

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
AMINOPEPTIDASE (APNs) DE *Ostrinia nubilalis* HÜBER
1796 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Najara da Silva

Bióloga

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EXPRESSÃO DE
AMINOPEPTIDASE (APNs) DE *Ostrinia nubilalis* HÜBER
1796 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Najara da Silva

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAJARA DA SILVA – Nascida em São Paulo-SP, em 24 de março de 1981. Bióloga, graduada pela FIF (Faculdades Integradas de Fernandópolis), Fernandópolis-SP. Mestra em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Julio Mesquita filho - Faculdade de Agronomia e Veterinárias - Campus Jaboticabal. Doutora em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Julio Mesquita filho - Faculdade de Agronomia e Veterinárias - Campus Jaboticabal.

Confiança...

*“Não deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém...”*

Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo.

Quem acredita sempre alcança.”

(Renato Russo)

Aos meus pais

Oriete Máximo Pereira

Hostálio da Silva Pereira

Por serem a presença nos momentos de solidão, pelo respeito à minha maneira de ser... Eu não teria conseguido sem vocês! Este momento feliz também é seu... eu farei dele eterno, pois o carinho, o estímulo e o amor foram armas dessa vitória...Eu amo vocês!

DEDICO

Ao meu irmão Wallace,

À minha irmã Sandra Maria.

Às minhas sobrinhas

Tainara, Yasmin e Allana,

À minha cunhada Mônica.

Muito obrigada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por estar sempre ao meu lado, dando-me força quando pensei em fraquejar, por me acompanhar desde o início dessa longa caminhada, e a todos espíritos de luz por ter guiado meu caminho que me fez aprender que nunca devo parar de confiar .

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, orientador dessa tese, pelo seu apoio ao meu ingresso no Mestrado e no Doutorado, suas observações e sugestões que foram fundamentais para o meu aprendizado e também pela amizade de todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Baltasar Escriche, tutor espanhol, pela contribuição para a realização deste trabalho, dedicação e ensinamentos que contribuíram para o meu aperfeiçoamento, por ter me oferecido a oportunidade de fazer parte de sua equipe. Confiando no meu trabalho, permitiu que eu desse esse grande passo e pudesse crescer sob tantos outros aspectos.

À equipe de pesquisadores do Laboratório de Genética, Bioquímica e Biotecnologia – GenBqBt: Juan Ferré, Baltasar Escriche, Salva, Rosi , Maissa, Gloria, Patricia, Cristina, Nuria, Yolanda, Anabel, Maria, Leila, Agata... Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

À equipe de pesquisadores do Laboratório de Genética de Bactéria e Biotecnologia Aplicada – LGBBA, pela convivência e sugestões.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), que através do Projeto de Cooperação Internacional (Proc. CAPES/DGU 194/99) entre a Universidade de Valencia – Burjassot - ES e a Universidade Julio Mesquita Filho – UNESP/FCAV, proporcionou através do auxílio financeiro a realização do meu doutorado sanduíche.

À instituição UNESP-Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

À seção de pós-graduação, biblioteca, departamento de Biologia Aplicada, ao curso de pós-graduação em microbiologia e a toda a coordenação, pelo auxílio prestado.

A todos os funcionários que, direta ou indiretamente, cooperaram para o bom andamento do trabalho, principalmente àqueles que foram capazes de um gesto de compreensão e bondade, marcando de uma forma particular minha passagem por esta instituição.

"Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. (...) Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero o meu avesso. (...) Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta. (...) Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto, e velhos, para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou. Pois os vendo, loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril." - *Meus amigos: Oscar Wilde* - (...) Pensei que este momento nunca chegaria... Agradeço por estarem presentes, fazendo de momentos difíceis uma vitória! Joyce Margareth da Silva Fernandes, Renato Pariz Maluta (Chacal), Lívia Felipe (Bimba), Marina Viana de Alencar, Claudio Damasceno Pavani, Cristiane Giseli Vanti, Elisa Maria Pereira.

Aos professores da graduação e da pós-graduação, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Agradeço a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização des trabalho e também para minha boa estada em Jaboticabal nesse período.

Sonha e serás livre de espírito... luta e serás livre na vida.

(Che Guevara)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Fluxograma.....	14
3.2 Insetos.....	15
3.3 Triagem para fragmentos de sequencias de genes <i>apn</i>	15
3.4 Clonagem dos genes <i>apn5 apn6</i> de <i>O. nubilalis</i>	16
3.5 Clonagem e sequenciamento dos fragmentos gênicos pela estratégia de “primer walking”	17
3.6 Análise por bioinformática.....	19
3.7 Análise por qPCR - Expressão tecidual diferencial.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Construção dos genes das aminopeptidases.....	22
4.2 Agrupamento e nomenclatura das aminopeptidases.....	24
4.3 Motivos característicos de aminopeptidase.....	27
4.4 Maior expressão da aminopeptidase APN 7.....	29
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	34

Resumo - Aminopeptidases N (APNs) são uma classe de ectoenzimas presentes no intestino médio das larvas de lepidópteros, que participa no cenário do modo de ação das toxinas *Bacillus thuringiensis* (Bt). No presente trabalho, duas aminopeptidases (OnAPN5 e OnAPN6) foram clonadas a partir células do intestino de *Ostrinia nubilalis*, lepidópteros praga do milho dos climas temperados. As duas sequências foram identificadas como APNs pela presença dos motivos HEXXH18(X)E e GAMEM, bem como o peptídeo sinal. As mesmas se agruparam corretamente quando analisadas com outras sequências de aminopeptidase em uma árvore filogenética. Pode-se verificar a expressão em tempo real em diferentes tecidos (intestinal, adiposo e tegumento) da APN5 e APN6 e também de uma terceira aminopeptidase APN7 analisada nesta etapa do trabalho, onde APN7 apresentou expressão de 7,5 vezes mais no tegumento quando comparado com o intestino e de 4,9 vezes mais no tecido adiposo quando comparado com o intestino enquanto que a APN5 e APN6 apresentaram expressão relevante apenas no tecido do intestino. Estas identificações de APNs irão facilitar estudos para caracterizar interações de ligação com as toxinas Bt, proporcionando uma forma de compreender e evitar o desenvolvimento da resistência às proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Estas informações são fundamentais para a elaboração de estratégias adequadas para o manejo da resistência de pragas e seu efetivo controle.

Palavras-chave adicionais: intestino, lepidópteros, “primer walking”, sequenciamento, PCR-RACE.

Abstract – Aminopeptidases N (APNs) are a class of ectoenzymes present in the midgut of lepidopteran larvae, which participates in setting the mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin (Bt). In this work, two aminopeptidases (OnAPN5 and OnAPN6) were cloned from cells of the intestine *Ostrinia nubilalis*, Lepidoptera pests of temperate maize. The two sequences were identified as APNs for the presence of motifs HEXXH18 (X) and E GAMEM as well as the signal peptide. The same when analyzed correctly grouped with other aminopeptidase sequences in a tree fenogenética, can check in real time the expression in different tissues (gut, adipose tissue and carcass) from APN5 and APN6 and also a third aminopeptidase analyzed in this step APN7 work, where APN7 showed expression of 7.5 times the carcass when compared with the intestine and 4.9 times in adipose tissue when compared with the intestine while APN5 and APN6 relevant only showed expression in tissue of the intestine. These IDs APNs will facilitate studies to characterize binding interactions with Bt toxins, providing a way to understand and prevent the development of resistance to Cry proteins of *B. thuringiensis*. This information is fundamental to the development of appropriate strategies for managing pest resistance and its effective control.

Additional Keywords: intestine, Lepidoptera, primer walking, sequencing, PCR-RACE.

1. INTRODUÇÃO

O controle de insetos, sejam eles nocivos à agricultura ou vetores de doenças, é feito hoje, em sua maioria, por produtos químicos visando simplesmente à aniquilação das pragas, sem considerar o desenvolvimento de estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP) ou outras que visem a diminuir o impacto causado pelos inseticidas convencionais.

O uso desses inseticidas vem causando danos ao homem e ao meio ambiente, como poluição do meio, intoxicação humana, aumento dos custos de produção, atingindo inimigos naturais, contaminando alimentos, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes aos pesticidas. O MIP ou estratégias semelhantes que tenham o objetivo comum de manejar as pragas baseiam-se na integração de várias táticas de controle com objetivo de manter a população da praga abaixo do nível de dano econômico ou insuficiente para causar epidemias. A adoção dessa premissa permite a obtenção de produtos com baixo nível de resíduos e preserva o meio, e permite a realização do controle biológico com a atuação dos inimigos naturais (parasitóides, predadores e entomopatógenos) como agentes do controle de pragas.

Atualmente, o mercado mundial de bioinseticidas não chega a representar 5% do mercado de pesticidas. No entanto, a utilização desses produtos vem apresentando um crescimento anual 10 vezes maior quando comparado aos produtos químicos. Os produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* representam mais de 80% dos bioinseticidas e são usados especialmente em países como os Estados Unidos, aonde sua comercialização chega a superar a dos inseticidas químicos.

