIETRONI, P.; ROGON, C.; HÖHFELD, J.; ROBERTS, L.M. & LORD, J.M. Cytosolic chaperones influence the fate of a toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45): 17408–17413, 2008.

SÜSS, C. & SOLIMENA, M. Proteomic profiling of beta-cells using a classical approach - two-dimensional gel electrophoresis. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 116(1): 13-20, 2008.

TABASHNIK, B.E. Breaking the code of resistance. *Nature Biotechnology*, 19: 922-924, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22): 4673-4680, 1994.

UMATA, T.; MORIYAMA, Y.; FUTAI, M. & MEKADA, E. The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(35):21940-5, 1990.

VAN RIE, J.; McGAUGHEY, D.E.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D. & MELLAERT, H.V. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247: 72-74, 1990.

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

WEI, J.Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S.C. & AROIAN, R.V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5): 2760–2765, 2003.

WHITELEY, H.R. & SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40: 549-576, 1986.

WIECZOREK, H., GRUBER, G., HARVEY, W.R., HUSS, M. & MERZENDORFER, H. The plasma membrane H<sup>+</sup>-V-ATPase from tobacco hornworm midgut. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31: 67–74, 1999.

WOLFERSBERGER, M. G. V-ATPase-ENERGIZED EPITHELIA AND BIOLOGICAL INSECT CONTROL. *Journal of experimental Biology*, 172: 377-386, 1992.

WOLFERSBERGER, M. G.; LUTHY, P.; MAURE, A.; P. PARETI, P.; SACCHI, F.V.; GIORDANA, B. & HANOZET, G.M. Preparation and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86:301–308, 1987.

WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y. & ZHAO, J.Z. Suppression of Cotton Bollworm in Multiple Crops in China in Areas with Bt Toxin-Containing Cotton. *Science*, 321(5896): 1676-1678, 2008.

YAOI, K.; KADOTANI, T.; KUWANA, H.; SHINKAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IWAHANA, H. & SATO, R. Aminopeptidase N from Bombyx Mori as a Candidate for the Receptor of Bacillus Thuringiensis Cry1Aa Toxin. *European Journal of Biochemistry*, 246(3): 652 – 657, 2004.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R. & BULLA, Jr., L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9897–9902, 2006.

ZHANG, X.; GRIKO, N. B.; CORONA, S. K. & BULLA Jr., L. A. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R1 induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 149 (4): 581–588, 2008.

## ***CURRICULUM VITÆ***

**NAKASU, E.Y.T.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Erich Yukio Tempel Nakasu

**Local e data de nascimento:** Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. 02/07/1984.

#### **Endereço profissional:**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia

PqEB-Final Av. W5 Norte

Asa Norte - BRASÍLIA

70770-900, DF - Brasil

**Telefone profissional:** 61 34484705

**E-mail:** [erichnakasu@cenargen.embrapa.br](mailto:erichnakasu@cenargen.embrapa.br); [erichtempel@gmail.com](mailto:erichtempel@gmail.com)

### **2. FORMAÇÃO:**

Graduação em Biologia/Bacharelado.

Centro Universitário de Brasília, UniCEUB, Brasil, 2002-2006

### **3. ESTÁGIOS:**

#### **EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia**

**2003 – 2005** - Vínculo: livre, Enquadramento funcional: Bolsista de iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Informações: Estágio junto ao Laboratório de Genética Vegetal na EMBRAPA - Cenargen, sob orientação da Dra. Ana Yamaguishi Ciampi. Trabalho com marcadores moleculares (RAPD e SSR) na caracterização de espécies arbóreas



brasileiras em perigo de extinção (*Cedrela fissilis*, *Amburana cearensis*).

**2005 – 2006** - Vínculo: livre, Enquadramento funcional: bolsista de iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Informações: Estágio junto à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, com bolsa PIBIC – CNPq, sob orientação da Dra. Carmen Pires e co-orientação da Dra. Eliana M.V. Fontes e Dra. Simoni C. Dias. Projeto de avaliação de segurança ambiental do algodoeiro geneticamente modificado à resistência a insetos.

#### **Universidade Federal do Pará – UFPA**

**2005 – 2005** - Vínculo: livre, Enquadramento funcional: estágio voluntário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Informações: estágio junto à UFPA, sob orientação do Dr. Fernando Abrunhosa. Trabalho com ecologia do caranguejo *Armases benedicti*.

#### **Centro Universitário de Brasília - UniCEUB**

**2006 - 2006** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: monitoria, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Informações: Monitor concursado com bolsa para as matérias Bioquímica, Química Geral e Química Orgânica, dos cursos de Biologia e Biomedicina.

#### **4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

**2003** Melhor trabalho em Biotecnologia, 2o Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.

#### **5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

##### **Faculdades Alvorada de Brasília**

**2008 – 2008** Vínculo: livre, Enquadramento funcional: Professor Convidado, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Informações: professor convidado para as disciplinas de Patologia Geral, Farmacologia Geral, Farmacologia Aplicada à Nutrição e Farmacologia Aplicada à Enfermagem.

## 6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. SUJII, E.; TOGNI, P. H. B.; **NAKASU, E. Y. T.**; PIRES, C.; PAULA, D. P. & FONTES, E. Impacto do algodoeiro Bt na dinâmica populacional do pulgão-do-algodoeiro em casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1251 - 1256, 2008.

2. PEREIRA, R. D; VALENCIA-JIMENEZ, A.; MAGALHAES, C. P.; PRATES, M. V.; MELO, J. A.; LIMA, L. M.; SALES, M. P.; **NAKASU, E. Y. T.**; SILVA, M. C. & GROSSI-DE-SA, M. F. Effect of a Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* Gut Proteinases In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10714 - 10719, 2007.

3. GROSSI-DE-SA, M. F.; MAGALHAES, M. Q.; SILVA, M. S.; MARGARETH., S.; DIAS, S. C.; **NAKASU, E. Y. T.**; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; SAMPAIO, R.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z.; SIQUEIRA, H. A. A. & FIGUEIRA, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 773 - 782, 2007.

4. TOGNI, P. H. B.; MEDEIROS, M. A.; ERDMANN, M.; CAVALCANTE, K. R.; **NAKASU, E. Y. T.**; PIRES, C. & SUJII, E. Dinâmica populacional da mosca branca, *Bemisia tabaci* GENNADIUS, 1889 (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE), em tomate plantado sob sistema de cultivo orgânico e convencional. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília:Embrapa, 2007. (Outra produção bibliográfica)

5. CARDOSO, C. F.; SILVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, G.; CAVECHIA, L.; ALMEIDA, J. P.; **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; FONTES, E. & PIRES, C. Principais polinizadores de *Gossypium hirsutum latifolium* cv. Delta Opal (Malvaceae), em uma localidade do Distrito Federal, Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília, 2007. (Outra produção bibliográfica)

6. LIMA, L. M.; LARA, M. S.; CAMPOS, L.; **NAKASU, E. Y. T.**; DIAS, S. C.; BROD, C.; SUJII, E. & FONTES, E. Protocolo para avaliação dos efeitos de proteínas tóxicas a insetos-praga sobre a abelha sem ferrão *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília, 2007. (Outra produção bibliográfica)

7. SUJII, E.; TOGNI, P. H. B.; **NAKASU, E. Y. T.**; RIBEIRO, P. H.; BESERRA, V.A; MACEDO, T. R.; PIRES, C. & FONTES, E. Metodologia para avaliação do efeito da inserção de transgenes em plantas na bionomia de insetos herbívoros não-alvo: efeito de algodão Bt em *Aphis gossypii*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília:Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Outra produção bibliográfica)

8. **NAKASU, E. Y. T.**; DIAS, S. C.; PIRES, C.; TOGNI, P. H. B.; AYRES, K. F.; SILVA, I. S.; MACEDO, T. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SUJII, E. & FONTES, E.