O sucesso dessa bactéria na diversidade de produtos para o controle biológico deve-se em grande parte ao fato de sua característica tóxica ser determinada por proteínas produzidas durante a esporulação, sendo ativas contra pragas de diversas culturas, como a soja, algodão, gramíneas (pastagens, milho, cana, arroz), crucíferas (couve, couve-flor, repolho, brócolis), tomate, fumo, mandioca, café, eucalipto, alfafa, citros, maracujá, seringueira, abacaxi, amendoim, coqueiros, cucurbitáceas (abóbora, pepino, melão, melancia). Essas toxinas são

codificadas por diferentes genes, sendo que toxinas específicas agem em diferentes organismos, esta característica apresentada por essas toxinas facilita muito a manipulação destes genes em processos biotecnológicos.

O crescente uso da proteína cristal e a não toxicidade a mamíferos têm levado a uma intensificada pesquisa de novas linhagens com diferentes espectros de ação. Além disso, o interesse de encontrar novas linhagens tem-se mostrado grande devido à preocupação com o manejo preventivo de resistência desses alvos às δ -endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis* e também buscando-se caracterizar melhor o modo de ação dessas proteínas.

Considerando a importância de melhor compreender o mecanismo de ação e prevenção de resistência de insetos às proteínas produzidas pela bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* mencionada como uma alternativa viável com grande potencial para programas de controle biológico de pragas como *Ostrinia nubilalis* (HÜBER 1976) (Lepidoptera: Crambidae).

Esse inseto, conhecido também como broca do milho europeia, constitui uma das pragas mais importantes do milho na Europa e nos Estados Unidos apresenta alto poder de devastação na planta do milho alimentando-se desta cultura em todo período larval, impossibilitando sua comercialização e consumo.

Devido à escassez de estudos sobre as enzimas digestivas deste inseto, este trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente os genes das amimopeptidases (APNs) *apn5* e *apn6*, verificar a expressão das APN5, APN6 e APN7 em diferentes tecidos larvais de quinto instar, visando assim elucidar melhor o comportamento e expressão das enzimas digestivas APNs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A crescente preocupação com o meio ambiente tem elevado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão constante que o ecossistema sofre por intervenções antrópicas. Por este motivo e outros, como o elevado custo de defensivos agrícolas e o aumento da resistência das pragas a esses produtos, o número de pesquisas com microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública aumentou (DESTÉFANO, 2003). Entre estes microrganismos, destaca-se a bactéria *B. thuringiensis*, que possui atividade entomopatogênica, amplamente utilizada como controle biológico de várias pragas agrícolas (GLARE E O'CALLAGHAM, 2000).

Após sua descoberta, a primeira tentativa de teste em campo envolvendo a bactéria *B. thuringiensis* foi conduzida por Husz (1929), através de um programa internacional de controle da lagarta europeia do milho, da espécie *Ostrinia nubilalis*, onde se obtiveram resultados promissores. A partir daí, a bactéria *B. thuringiensis* foi considerada, pela indústria, como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico (HALL, 1967).

A produção comercial da bactéria *B. thuringiensis* teve início na França, quando foi lançado no mercado, em 1938, um produto denominado Sporeine (LAMBERT e PEFEROEN, 1992). Em 1950, o interesse pela utilização deste patógeno aumentou nos Estados Unidos, principalmente para o controle de lepidópteros (BEEGLE e YAMAMOTO, 1992). Depois de 20 anos, na década de 70, vários produtos para o controle de Lepidoptera foram desenvolvidos. A descoberta de *B. thuringiensis* variedade *israelensis*, com atividade sobre larvas de dípteros, revolucionou o controle de insetos vetores de doenças, particularmente dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium*. Em 1983, outro produto letal para larvas de Coleoptera, chamado de *B. thuringiensis* variedade *tenebrionis*, foi descoberto. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides e ácaros foram encontradas, embora não sejam ainda utilizadas comercialmente (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

Devido a esta característica de especificidade ao inseto-praga, não tendo efeito sobre muitos dos inimigos naturais, é muito estudada como agente de controle

biológico (HALL, 1967).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui. Estes genes codificam as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

Para o desenvolvimento da bactéria *B. thuringiensis*, Gram-positiva, utiliza-se meios artificiais na presença de oxigênio, em ambiente com certas restrições nutricionais. Devido ao ambiente hostil esse bacilo produz proteínas que se acumulam formando um corpo de inclusão proteica, fato este que as denominou de proteínas Cristal (Cry), também chamada de δ -endotoxina (YAMAMOTO e DEAN, 2000; BRAVO et al., 2005), Figura 1.

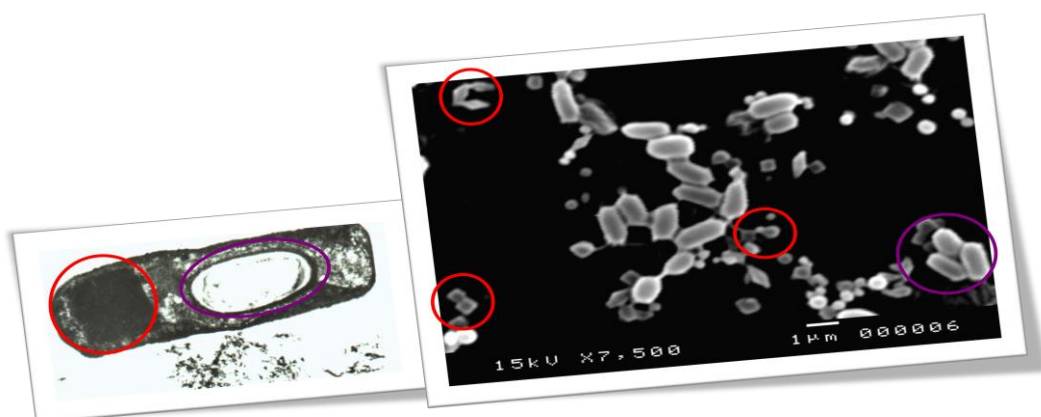


Figura 1. A esquerda *B.thuringiensis* com proteína Cristal – Cry, circulada em vermelho e esporo circulado em roxo. A direita diferentes morfologias de esporo circulado em vermelho e esporos circulado em roxo.

As proteínas Cry são codificadas pelos genes *cry*, que se encontram preferencialmente localizados nos plasmídeos, geralmente conjugativos, e juntamente com uma frequente associação a elementos genéticos móveis determinam a grande diversidade desses genes e a consequente ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações dos mesmos e, portanto, com perfis de toxicidade distintos (LERECLUS et al., 1993).

As protoxinas assumem formas morfológicas distintas evidenciadas através do estudo morfológico realizado por microscopia eletrônica, apresentando cristais

bipiramidais, cuboides, piramidais e esféricos, Figura 1, (DE MAAGD et al., 2003). Essas diferenças estruturais e tóxicas também são reveladas pelos alinhamentos, mostrando regiões comuns entre genes *cry*, denominadas regiões conservadas, e regiões onde se apresentam diferenças na sequência de nucleotídeos, resultando em diferentes proteínas Cry, ativas contra várias espécies de ordens distintas (SCHNEPF et al., 1998).

Esses cristais, quando ingeridos pelos insetos, juntamente com os esporos, são solubilizados em condições específicas de pH, atuam no sistema digestivo dos insetos e as protoxinas são convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, para de se alimentar (HÖFTE e WHITELEY, 1989; COPPING e MENN, 2000).

Segundo Parker e Fiel (2005), as toxinas formadoras de poros apresentaram através da utilização da cristalografia de raios-X a estrutura tridimensional (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa e Cry4Ba), sendo compostas por três domínios com funções distintas. As toxinas Cry, embora apresentem similaridade estrutural, demonstram diferenças consideráveis na sequência de aminoácidos e nas atividades tóxicas contra diferentes organismos, fato que auxilia no esclarecimento das diferenças na especificidade inseticida.

As primeira descrição do domínio I foi feito pela primeira vez na proteína Cry3Aa por Li et al. (1991) e, pelas propriedades deste domínio, sugere ser o domínio formador de poro da toxina Cry, ou seja, responsável pela inserção da toxina na membrana. Para isto, uma maior mudança conformacional é necessária a fim de transformar o domínio I e capacitar sua estrutura para inserção interna na membrana do hospedeiro (PIGOTT e ELLAR, 2007). O domínio II apresenta maiores variações na sua estrutura com diferenças consideráveis no tamanho, conformação e sequência dos “loops”. Acredita-se que o domínio II possa ter uma importância determinante na especificidade da toxina, sendo responsável pela ligação toxina-

membrana (LI et al., 1991; PIGOTT e ELLAR, 2007). O domínio III apresenta menos variações estruturais do que o domínio II, e a diferença essencial encontra-se no tamanho, na orientação e sequências dos “loops” (BOONSERM et al., 2005), tendo a função de catalisar a ligação da toxina ao receptor (PIRES et al., 2004).

Desta maneira, estudos detalhados da atividade das δ -endotoxinas propõe existir dois modos de ação na literatura, em que a forma da protoxina relativamente inerte e cristalina converte-se na forma citotóxica envolvendo assim várias etapas (SCHNEPF et al., 1998).