Protocolo Para Avaliação Dos Efeitos De Proteínas Tóxicas A Insetos-Praga Sobre O Predador *Cycloneda sanguinea* (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília - DF: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Outra produção bibliográfica)

9. PIRES, C.; SILVEIRA, F. A.; CARDOSO, C. F.; OLIVEIRA, G.; PEREIRA, F. F.; SOUZA, V. V.; **NAKASU, E. Y. T.**; PAES, J. S. O.; TELES, E.; SILVIE, P.; OLIVEIRA, J. E.; BARROSO, P. A. V.; SUJII, E. & FONTES, E. VISITANTES FLORAIS EM ESPÉCIES CULTIVADAS EM ESPÉCIES CULTIVADAS E NÃO CULTIVADAS DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum*), EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. publicação Série Embrapa, 2006. (Outra produção bibliográfica)

## 7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. SUJII, E.; FONTES, E.; **NAKASU, E. Y. T.**; PAULA, D. P.; PIRES, C. & TOGNI, P. H. B. Assessing Risk of GM Crop Expressing CryToxin to Non-Target Herbivores: Evaluation of Aphids on Cotton. In: 10th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, 2008, Wellington. *Anais do 10th*

*International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, Wellington, 2008.

2. PAULA, D. P.; MAGALHÃES, M.T.; **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; PIRES, C. & FONTES, E. Assessment of the effects of Cry1Ac toxin to the butterfly *Chlosyne lacinia*. In: 10th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, 2008, Wellington. *Anais do 10th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, Wellington, 2008.

3. FERREIRA, V. A.; GURGEL, G. A.; ARAUJO, M. S.; **NAKASU, E. Y. T.**; TOGNI, P. H. B.; FARIA, R. G. & WERNECK, F. P. Diversidade de anfíbios em uma reserva particular do patrimônio natural na região do entorno do Distrito Federal In: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, Curitiba, 2008.

4. FERREIRA, V. A.; GURGEL, G. A.; **NAKASU, E. Y. T.**; ARAUJO, M. S.; FARIA, R. G. & WERNECK, F. P. Efficiency of sampling and amphibian diversity on a Brazilian Cerrado Area In: 6th. *World Congress of Herpetology*, Manaus, 2008.

5. FONTES, E.; DIAS, S. C.; SUJII, E.; MACEDO, T. R.; AYRES, K. F.; SILVA-SANTOS, P. V.; **NAKASU, E. Y. T.**; GROSSI-DE-SA, M. F.; PAULA, D. P. & PIRES, C. Methods for assessing risks of GM crops to natural enemies: selection of priority species and experiments to test risk hypothesis. *10th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, Wellington, 2008.

6. GURGEL, G. A.; FARIA, R. G.; FERREIRA, V. A.; ARAUJO, M. S. & **NAKASU, E. Y. T.** Aspectos ecológicos de *Barycholos ternetzi* (Anura:Leptodactylidae) em uma área de Cerrado do Brasil central. In: III congresso Brasileiro de Herpetologia, Belém do Pará, 2007.

7. GURGEL, G. A.; FARIA, R. G.; FERREIRA, V. A.; **NAKASU, E. Y. T.** & ARAUJO, M. S. Dieta de *Barycholos ternetzi* (Anura: Leptodactylidae) em uma área de Cerrado do Brasil Central. In: III Congresso Brasileiro de Herpetologia, Belém do Pará, 2007.

8. TOGNI, P. H. B.; ERDMANN, M.; CAVALCANTE, K. R.; FERREIRA, V. A.; **NAKASU, E. Y. T.**; FRIZZAS, M. R.; MEDEIROS, M. A. & SUJII, E. EFEITO DA ASSOCIAÇÃO TOMATE-COENTRO NO CONTROLE BIOLÓGICO NATURAL DE *Bemisia tabaci* EM SISTEMAS DE CULTIVO ORGÂNICO E CONVENCIONAL In: *X Simpósio de Controle Biológico - SICONBIOL*, Brasília, 2007.

9. LIMA, M. A. A.; CAMPOS, L.; **NAKASU, E. Y. T.**; DIAS, S. C.; FONTES, E.; SUJII, E. & PIRES, C. Metodologia para análise de risco de algodão transgênico resistente a insetos-praga sobre abelhas silvestres In: *V Congresso Brasileiro de Biossegurança - V Simpósio Latino-Americano de Produtos Transgênicos*, Ouro Preto – MG, 2007.