Dois modelos concorrentes têm sido propostos para explicar o modo de ação de toxinas de *B. thuringiensis*. Em ambos, os passos iniciais são idênticos, incluindo a solubilização da protoxina, a ativação da protoxina pelas proteases do intestino, e a ligação da toxina ao receptor de caderina (SOBERON et al., 2009). O modelo de formação de poros proposto por Bravo et al. (2004), sugere que a caderina provoca oligomerização toxina, em seguida, liga-se a receptores ligados a membrana por uma ancora glicosilfosfatidilinositol (GPI), como aminopeptidase-N, que facilita a inserção da toxina à membrana e consequente formação de poros, o que conduz a desequilíbrio osmótico, a lise das células e, finalmente, morte dos insetos-alvo (Figura 2) (GILL et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998).

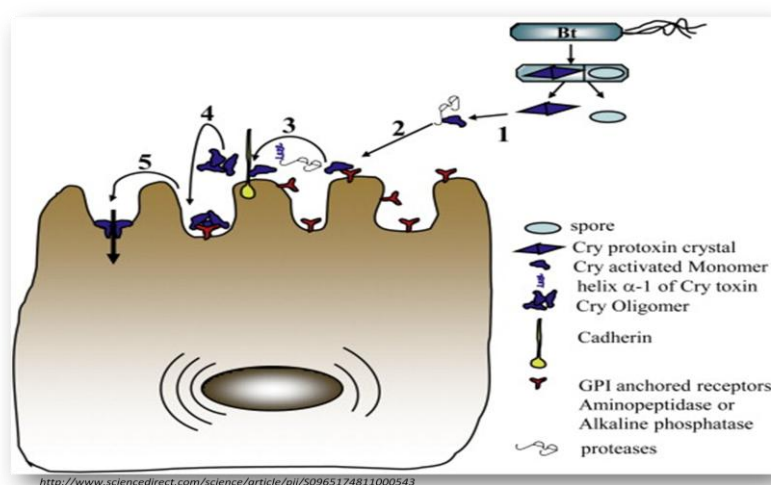


Figura 2. Modo de ação de Cry1A toxinas no lepidóptero *M. sexta*. 1. Solubilização e processamento proteolítico de Cry1A protoxina por proteases intestinais. 2. Binding of monomérica 3D Cry1A para altamente abundante GPI ancorada aminopeptidase-N e da fosfatase alcalina. 3. A ligação da toxina monomérica Cry1A

caderina do receptor e ainda mais proteólise do domínio I α -hélice 1. 4. Formação Oligomer e ligação da estrutura oligomérica para GPI-ancorada aminopeptidase-N e receptores de fosfatase alcalina. 5. Inserção da estrutura oligomérica Cry1A para a membrana, segundo Bravo et al. (2011)

Em contraste, o modelo de transdução de sinal proposto por Zhang et al. (2005) Figura 3, propõe, que a proteína Cry1Ab monomérica se liga a caderina e inicia uma via de sinalização dependente Mg^{2+} , que promove a morte celular, embora não envolva receptores secundários como aminopeptidase-N, fosfatase alcalina, GPI-ADAM metaloprotease, glicolípidos, glico-conjugados, V-ATP sintase subunidade, e actina, que torna o intestino das lagartas lepidópteras um ambiente proteolítico complexo Figura 5 (VALAITIS et al., 2001; SRINIVASAN et al., 2006; OCHOA-CAMPUZANO et al., 2007; KRISHNAMOORTHY et al., 2007; PIGOTT e ELLAR, 2007).

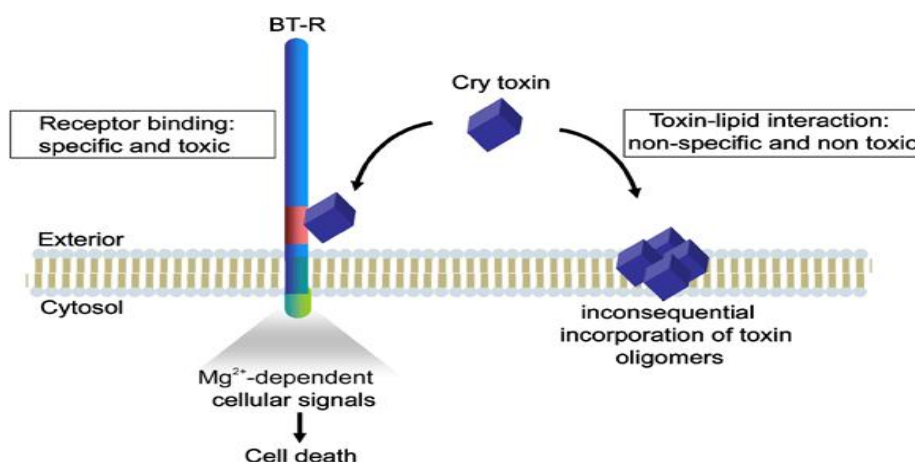


Figura 3. Modo de ação da proteína Cry proposto por Zhang et al. (2005).

De acordo com este modelo, existem dois tipos de interação entre as células e toxina. A primeira é uma toxina interação lípido-inespecífica, mediando a montagem de moléculas de toxinas Cry como oligómeros e sua inserção na membrana. O complexo oligómero incorporado na membrana não forma poros na membrana e não tem nenhum efeito tóxico sobre as células. O segundo tipo é a interação específica entre a toxina Cry e o receptor da caderina-P BT, o qual medeia a citotoxicidade. A ligação da toxina aos receptores provoca a morte das células

através da ativação da via de sinalização dependente de Mg^{2+} após a interação como receptor da toxina. O modelo prevê que a citotoxicidade associada com a toxina Cry depende estritamente de Mg^{2+} , as respostas celulares são desencadeadas pela ligação do BT-R e toxina, conduzindo à morte celular por necrose.

Entretanto o modelo mais aceito é o de Bravo et al. (2004) onde considera a presença dos receptores secundários como parte o processo de formação de poros, desta forma Pigott e Ellar (2007), relata que diferentes toxinas Cry se ligam a APN, mas apenas a toxina Cry1A foi examinada para determinar seus próprios sítios de ligação. A partir destes estudos, três sítios de ligação de APN foram propostos. A melhor caracterizada, é um único sítio de Cry1Ac que encontra-se na folha exterior de domínio III. Neste local, acredita-se que Cry1Ac se ligam ao receptor APN via um glicano contendo GalNAc. Um segundo local de ligação partilhado por ambas proteínas, Cry1Ab e Cry1Ac, foi identificado no ápice do domínio II e acredita-se ser formado por laçadas de superfície exposta. O sítio remanescente foi identificado em Cry1Aa e Cry1Ab e tem sido proposto para ocorrer próximo da interface entre o domínio II e domínio III.

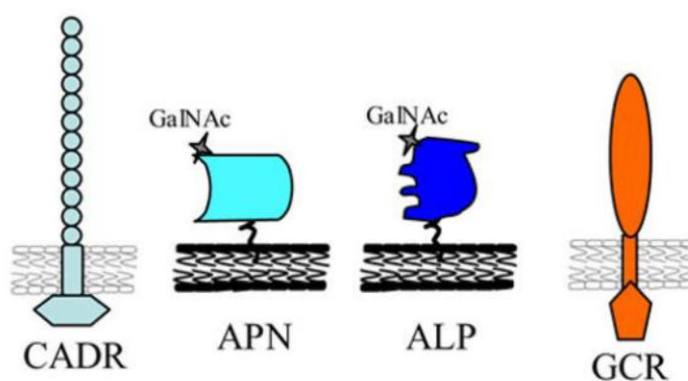


Figura 4. Receptores moleculares da Cry1Aa. GalNAc (N-acetilgalactosamina), sítio de reconhecimento e ligação da toxina Cry, CADR, receptor caderina; APN, receptor aminopeptidase-N; ALP, receptor fosfatase alcalina; GCR, receptor glicoconjugado de 270 kDa (Bravo et al., 2007).

A ligação das toxinas Cry aos receptores epiteliais do intestino médio de insetos é um fator importante e determinante na especificidade. A correlação entre a ligação e a toxicidade foi demonstrada pela primeira vez utilizando vesículas da

membrana apical do intestino de inseto (BBMV) preparados a partir de microvilosidades por utilização de uma técnica desenvolvida por Wolfersberger (1984). Estudos posteriores realizados por Hofmann et al. (1988b), mostraram que a toxina Cry (Cry1Ba) foi letal a *Pieris brassicae* ligando-se especificamente a BBMV do inseto mas não a BBMV preparada a partir de intestino de rato. Mais tarde, o mesmo autor demonstrou que Cry1Ab e Cry1Ba ligaram-se especificamente à BBMV de *P. brassicae*, enquanto que apenas a Cry1Ab ligou-se a BBMV preparada a partir de *Manduca sexta* (HOFMANN et al., 1988a). Uma vez que ambas as toxinas causam mortalidade em *P. brassicae*, e apenas Cry1Ab foi letal à *M. sexta*, foi possível observar que houve a correlação entre os dados de ligação e toxicidade. Além disso, Liang et al. (1995), correlaciona ligação reversíveis com a ligação da toxina ao receptor, enquanto que a ligação irreversível necessita da etapa de inserção da toxina na membrana.

Também é possível encontrar correlações do desenvolvimento de resistência a toxinas Cry, quando algumas espécies de insetos são expostas à pressão de seleção em condições de laboratório (FERRE e VAN RIE, 2002).