10. SUJII, E.; TOGNI, P. H. B.; **NAKASU, E. Y. T.**; RIBEIRO, P. H.; BESERRA, V.A.; MACEDO, T. R.; PIRES, C. & FONTES, E. BIONOMIA COMPARADA DO PULGÃO DO ALGODOEIRO *Aphis gossypii* CRIADO EM ALGODOEIRO BT E NÃO-BT In: *VI Congresso Brasileiro de Algodão*, 2007, Uberlândia, 2007.

11. TOGNI, P. H. B.; SUJII, E.; MEDEIROS, M. A.; FRIZZAS, M. R.; ERDMANN, M.; CAVALCANTE, K. R. & **NAKASU, E. Y. T.** Dinâmica populacional de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomate associado com coentro sob manejo orgânico e convencional In: *VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu – MG, 2007.

12. **NAKASU, E. Y. T.**; FIRMINO, A. A. P.; DIAS, S. C. & GROSSI-DE-SA, M. F.

Estratégias para identificação e caracterização de receptores do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) para toxinas Cry In: *II Workshop Interação Molecular Planta-Praga*, Brasília, 2007.

13. CARDOSO, C. F.; SILVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, G.; **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; FONTES, E. & PIRES, C. ASPECTOS DA BIOLOGIA FLORAL DE *Gossypium hirsutum latifolium* (MALVACEAE) In: *VII Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, 2006.

14. TOGNI, P. H. B.; **NAKASU, E. Y. T.**; MACEDO, T. R.; SANTOS, P. H. R.; BESERRA, V.A.; FONTES, E.; PIRES, C. & SUJII, E. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALGODÃO Bt NA BIONOMIA DE *Aphis gossypii* GLOVER (HEMIPTERA: APHIDIDAE) [Evaluation of Bt Cotton Effect on the Bionomy of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae)] In: *XI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA*, Brasília, 2006.

15. TOGNI, P. H. B.; ERDMANN, M.; CAVALCANTE, K. R.; **NAKASU, E. Y. T.**; MEDEIROS, M. A. & SUJII, E. DINÂMICA POPULACIONAL DE *Bemisia tabaci* (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) EM CULTIVO DE TOMATE ORGÂNICO E CONVENCIONAL [Population dynamics of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in organic and conventional tomato crop] In: *XI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA*, Brasília, 2006.

16. **NAKASU, E. Y. T.**; TOGNI, P. H. B.; MACEDO, T. R.; AYRES, K. F.; SILVA, I. S.; DIAS, S. C.; SUJII, E.; PIRES, C.; SA, M. F. G. & FONTES, E. EFEITOS DA TOXINA Cry1Ac SOBRE *Cycloneda sanguinea* (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) ALIMENTADA COM *Aphis gossypii* (HEMIPTERA: APHIDIDAE) [Effects of Cry1Ac toxin on *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) fed with *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)] In: *XI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA*, Brasília, 2006.

17. OLIVEIRA, G.; CARDOSO, C. F.; **NAKASU, E. Y. T.**; VIANNA, P. A.; RODRIGUES, S.; MIRANDA, J.; SUJII, E.; FONTES, E.; SILVEIRA, F. A. & PIRES, C. FAUNA DE ABELHAS EM ESPÉCIES CULTIVADAS E NÃO CULTIVADAS DE ALGODOEIRO *GOSSYPIUM* SPP., EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL In: *XXI Congresso Nacional de Entomologia*, Recife, 2006.

18. **NAKASU, E. Y. T.**; DIAS, S. C.; TOGNI, P. H. B.; MACEDO, T. R.; AYRES, K. F.; SILVA, I. S.; JUAREZ, C. M. J.; SUJII, E.; PIRES, C.; SA, M. F. G. & FONTES, E. PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS SOBRE O PREDADOR *Cycloneda sanguinea* (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) In: *XXI Congresso Brasileiro de Entomologia*, Recife, 2006.

19. CARDOSO, C. F.; OLIVEIRA, G., **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; FONTES, E.; SILVEIRA, F. A. & PIRES, C. QUE ABELHAS CARREIAM O PÓLEN DO ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum latifolium* - MALVACEAE)? In: *VII Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, 2006.

20. CARDOSO, C. F.; OLIVEIRA, G.; **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; FONTES, E.; SILVEIRA, F. A. & PIRES, C. Abelhas carreadoras de pólen do algodão, *Gossypium hirsutum*: análise preliminar (Bees carrying cotton pollen, *Gossypium hirsutum*: preliminary analysis) In: *X Encontro Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2005.

21. **NAKASU, E. Y. T.** & CIAMPI, A. Y. APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *Amburana cearensis* e *Cedrella fissilis* NA DEFINIÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO In: *X Encontro Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2005.

22. CARDOSO, C. F.; SILVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, G.; **NAKASU, E. Y. T.**; SUJII, E.; FONTES, E. & PIRES, C. Biologia floral de *Gossypium hirsutum latifolium* (Malvaceae) (Floral biology of *Gossypium hirsutum latifolium* (Malvaceae)) In: *X Encontro Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2005.

23. CIAMPI, A. Y.; VIEIRA, D.L.M.; **NAKASU, E. Y. T.**; MACHADO, F. R.; SALOMÃO, A.N.S.; ANDERSON, C. & SCARIOT, A. Conservation strategies of endangered tree species in central Brazil In: *19 th Annual Meeting of the Society for Conservation Biology*, Brasília, 2005.

24. OLIVEIRA, G.; CARDOSO, C. F.; **NAKASU, E. Y. T.**; SCOMPARINI, A.L.; SANTOS, J.B.; MIRANDA, J.; SUJII, E.; FONTES, E.; SILVEIRA, F. A. & PIRES, C. Visitantes Florais do Algodão, *Gossypium hirsutum*, em diferentes regiões de produção do Brasil (Flower visitors of cotton, *Gossypium hirsutum*, in different production areas of Brazil) In: *X Encontro Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2005.

25. **NAKASU, E. Y. T.**; CATELAN, R. C. & CIAMPI, A. Y. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE NA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Amburana cearensis*. In: *IX Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia*, Brasília, 2004.

26. **NAKASU, E. Y. T.** & CIAMPI, A. Y. ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA E TAXA DE CRUZAMENTO DE *Cedrella fissilis* – CEDRO (MELIACEAE) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES (GENETIC STRUCTURE ANALYSIS AND OUTCROSSING RATE OF CEDRELA FISSILIS BASED ON MICROSATELLITES MARKERS) In: *VIII Encontro do Talento Estudantil da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 2003.

27. **NAKASU, E. Y. T.**; CATELAN, R. C.; MACHADO, F. R.; ALMEIDA, T. N. S., & CIAMPI, A. Y. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CEREJEIRA *Amburana cearensis*. In: *49º Congresso Nacional de Genética*, 2003.

28. CATELAN, R. C.; **NAKASU, E. Y. T.**; VIEIRA, D.L.M.; CIAMPI, A. Y. & SCARIOT, A. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE CEREJEIRA *Amburana cearensis* UTILIZANDO MARCADOR MOLECULAR RAPD ( Analisis of the genetic variability of cerejeira *Amburana cearensis* using RAPD molecular marker) In: *VIII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia*, Brasília, 2003.

29. MACHADO, F. R.; **NAKASU, E. Y. T.**; ALMEIDA, T. N. S. & CIAMPI, A. Y. Estrutura Genética e Sistema Reprodutivo de *Cedrella fissilis*- Cedro (MELIACEAE) utilizando Marcadores Microssatélites. In: *2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*, Porto Seguro – Bahia, 2003.



**ANEXO (Artigos publicados e submetidos no período)**

## Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a CryIIa-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain

Maria Fatima Grossi-de-Sa<sup>1,4,\*</sup>, Mariana Quezado de Magalhães<sup>1,2</sup>, Marília Santos Silva<sup>3</sup>, Shirley Margareth Buffon Silva<sup>1</sup>, Simoni Campos Dias<sup>1,4</sup>, Erich Yukio Tempel Nakasu<sup>2</sup>, Patricia Sanglard Felipe Brunetta<sup>1,4</sup>, Gustavo Ramos Oliveira<sup>2</sup>, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto<sup>1,4,5</sup>, Raquel Sampaio de Oliveira<sup>1,4</sup>, Luis Henrique Barros Soares<sup>2</sup>, Marco Antônio Zachia Ayub<sup>2</sup>, Herbert Alvaro Abreu Siqueira<sup>1</sup> and Edson L.Z. Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5, Brasília - DF, Brazil