Neste contexto dois mecanismos conhecidos de resistência Bt foram identificados em insetos, que incluem a resistência envolvendo proteinases diversas que digerem a proteína antes da ligação com o receptor e outra envolvendo receptores (OPPERT et al., 1997), embora o mecanismo mais comum de resistência à toxina Cry entre cepas resistentes envolve mutações que afetam o conjunto de moléculas receptoras caderina (FERRE e VAN RIE, 2002)

Depois que foi demonstrado alta afinidade de sítios específicos de ligação da toxina Cry presentes no intestino médio de insetos, os esforços para identificar e clonar receptores de toxina foram intensificados. Muitos receptores de toxina Cry putativos já foram relatados, dos quais o melhor receptor caracterizado é a aminopeptidase N (APN) (KNIGHT, 1994; SANGADALA et al., 1994; GILLS, 1995; RAJAGOPAL et al., 2003) e o receptor caderina (NAGAMATSU et al., 1998; VADLAMUDI et al., 1993; VADLAMUDI et al., 1995; GAHAN et al., 2001), identificados em lepidópteros.

Muitos pesquisadores (GAHAN et al., 2001 e SOBERON et al., 2007) demonstram em seus experimentos, que mutações no gene da caderina estavam

ligadas geneticamente à resistência da proteína Cry1A em *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiella*, e *Helicoverpa armigera*. Outra mutação em um gene da aminopeptidase N também tem sido associada com a resistência à proteína Cry1Ac em *H. armigera* (RAJAGOPAL et al., 2002). O mesmo fato pode ser observado em *Spodoptera litura*, quando Zhang et al. (2009), apresentaram uma estirpe resistente a proteína Cry1Ac, devido a uma mutação de deleção no gene *apn1*. Herrero et al. (2005) também relatam a relação da falta de expressão da *apn1* em uma estirpe de *Spodoptera exigua* resistente a proteína Cry1Ca.

Como evidenciado, a presença da enzima digestiva aminopeptidase N (APN) é descrita por vários pesquisadores, no processo de ligação da proteína Cry no intestino médio de varias espécies de lepidópteros (HERRERO et al., 2005; CRAVA et al., 2010; KHAJURIA et al., 2011).

Em geral, a família das APNs faz parte de um amplo conjunto de enzimas proteolíticas, denominado de protease ou peptidase segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). São enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteína que são classificadas como exopeptidases ou endopeptidase de acordo com o local de sua atividade catalítica (HOPPER, 2002; RAWLINGS et al., 2006)

As exopeptidases catalisam a clivagem de seus substratos a partir de suas porções carboxi- ou aminoterminal e, portanto, podem ser subdivididas em aminopeptidase ou carboxipeptidase (BARRETT, 1980).

As famílias das metalopeptidase são dependentes de íons metálicos no mecanismo catalisação das reações enzimáticas e, estão agrupadas em diferentes clãs baseados na natureza do aminoácido que completa o sítio de ligação ao metal (Figura 5). O clã MA é composto pela sequencia HEXXH-E e o clã MB corresponde ao motivo HEXXH-H (RAO et al., 1998), em que X representa qualquer aminoácido. No clã MA, as histidinas e o último resíduo de ácido glutâmico servem como ligantes de zinco, enquanto que o primeiro resíduo de ácido glutâmico é importante para a catalisação enzimática, ou seja, ocorre a hidrólise de ligações peptídicas da água e subsequente libertação do substrato. Uma segunda região altamente conservada denominada GAMEN acredita-se fazer parte do sítio ativo (LAUSTSEN et al., 2001).

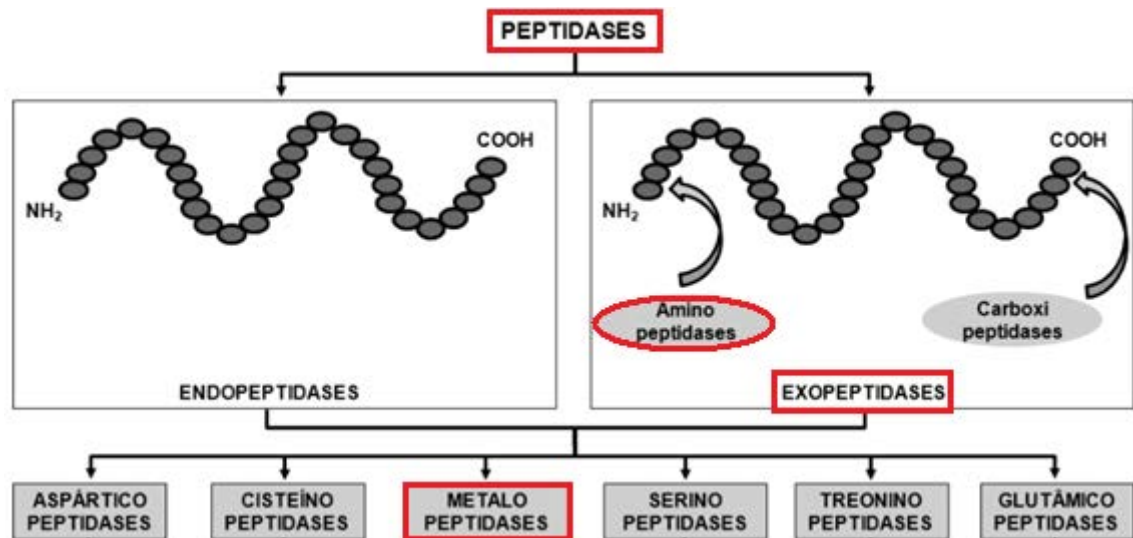


Figura 5. Esquema de classificação das peptidases.

Dessa maneira, as aminopeptidases N (APN) de lepidópteros pertencem à classe das endoproteases que clivam a porção N-terminal dos polipeptídeos liberando aminoácidos (PIGGOT e ELLAR, 2007). Eles são membros zinco-dependente tipo metaloprotease MA1, e por necessitarem do metal (cátion) de zinco bivalente para ativar uma molécula de água, constituem a subfamília das gluzincinas (ALBISTON et al., 2004). Esta exopeptidase dependente do íon zinco compartilham a região catalítica contendo uma assinatura de aminoácido (GXXMXN) e uma ligação de zinco (HEXXH [18X] E), e também é uma proteína altamente glicosilada (PEER, W. A., 2011).

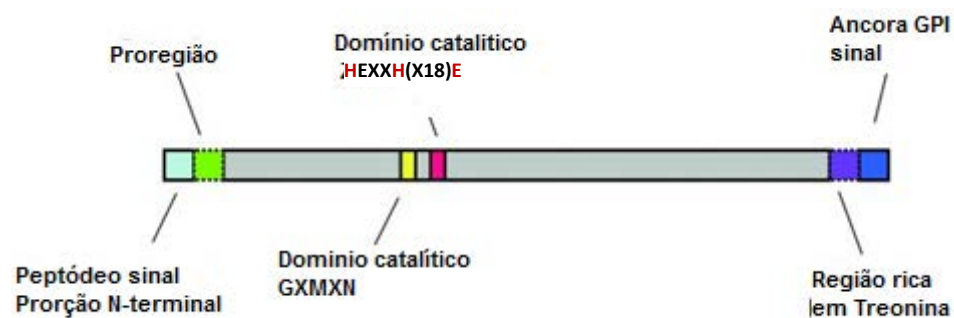


Figura 6. Representação esquemática de uma proteína APN típica de lepidópteros. A proregião e a região rica em treonina, mostrada com linhas a tracejado, têm sido relatados em apenas alguns APNs. Os domínios enzimáticos são

representados por (amarelo e rosa), domínio hidrofóbico (azul escuro) e domínios de interação proteína-proteína (azul claro) (PIGOTT e ELLAR, 2007). Os amino ácidos de ligação do íon zinco são destacados em vermelho (PEER, W. A., 2011).

As APN também são classificadas como ectoenzimas, por estarem localizadas na membrana apical das microvilosidades intestinais do trato alimentar de vários organismos diferentes, incluindo o intestino médio das larvas de lepidópteros. Neste tipo de inseto, uma âncora glicosil-fosfatidilinositol (GPI), é usada para a sua ligação à membrana (GARCZYNSKI e ADANG, 1995). Este domínio de interação da proteína com a membrana pode funcionar de forma independente da atividade enzimática das metaloprotease M1 e pode contribuir para a multifuncionalidade dessas proteínas (PEER, W. A., 2011). Das diferentes APNs que foram estudadas, várias características comuns surgiram (Figura 6). Os genes codificam proteínas de aproximadamente 1000 aminoácidos que sofrem de várias modificações conformacionais pós-tradução para se chegarem ao tamanho de proteínas maduras entre 90 e 170 kDa. As proteínas têm um peptídeo de sinal de clivagem na porção N-terminal que dirige a proteína para a superfície externa da membrana citoplasmática, e permanecem ligados à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (TAKESUE et al., 1992; LU et al., 1996; DENOLF et al., 1997; AGRAWAL et al., 2002;), em contraste com o que é visto nos vertebrados, em que uma haste hidrofóbica é utilizada para fixação na porção N-terminal (SEMENZA, 1986).