<sup>2</sup>UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil

<sup>3</sup>Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, P. O. Box 08223, Planaltina - DF, Brazil

<sup>4</sup>Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília - DF, Brazil

<sup>5</sup>UNIEURO, Brasília - DF, Brazil

Received 30 January 2007, Accepted 7 May 2007

Different isolates of the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* produce multiple crystal (Cry) proteins toxic to a variety of insects, nematodes and protozoans. These insecticidal Cry toxins are known to be active against specific insect orders, being harmless to mammals, birds, amphibians, and reptiles. Due to these characteristics, genes encoding several Cry toxins have been engineered in order to be expressed by a variety of crop plants to control insect-pests. The cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, are the major economically devastating pests of cotton crop in Brazil, causing severe losses, mainly due to their endophytic habit, which results in damages to the cotton boll and floral bud structures. A cryIIa-type gene, designated cryIIa12, was isolated and cloned from the *Bt* S811 strain. Nucleotide sequencing of the cryIIa12 gene revealed an open reading frame of 2160 bp, encoding a protein of 719 amino acid residues in length, with a predicted molecular mass of 81 kDa. The amino acid sequence of CryIIa12 is 99% identical to the known CryIIa proteins and differs from them only in one or two amino acid residues positioned along the three domains involved in the insecticidal activity of the toxin. The recombinant CryIIa12 protein, corresponding to the cryIIa12 gene expressed in *Escherichia coli* cells, showed moderate toxicity towards first instar larvae of both cotton boll weevil and fall armyworm. The highest concentration of the recombinant CryIIa12 tested to

achieve the maximum toxicities against cotton boll weevil larvae and fall armyworm larvae were 230 µg/mL and 5 µg/mL, respectively. The herein demonstrated insecticidal activity of the recombinant CryIIa12 toxin against cotton boll weevil and fall armyworm larvae opens promising perspectives for the genetic engineering of cotton crop resistant to both these devastating pests in Brazil.

**Keywords:** *Anthonomus grandis*, *Bt* toxin, Coleoptera, Cotton, CryIIa, *E. coli* expression, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*

### Introduction

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a well-known entomopathogen, is a Gram-positive spore-forming bacterium, which forms parasporal crystal (Cry) protein inclusions during the stationary growth phase (Bravo *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). These crystal inclusions are produced by one or more insecticidal proteins, which can exhibit toxicity and specificity toward a select group of Lepidopteran, Coleopteran and Dipteran insect species. The crystals are solubilized by the alkaline conditions existing in the midgut lumen of susceptible insect larvae, releasing Cry protoxins, which are enzymatically processed and converted into active Cry toxins (de Maagd *et al.*, 2003). After activation the toxins interact with specific cell surface docking molecules and destroy the brush border membrane integrity by pore formation. These pores disrupt the osmotic regulation of the insect intestinal epithelium resulting in cell

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 55-61-3448-4705; Fax: 55-61-3340-3624  
E-mail: fatimasa@cenargen.embrapa.br

## Effect of a Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* Gut Proteinases In Vitro

RAILENE DE AZEVEDO PEREIRA,<sup>†,‡</sup> ARNUBIO VALENCIA-JIMÉNEZ,<sup>†,‡,§</sup>  
 CLÁUDIO PICAÑO MAGALHÃES,<sup>†</sup> MAURA VIANNA PRATES,<sup>†</sup>  
 JORGE ALEX TAQUITA MELO,<sup>†</sup> LIZIANE MARIA DE LIMA,<sup>△</sup> MAURÍCIO PEREIRA DE SALES,<sup>⊥</sup> ERICH YUKIO TEMPEL NAKASU,<sup>†,#</sup> MARIA CRISTINA MATTAR DA SILVA,<sup>†</sup>  
 AND MARIA FÁTIMA GROSSI-DE-SÁ<sup>\*,†,▽</sup>

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, W5 Norte Final, Brasília - DF, 70770-900, Brazil, Department de Biología Celular, Universidade de Brasília, Brasília - DF, 70910-900, Brazil, Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Calle 65#26-10, Manizales, Colombia, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brazil, 58107-720, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova, Natal, RN, 59072-970, Brazil, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, and Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), is an important devastating coffee pest worldwide. Both trypsin and chymotrypsin enzyme activities from *H. hampei* larval midgut can be inactivated by proteinaceous enzyme-inhibitors. A serine proteinase inhibitor belonging to the Bowman-Birk class was purified from a wild accession of *Phaseolus coccineus* L. seeds. The inhibitor (PcBBI1) is a cysteine-rich protein that is heat-stable at alkaline pH. MALDI-TOF/MS analysis showed that PcBBI1 occurs in seeds as a monomer (8689 Da) or dimer (17 378 Da). Using in vitro inhibition assays, it was found that PcBBI1 has a high inhibitory activity against *H. hampei* trypsin-like enzymes, bovine pancreatic chymotrypsin, and trypsin. According to this, PcBBI1 could be a promising tool to make genetically modified coffee with resistance to coffee berry borer.

**KEYWORDS:** Bowman-Birk inhibitor; *Hypothenemus hampei*; *Phaseolus coccineus*; Proteinase inhibitor

### INTRODUCTION

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari), is widely considered to be the most devastating pest of coffee crops worldwide (1). Both larvae and adults can penetrate the fruit berries to feed on and reproduce in the endosperm, thereby causing a severe reduction in the yield and quality of the final product (2). Attack by this insect also creates new sites for secondary infection by bacteria and fungi (3). On the basis of the feeding behavior of larval and female CBB, different control measures, including biological control and biotechnological strategies, have been used as an alternative to environmentally hazardous chemical insecticides (4). Proteinase inhibitors (PI) are potential defense molecules against insect pests

in crop plants (5–7), and the introduction of PI genes into economically important crop plants has become a promising alternative for controlling such pests (8, 9). The report by Valencia et al. (10) on the trypsin and chymotrypsin activities of the *H. hampei* larval gut provides new perspectives for the use of PI genes to produce transgenic coffee plants resistant to CBB.

Proteinase inhibitors of the Bowman-Birk class (BBI), a major class in legume seeds, contain two active sites that are primarily associated with the inhibition of the digestive enzymes trypsin and chymotrypsin (11). In recent years, BBIs have received enormous attention because of their vital role in the defense mechanisms of plants against insect pests, especially during germination and initial seedling growth. Several roles for PIs have been suggested in plants, including the natural regulation of proteolysis, a key metabolic process that requires tight control (12).

Plant proteinase inhibitors have been widely studied, and their deleterious effects on Lepidoptera and Coleoptera (13, 14) makes them attractive agents for the biological control of insect pests (15, 16). Studies using transgenic plants containing PI genes have shown that cowpea BBI confers enhanced resistance

\* Corresponding author. Phone: +55 61 3448 4705, fax: +55 61 3340 3658, e-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br.

<sup>†</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>‡</sup> Universidade de Brasília.

<sup>§</sup> Universidad de Caldas.

<sup>△</sup> Embrapa Algodão, Campina Grande.

<sup>⊥</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

<sup>#</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>▽</sup> Universidade Católica de Brasília.

## Impacto do algodoeiro Bt na dinâmica populacional do pulgão-do-algodoeiro em casa de vegetação

Edison Ryoiti Sujii<sup>(1)</sup>, Pedro Henrique Brun Togni<sup>(2)</sup>, Erich Yukio Tempel Nakasu<sup>(1)</sup>, Carmen Silvia Soares Pires<sup>(1)</sup>, Débora Pires de Paula<sup>(1)</sup> e Eliana Maria Gouveia Fontes<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 01372, CEP 70849-970 Brasília, DF. E-mail: sujii@cenargen.embrapa.br, erichnakasu@cenargen.embrapa.br, cpirez@cenargen.embrapa.br, debora@cenargen.embrapa.br, eliana@cenargen.embrapa.br  
<sup>(2)</sup>Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Caixa Postal 04457, CEP 70919-970 Brasília, DF. E-mail: pedrohbtogni@yahoo.com.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo experimental para avaliar o impacto do algodoeiro Bt na bionomia e na escolha de plantas para colonização pelo pulgão-do-algodoeiro (*Aphis gossypii*). A bionomia do pulgão foi avaliada em casa de vegetação com insetos criados em gaiolas individuais com plantas de algodão Bt, da variedade DP 404 BG (Bollgard), ou sua isolinha não transformada DP 4049. Gaiolas contendo vasos com plantas de algodoeiro Bt e não-Bt foram usadas como arena de escolha, para a avaliação de preferência de adultos alados. O período pré-reprodutivo e reprodutivo, a longevidade, a curva de sobrevivência, a produção de prole total e diária por fêmea e a curva acumulada de produção de prole da população não apresentaram diferenças significativas. Não foi observada diferença na escolha de plantas para colonização por indivíduos alados, o que indica taxas equivalentes de colonização nas populações iniciais. O algodoeiro Bt não afeta a dinâmica populacional de *A. gossypii* e não aumenta seu potencial de risco como praga.