Assim, as APNs de lepidópteros são amplamente estudadas, não só pelo seu papel na digestão, mas também por estar envolvida no processo de ligação com as proteínas Cry de *B. thuringiensis*, (KNIGHT et al., 1994; BRAVO et al., 2007).

Atualmente, mais de 100 isoformas de APNs em lepidópteros foram relatados em bancos de dados, cinco sequências completa de genes *apn*, já foram clonadas e identificadas para o inseto praga *O. nubilalis* Hb e devidamente nomeados segundo Herrero et al. (2005) e Crava et al. (2010).

O lepidóptero *O. nubilalis*, conhecido popularmente por broca do milho europeia, é uma espécie de grande preocupação para todos os produtores de milho na Europa, e também na América do Norte. Devido aos seus hábitos que utiliza toda

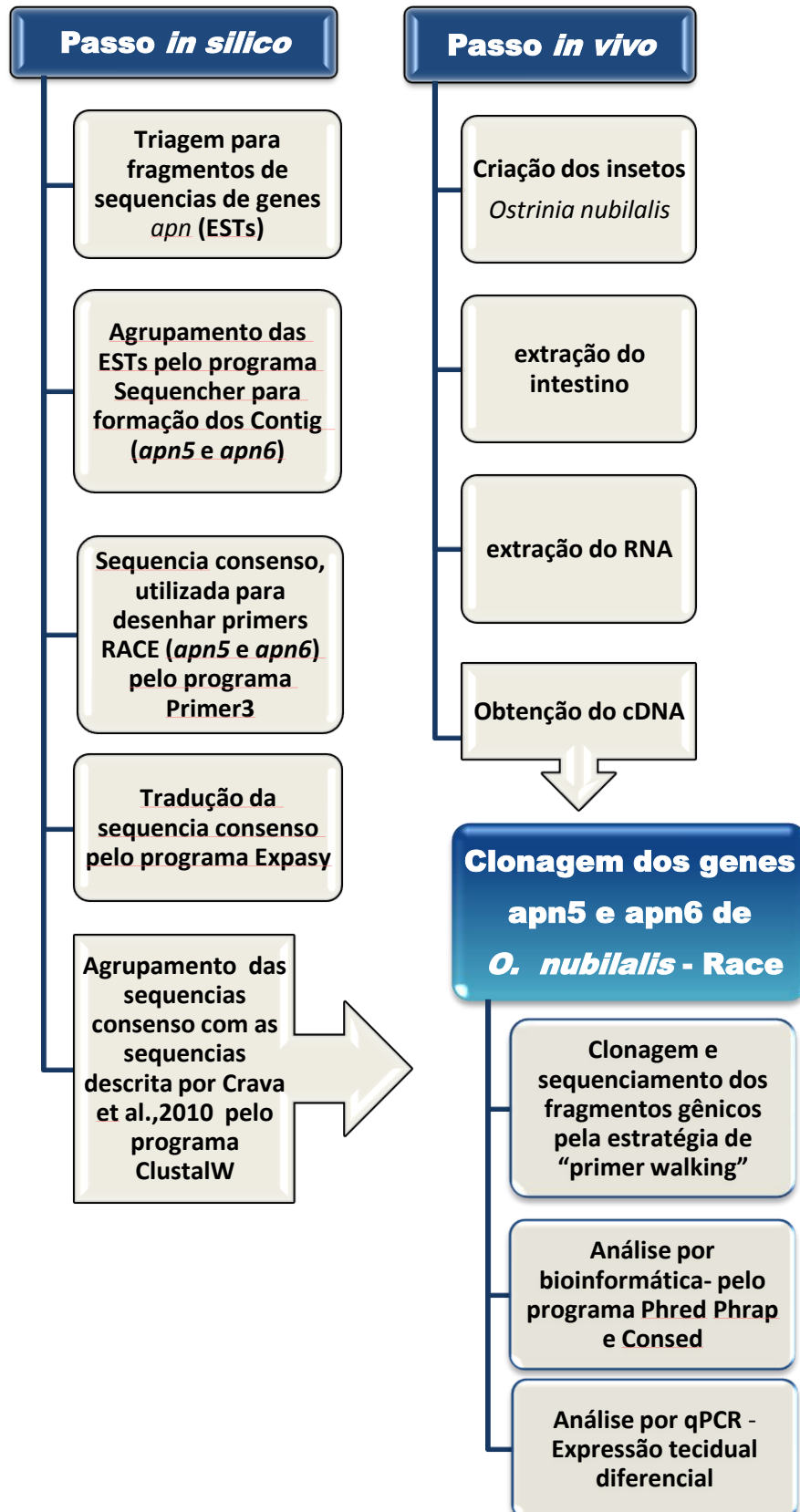
a planta em sua dieta (folhas, caule e espigas da planta) causa grandes danos e perdas na produção (LYNCH et al., 1980).

Atualmente, o controle do inseto *O. nubilalis* é realizado principalmente pela utilização do milho transgênico expressando as toxinas Cry1Ab e Cry1F de *B. thuringiensis*, (WITKOWSKI et al., 1997). Apesar de ser eficaz no controle deste inseto, esta tecnologia poderia ser ameaçada por meio do surgimento de populações de insetos resistentes ao milho transgênico (BATES, 2005).

Desta forma, no presente estudo, são reportadas duas sequências de cDNA completas, *apn5* e *apn6*, expressas no intestino médio das larvas da broca do milho europeia, e sua expressão em diferentes tecidos larvário de *O. nubilalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma



3.2. Insetos

As lagartas do inseto *O. nubilalis* utilizadas para obtenção do cDNA, neste trabalho, foram provenientes da criação mantida na Universidade de Valencia (Espanha), obtidas a partir de uma população de laboratório cedida pelo National Institut de Recherche Agronomique (INRA, Montpellier, França).

A população de lagartas de *O. nubilalis*, é mantida a temperatura de 25° C com fotoperíodo de 16:08 h (N: D) e 70% de umidade relativa em uma câmara climática, no Dpto de Genética da Universidade de Valência como mencionado acima. As pupas foram transferidas para caixas plásticas com papel de filtro. Os adultos emergentes foram mantidos em gaiolas de acasalamento a 22° C no mesmo fotoperíodo e umidade que as larvas, e as gaiolas aspergidas diariamente com água para manter a umidade.

A dieta para as lagartas era constituída de farelo de milho, germe de trigo e de levedura, acrescido de uma mistura de vitaminas, antibióticos, agentes conservantes foram adicionados, enquanto que os adultos da espécie foram alimentados com mel a 10% dissolvido em água.

3.3. Triagem para fragmentos de sequencias de genes *apn*

Os ESTs de *O. nubilalis* foram analisados comparativamente com sequência semelhantes de outros organismos. Para obter os ESTs do gene *apn5*, foram selecionados genes que expressassem a proteína APN5 de três diferentes insetos, *Helicoverpa armigera* (NCBI-GenBank:AY038608.1), *Bombix mori* (Silkworm GeneModel Entry: BGIBMGA008062-TA), e *Plutella xylostella* (NCBI-GenBank: AJ222699.1). O mesmo procedimento foi realizado para o gene *apn6*, neste caso utilizando o referido gene presentes em dois insetos, *B. mori* (Silkworm GeneModel Entry: GIBMGA008061-TA) e *H. armigera* (NCBI-GenBank: EU328183.1).

Os ESTs resultantes da análise de alinhamento de cada gene com a base de dados depositados no NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram selecionados. Para o processo de seleção dos ESTs, foram admitidos somente os

que mostraram maior pontuação e-value (valores mais próximos de 0). Através do uso do software Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), foi possível obter os “contigs” dos genes mencionados.

Com a obtenção dos “contigs” referente a cada gene (*apn-5* e *apn-6*), as sequências de nucleotídeos dos mesmos foram utilizadas para a elaboração dos oligonucleotídeos utilizados em amplificações (“primers”).

3.4. Clonagem dos genes *apn5* e *apn6* de *O. nubilalis*

Para a obtenção do cDNA do intestino médio, larvas de quinto ínstar foram dissecadas e limpas em tampão fresco MET frio (300 mM de manitol, 17 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 5 mM de EGTA). As amostras foram rapidamente homogeneizadas com um pistilo em um microtubo contendo reagente RNazol (MCRgene), o RNA total foi extraído seguindo o protocolo do fabricante.

O RNA total foi ressuspendido em água livre de nucleases, e as preparações foram analisadas quanto à pureza, quantificadas através da medição em um espectrofotômetro Nanodrop 2.0. As amostras contendo o RNA total (0,5-1 ug) de células do intestino médio de *O. nubilalis* foi retrotranscrito com o kit Super Script™ II Transcriptase Reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

As sequências de cDNA de comprimento total foram obtidas com Kit SMART™ de Amplificação RACE cDNA (Clontech, Mountain View, CA, EUA), (*Rapid amplification of cDNA ends* - Amplificação Rápida de Extremidades de cDNA) seguindo o protocolo do fabricante. Os iniciadores foram sintetizados com base nas sequências dos genes obtidos a partir da sequência consenso dos “contigs” já referidos anteriormente. Os fragmentos foram amplificados, sequenciados e posteriormente foram utilizados para elaborar iniciadores para as reações de RACE-PCR, seguindo as instruções do fabricante para utilização deste kit, (Tabela 1). Os produtos amplificados foram purificados a partir da eluição do gel, utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA Band Purification (GE, Healthcare, UK), posteriormente clonadas em vetor pGEM®-T Easy (Promega) com ligação durante 12h a 4°C sendo

as construções resultantes foram transformados por choque térmico em células competentes comerciais de *Escherichia coli* XL-blue (Agilent Technologies – Stratagene Products).