**Termos para indexação:** *Aphis gossypii*, biossegurança, organismo geneticamente modificado, praga não-alvo, toxina Cry.

### Impact of Bt cotton on the population dynamics of the cotton aphid in greenhouse

**Abstract** – The objective of this work was to develop an experimental protocol to assess the impact of Bt cotton on bionomics and on plant choice for *Aphis gossypii* colonization. The bionomics of the cotton aphid was assessed in greenhouse with insects reared in individual cages containing Bt cotton plants of the variety DP 404 BG (Bollgard) or its nontransformed isolate DP 4049. Cages with Bt cotton and non-Bt cotton were used as choosing arena for evaluation of winged adults preference. There was no significant difference for pre-reproduction period (immature phase), reproduction period, longevity, survivorship curve total and daily production of offspring by female, and curve of accumulated production of offspring by the population. There was no preference of colonization for any plant by winged adults, which indicates equivalent rates of colonization of the initial populations. Bt cotton plants do not affect the population dynamics of *A. gossypii*, and do not increase its potential risk as pest.

**Index terms:** *Aphis gossypii*, biosafety, genetic modified organism, nontarget pest, Cry toxin.

### Introdução

O pulgão-do-algodoeiro – *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) – é uma das principais pragas do algodoeiro em razão dos danos diretos, causados pela sucção do floema, e indiretos pela transmissão de viroses. Além disso, uma substância açucarada (“honeydew”), exsudada pelo pulgão, favorece a ocorrência de fungos (fumagina) que prejudicam a qualidade das fibras do algodoeiro na fase final de seu ciclo (Fontes et al., 2006).

Essa praga coloniza o algodoeiro desde a fase de plântula e se reproduz de forma rápida e abundante por partenogênese telítica e seu desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade são afetados por fatores externos, como temperatura e alimentação (Xia et al., 1999; Liu et al., 2005). Essas características permitem que o afídeo produza várias gerações e altas densidades populacionais a cada safra, o que favorece a rápida seleção de indivíduos resistentes a fatores do ambiente restritivos ao seu crescimento populacional (Liu et al., 2005).

Comissão Editorial  
C. Postal 190  
70359-970, Brasília-DF

**horticultura**  
**brasileira**

Revista da  
Associação Brasileira de Horticultura

e-mail: hortbras@cnph.embrapa.br Fax: (61) 3556 5744, Tel.: (61) 3385-9088/3385-9049

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o trabalho HB1884-08 “**Dinâmica populacional de *bemisia tabaci* biótipo b em tomate monocultivo e consorciado com coentro sob cultivo orgânico e convencional**”, de autoria de Pedro H. B. Togni, Marina R. Frizzas, Maria A. de Medeiros, Erich Y.T. Nakasu, Carmem S.S. Pires e Edison R. Sujii; está em fase de tramitação na secretaria da revista Horticultura Brasileira.

O trabalho foi analisado por editores *ad hoc* e um Editor Científico e será avaliado pelo pelo Editor Associado para publicação.

Brasília, 27 de fevereiro de 2009

Comissão Editorial  
Revista Horticultura Brasileira  
C. Postal 190, 70.359-970 Brasília - DF  
Fone: 61 3385 9088, Fax: 61 3556 5744  
hortbras@cnph.embrapa.br  
CGC 00.349.563/0001-90