Os plasmídeos foram purificados com kit de isolamento de alta Pure Plasmid da Roche, verificados quanto a presença do inserto por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Tabela 1. Iniciadores para o experimento de RACE.

<i>gene</i>	Iniciadores RACE
<i>apn5</i>	F- ^{5'} CCAGGGAGATGAGGTGGCTATGCTC ^{3'} R- ^{3'} GAGCTATCTTCGCGTTGCCCTTGTC ^{5'}
<i>apn 6</i>	F- ^{5'} CTTGCCCAGAATTTGGTGGTTGGTC ^{3'} R- ^{3'} TGGAAGTGTGTGGTGGCGTAGAACC ^{5'}

3.5. Clonagem e sequenciamento dos fragmentos gênicos pela estratégia de “primer walking”

Sequências dos gene *apn5* e *apn6* clonados foram elaboradas através da estratégia de “primer walking”

Para isso utilizou-se iniciadores elaborados pelo software Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) com base na sequência consenso obtida através do alinhamento das sequências completas de cDNA de *B. mori* e *H. armigera* e também por fragmentos dos genes em estudo conhecidos anteriormente. O alinhamento das sequências consenso foi realizado pelo software Clustal X, e a síntese dos oligonucleotídeos foram realizadas pela empresa Invitrogen (Life Technologies®).

As sequências foram amplificadas com diferentes iniciadores, a fim de cobrir todo o gene. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20 µl: 20 ng de DNA; 250 µM de uma solução de dNTPs (10 mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Life Technologies®); 2,0 µl da solução tampão para a reação de PCR (10X) e água destilada Milli-Q esterilizada. As reações foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100 “Programmable Thermal Controller” - MJ Research, Inc.), equipado com

circuito “Hot Bonnet”, com os seguintes passos: um passo inicial de desnaturação a 94-95°C por 5 min seguidos por 30-35 ciclos com desnaturação a 94-95°C por 1 min; pareamento a 49-53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1-3 min e ao final, um passo extra de extensão a 72°C por 5-10 min.

Os produtos adicionados de gel Red foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a qual foi conduzida em tampão TEB 1X por 2 h, a 50 V. Em todas as eletroforeses foi adotado o emprego do marcador molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas®). Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob a luz UV e fotodocumentados em equipamento GEL-DOC 2000 (Bio-Rad®), através do software Quantity-One.

Os fragmentos obtidos por PCR com os iniciadores específicos foram clonados com a utilização do Kit pGEM®-T Easy Vector System I (Promega®), conforme as recomendações do fabricante. A transformação bacteriana foi realizada pelo método de choque térmico com células de *Escherichia coli* XLBlue competentes (Sambrook e Russel, 2001).

As células foram cultivadas em placas contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) acrescido de ampicilina (50 µg/ml) e da solução de X-Gal (20 µg/ml) e em seguida, incubadas a 37°C por 16 h. Colônias bacterianas de coloração branca foram coletadas e inoculadas em meio LB suplementado do antibiótico ampicilina (50 µg/ml), sendo após incubadas a 37°C, por 16 h, a 200 rpm. Amostras do DNA plasmidial dos clones foram obtidas utilizando o Kit Roche Applied Science - High Pure Plasmidid Isolation, seguindo instruções do fabricante.

A confirmação de que os clones recombinantes eram os que foram escolhidos foi realizada por PCR de colônia utilizando os iniciadores SP6 e T7 apropriados para o vetor de clonagem, e restrição enzimática com a endonuclease EcoRI (Promega®).

Os sequenciamentos dos clones positivos para os genes de interesse foram realizados em aparelho ABI PRISM® 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems®), no IBMCP (Instituto de Biologia Molecular e Celular de Plantas, Valencia, Espanha).

3.6. Análise por bioinformática

Os plasmídeos foram sequenciados utilizando os iniciadores T7 e SP6 apropriados para o vetor de clonagem. Os dados obtidos pelos sequenciamentos das amostras foram analisados pelos programas Phred Phrap e Consed, (EWING e GREEN, 1998) os quais geraram sequências FASTA que posteriormente, foram comparadas através do uso da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool - BLAST com o banco de dados GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Os “contigs” foram montados com o software Sequencher para se obter sequências de comprimento total de cDNA. As sequências foram traduzidas em proteínas putativas utilizando o software EditSeq (DNASTar). Domínios estruturais das proteínas putativas foram analisados com o programa de Prosite disponível no URL <http://www.expasy.ch/prosite/>. A presença do peptídeo sinal e as sequências da âncora GPI, foi conseguida com a utilização do software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (BENDTSEN et al., 2004) e o software GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>), respectivamente.

A homologia das sequências de proteínas foi analisada utilizando o software Clustal X (Thompson et al., 1997). Todas as sequências completas de proteína APN de lepidópteros relatados no GenBank e sequências com homologia com as aminopeptidases anotadas no genoma montado de *B. mori* (<http://silkbdb.org>) foram obtidos. Uma única sequência representante de cada grupo de APN para cada espécie de inseto foi escolhida aleatoriamente a partir de sequências com identidade superior a 90%. Análises de alinhamento múltiplo foram realizadas com todos os genes de APNs selecionados e as sequências de *O. nubilalis*. Uma árvore filogenética foi construída utilizando o software ClustalX para alinhamento das sequências, e o método neighbor-joining com 1000 resamplings de bootstrap. A indicação dos agrupamento foi realizada seguindo principalmente os resultados de Crava et al., (2010).

3.7. Análise por qPCR - Expressão tecidual diferencial

Para realizar a análise de qPCR (expressão em tempo real), três amostras de RNA foram preparadas a partir de três tecidos larvário: intestinal, adiposo e do tegumento de *O. nubilalis*. As larvas foram dissecadas em tampão MET, tecidos isolados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e o RNA total foi purificado com o reagente TriPure (Roche). O RNA total (2 ug) de cada uma das amostras foi tratado com 2 ul de DNase I (Invitrogen) durante 15 min a 25°C para remover o DNA genômico contaminante. A DNase I foi desativada com 1 ul de EDTA 25 mM e aquecimento a 65 ° C durante 10 min. O RNA (1,5 ug) foi, então, retrotranscrito em cDNA usando a Super Script™ II Transcriptase Reversa kit (Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A contaminação por DNA genômico nas preparações de RNA foi verificada utilizando o RNA total como modelo em reações de qRT-PCR com primers específicos para o gene *rps3*.

Tabela 2. Iniciadores para o experimento de qRT-PCR.

<i>gene</i>	Iniciadores qRT-PCR
<i>apn5</i>	F- 5'TGTCAACGTAACCCTCGTCA ^{3'} R- 3'GTCGAACGGAGTGGAGTCAT ^{5'}
<i>apn6</i>	F- 5'GCTGCAGATCACCCCTATTTTC ^{3'} R- 3'TGTTTCATCGTTTCTCGCTGA ^{5'}
<i>apn7</i>	F- 5'ACCAATCCCAATTCCAAGGT ^{3'} R- 3'GCAGTTCTTCAGCTTGTGTGCG ^{5'}
<i>apn1</i>	F- 5'TCAATTTTCGTGCTGAGAAGG ^{3'} R- 3'ATCCCTCAGCTTCTGCAAGT ^{5'}
<i>rps3</i>	F- 5'GAGCTACTGGGAGAGAAGG ^{3'} R- 3'GATGTTGAAACGCTTCTGGA ^{5'}

Os iniciadores foram desenhados com software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para amplificar produtos ao redor de 100 pb, (tabela 2). StepOne (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado para reações de qRT-PCR 4 ul de EVAgreen (12,5 mg), 4 ul de cDNA diluído 1:7, 10 ul de água estéril e 2 ul de primer da mistura de primer (2,5 µM cada primer). As condições

seguintes foram usadas: 1 ciclo a 95° C durante 15 minutos, 40 ciclos a 95° C durante 15s e 60° C durante 20s. O gene “housekeeping” *rps3* (S3 - proteína da subunidade ribossomal de *O. nubilalis*, DQ988989) foi utilizado como controle interno para normalizar os níveis de RNA entre as amostras a água foi utilizada para os controles negativos. Os controles negativos não apresentaram produtos de amplificação. Cada reação foi realizada em duplicata. Dissociação curvas análise dos produtos de amplificação foram realizadas no final de cada reação de PCR com uma fase de dissociação de 1 ciclo a 60°C para confirmar que apenas o produto de PCR correspondente foi amplificado e detectado. A análise dos dados de qRT-PCR foi realizada com o software StepOne. (Applied Biosystems). Para manter a consistência, a linha de base foi definida automaticamente pelo software. Diferenças na CT (limiar de ciclo) entre cada gene aminopeptidase e a *rps3*, (Δ CT), foram calculados para normalizar as diferenças entre a quantidade de ácido nucleico total adicionado a mistura da reação de cDNA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção dos genes das aminopeptidases

No presente estudo realizou-se o rastreo das ESTs para os genes *apn 5* e *apn 6*. Para as classes de APNs em estudo, formaram-se 17 “contigs” para *apn 5* e 15 “contigs” para *apn 6*. Os mesmos foram traduzidos e agrupados com as sequências completas de APNs conforme relatado por Crava et al., 2010. Nessa identificação verificou-se que os 29 “contigs” formados, agruparam-se com APNs de *O. nubilalis* (APN2, APN3a, APN4, APN8), e três “contigs” ofereciam informações diferentes não agrupando-se com as sequências proteicas de APN de *O. nubilalis*. Estes três fragmentos foram comparados com as sequências completas de APNs depositadas no banco de dados do NCBI, verificando-se semelhanças com outras sequências de APNs de outros insetos (ANGELUCCI et al., 2008; ZHANG et al., 2008;) sendo uma sequência consenso para *apn 5* de 1180 pb, uma sequência consenso para *apn 6* de 746 pb e uma sequência que não apresentou nenhuma informação para construção de nenhum gene para APNs.

A sequência consenso obtida para cada gene (*apn 5* e *apn 6*) foi usada para projetar oligonucleotídeos específicos para posterior amplificação das sequências e codificação dos genes inteiros. Para verificar a qualidade dos primer empregou-se a técnica de PCR, que produziu para *apn 5* e *apn 6* amplicons de 160 pb e 170 pb, respectivamente destacados em amarelo na Figura 7.

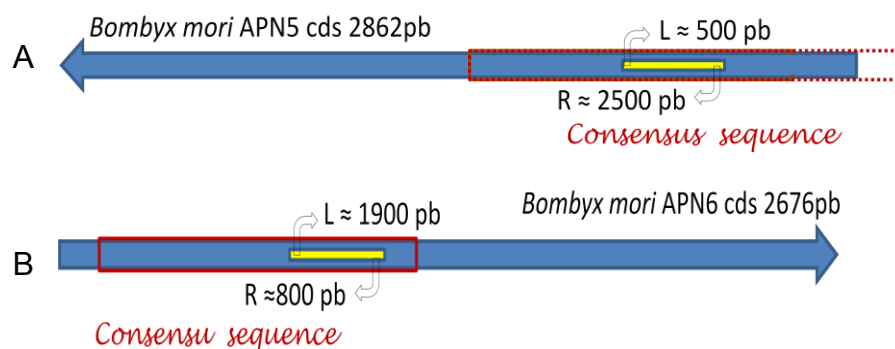


Figura 7: A: representação gráfica do gene *apn5* de *B. mori* (5'-3'), ao final do gene em vermelho continuo a sequência consenso obtida através do “contigs” semelhante com o gene de *B. mori*,

em tracejado sequência que não foi semelhante com o gene, em amarelo sequência amplificada com “primers” elaborados a partir da sequência consenso para este gene. B: representação gráfica do gene *apn6* de *B.mori* (5'-3'), ao início do gene em vermelho contínuo a sequência consenso obtida através do “contigs” semelhante com o gene de *B. mori*, em amarelo sequência amplificada com “primers” elaborados a partir da sequência consenso para este gene.

Para este estudo a disponibilidade do genoma completo do *B. mori* e *H. armigera* foi essencial para a identificação *in silico* dos genes homólogos de *O. nubilalis*, obtidos através da técnica de PCR-RACE.

Pelo alinhamento da APN5 de *O. nubilalis* através do BLASTp, com outra APN5 de *O.nubilalis* já depositada na base de dados, foi possível identificar 98% de similaridade. Embora o artigo ainda não tenha sido publicado, com o número de acesso (JF339039.1) é possível acessar a sequência proteica já depositada.

Após a análise da sequência *apn 6* de *O. nubilalis*, foi verificado que a mesma teve máxima identidade de 64% com a *apn 6* de *Danaus plexippus* e *Trichoplusia ni* e de *H. armigera*, respectivos números de acesso (EHJ64340.1, AEA29694.1, ACA35025.1). Porém a mesma busca não apresentou alta semelhança com as classes de APNs de *O. nubilalis*, somente a máxima similaridade de 43% com APN 5 de *O. nubilalis*

Esta relação de semelhanças é demonstrado por Crava et al., 2010, onde a identidade dos aminoácidos variam 50% na mesma classe de APN (quando espécies filogeneticamente distantes são comparadas) à 95% (para as mesmas espécies). Mas diferentemente de outras espécies de lepidópteros, em *O. nubilalis* duas isoformas de APN-3 apresentaram identidade de aminoácidos de 74%, e quando comparadas com APN-3 de outro lepidóptero (*Ostrinia furnacalis*) a identidade foi de 96% para OnAPN3a e 74% para OnAPN3b, sugerindo que as sequências não são alelos do mesmo locus, mas sim que são transcritos a partir de locus diferentes. A sequência da APN 5 analisada sugere-se ser uma isoforma desta classe por apresentar alta semelhança com outra APN da mesma classe já identificada em *O.nubilalis*, enquanto que a sequência para a APN 6 identificada

neste estudo sugere ser uma nova classe para a espécie *O. nubilalis*, acrescentando assim, esta classe na espécie em estudo.

4.2 Agrupamento e nomenclatura das aminopeptidases

As sequências proteicas das aminopeptidases APN 5 e APN 6 de *O. nubilalis* depositadas no GenBank com número de acesso KC776603 e KC776602, respectivamente, foram utilizados para análises fenéticas e posterior classificação da nomenclatura, seguindo a proposta de Herrero et al. (2005) e Crava et al. (2010). Assim as sequências obtidas no presente trabalho, a partir do inseto *O. nubilalis*, com homólogos identificados em *B. mori*, mostraram complementar ao trabalho de Crava et al. (2010) adicionando estas sequência referentes a novas classes de APN ausente no grupo de APN identificado pela autora, (Figura 8). A análise mais recente sobre APN de lepidópteros realizada por Angelucci et al. (2008) identificou até sete classe de APNs para lepidópteros de diferentes espécies, o que vem cofirmar o mesmo para a espécie investigada neste trabalho.

Podemos observar que através da distribuição das famílias dos diversos lepidópteros utilizados na formação da árvore fenética, para verificar quais insetos formariam os agrupamentos das diferentes classes de APN envolvidas nesse estudo, notamos a presença da família Noctuidae presente em todas as classes de APN. No entanto, a distribuição das famílias nos grupos das APN formados não se revela de forma congruente com todos os grupos de moléculas, sugerindo que o processo de evolução das aminopeptidases foi resultante, inclusive, muitos eventos homoplástico, convergência evolutiva.

A relação de semelhança entre essas estruturas de proteínas ou genes, em indivíduos ou espécies distintas, esta presentes em cada um deles devido à ocorrência independente de modificações que resultam na forma final semelhante, o que não indica necessariamente um ancestral comum entre as espécies que têm essas características (Tabela 3).

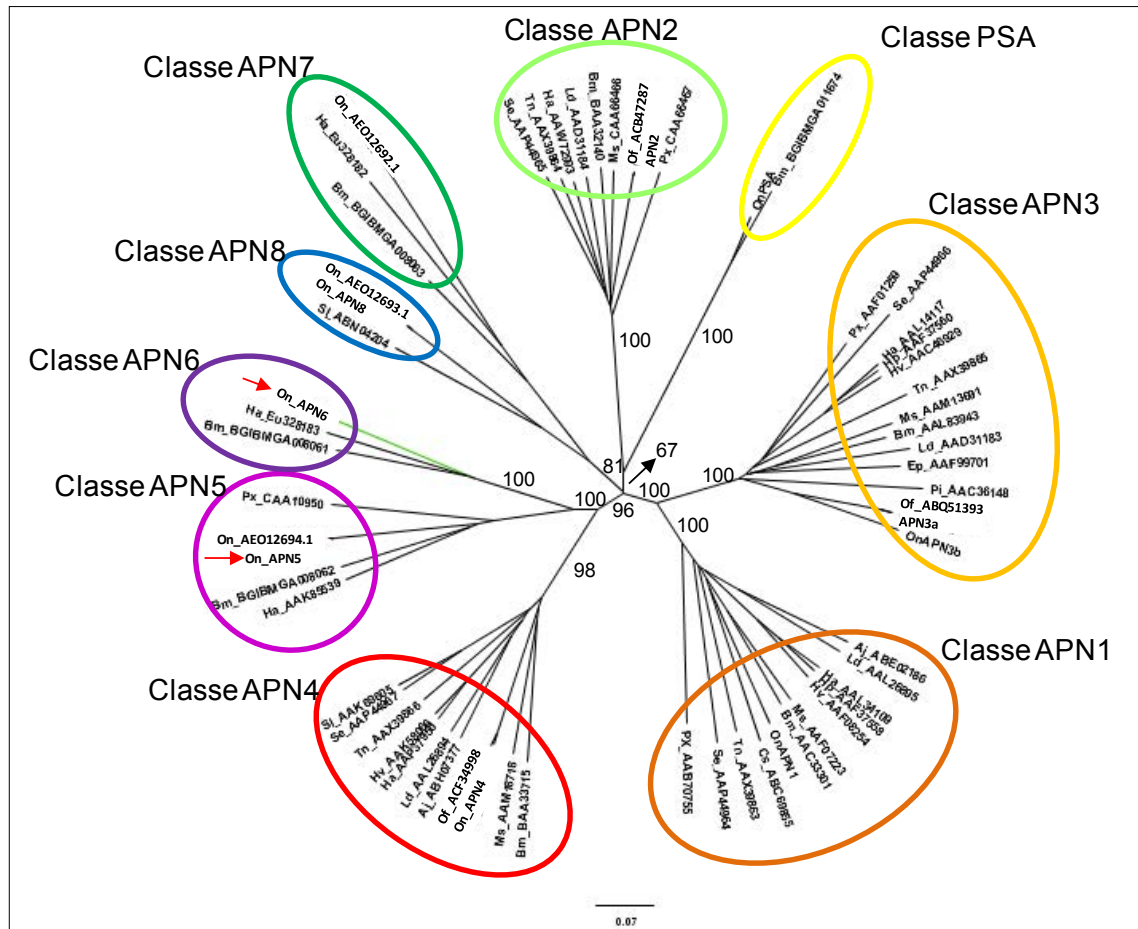


Figura 8. Árvore fenética derivada de alinhamento Clustal X de sequências completas de proteína aminopeptidase Lepidoptera relatados no GenBank e em Silkworm Genome Database. Números de acesso de cada sequência de aminoácido estão indicados na árvore. Ha: *Helicoverpa armigera*, Hp: *Helicoverpa punctigera*, Hv: *Heliothis virescens*, On: *Ostrinia nubilalis*, Of: *Ostrinia furnacalis*, Px: *Plutella xylostella*, Bm: *Bombyx mori*, Ms: *Manduca sexta*, Se: *Spodoptera exigua*, Sl: *Spodoptera litura*, PE: *Epiphas postvittiana*, Tn: *Trichoplusia ni*, Ld: *Lymantria dispar*, Aj: *Achaea janata*, Pi: *Plodia interpunctella*, Cs: *Chilo suppressalis*. Os valores de *bootstrap* são indicados para os nós principais.

Tabela 3. Família dos insetos envolvidos no dendograma.

APN	Inseto	Família
APN1	Aj - <i>Achea janata</i>	Noctuidae
	Ld - <i>Lymantria dispar</i>	Limantriídeos
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Hp - <i>Helicoverpa punctigera</i>	Noctuidae
	Hv - <i>Heliothis virescens</i>	Noctuidae
	Ms - <i>Manduca sexta</i>	Sphingidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	Crambidae
	Cs - <i>Chilo suppressalis</i>	Crambidae
	Tn - <i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae
	Se - <i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae
	Px - <i>Plutella xylostella</i>	Brassicaceae
APN2	Se - <i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae
	Tn - <i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Ld - <i>Lymantria dispar</i>	Limantriídeos
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
	Ms - <i>Manduca sexta</i>	Sphingidae
	Of - <i>Ostrinia furnacalis</i>	crambidae
	Px - <i>Plutella xylostella</i>	Brassicaceae
APN3	Px - <i>Plutella xylostella</i>	Brassicaceae
	Se - <i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Hp - <i>Helicoverpa punctigera</i>	Noctuidae
	Hv - <i>Heliothis virescens</i>	Noctuidae
	Tn - <i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae
	Ms - <i>Manduca sexta</i>	Sphingidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
	Ld - <i>Lymantria dispar</i>	Limantriídeos
	Ep - <i>Epiphyas postvittiana</i>	Tortricidae
	Pi - <i>Plodia interpunctella</i>	Pyalidae
	Of - <i>Ostrinia furnacalis</i>	Crambidae
	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	Crambidae
APN4	Sl - <i>Spodoptera litura</i>	Noctuidae
	Se - <i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae
	Tn - <i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae
	Hv - <i>Heliothis virescens</i>	Noctuidae
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Ld - <i>Lymantria dispar</i>	Limantriídeos
	Aj - <i>Achaea janata</i>	Noctuidae

	Of - <i>Ostrinia furnacalis</i>	Crambidae
	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
	Ms - <i>Manduca sexta</i>	Sphingidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
APN5	Px - <i>Plutella xylostella</i>	Brassicaceae
	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
APN6	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
APN7	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
	Ha - <i>Helicoverpa armigera</i>	Noctuidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
APN8	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
	Sl - <i>Spodoptera litura</i>	Noctuidae
APN PSA	On - <i>Ostrinia nubilalis</i>	crambidae
	Bm - <i>Bombyx mori</i>	Bombycidae

4.3 Motivos característicos de aminopeptidase

Os motivo característico essenciais para a sua atividade enzimática, o motivo *zinco-binding* HEXXH(18X)E (HOOPER, 1994) e o motivo GAMENWG foram encontrados nas duas classes de APNs. Como podemos observar nas sequencias, houve pequenas variações nos aminoácidos do motivo característico GAMENWG, mas Angelucci et al, 2008 considera as diferenças na sequência (GTENWG) como um motivo GAMENWG (Figura 9B). De maneira geral, as características típicas presentes em APNs lepidópteros clássicos revisadas por Piggot e Ellar, (2007), estão presente neste estudo (Figura 9A e 9B). A sequência rica em treonina próxima à sequência sinal C-terminal foi descrita por Piggot e Ellar, (2007) como um recurso para as classes 1 e 3, e também encontrada no APN2 de *H.armigera* (ANGELUCCI

et al., 2008), no entanto não foi identificada nas sequencias APN5 e APN6 do nosso estudo.

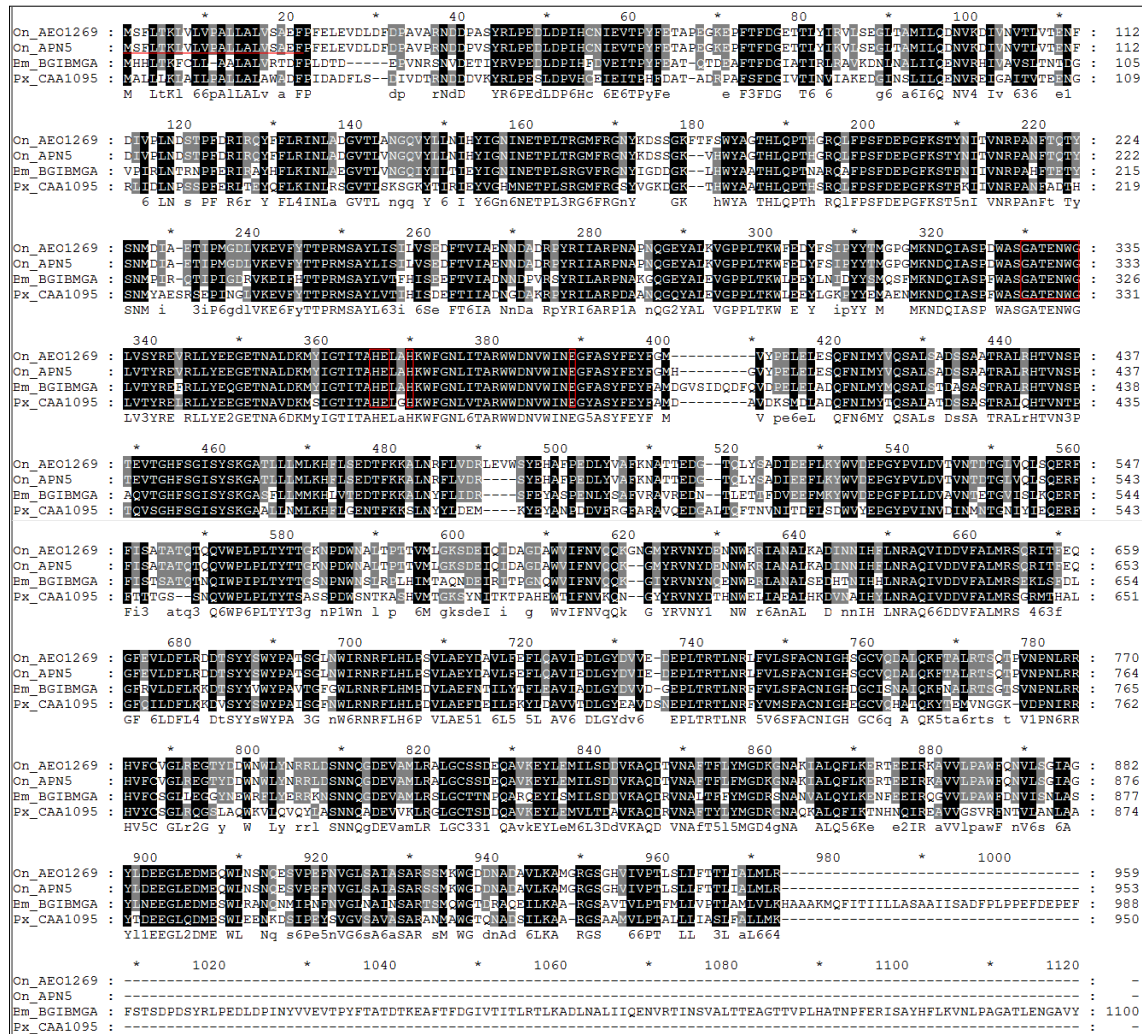


Figura 9A .

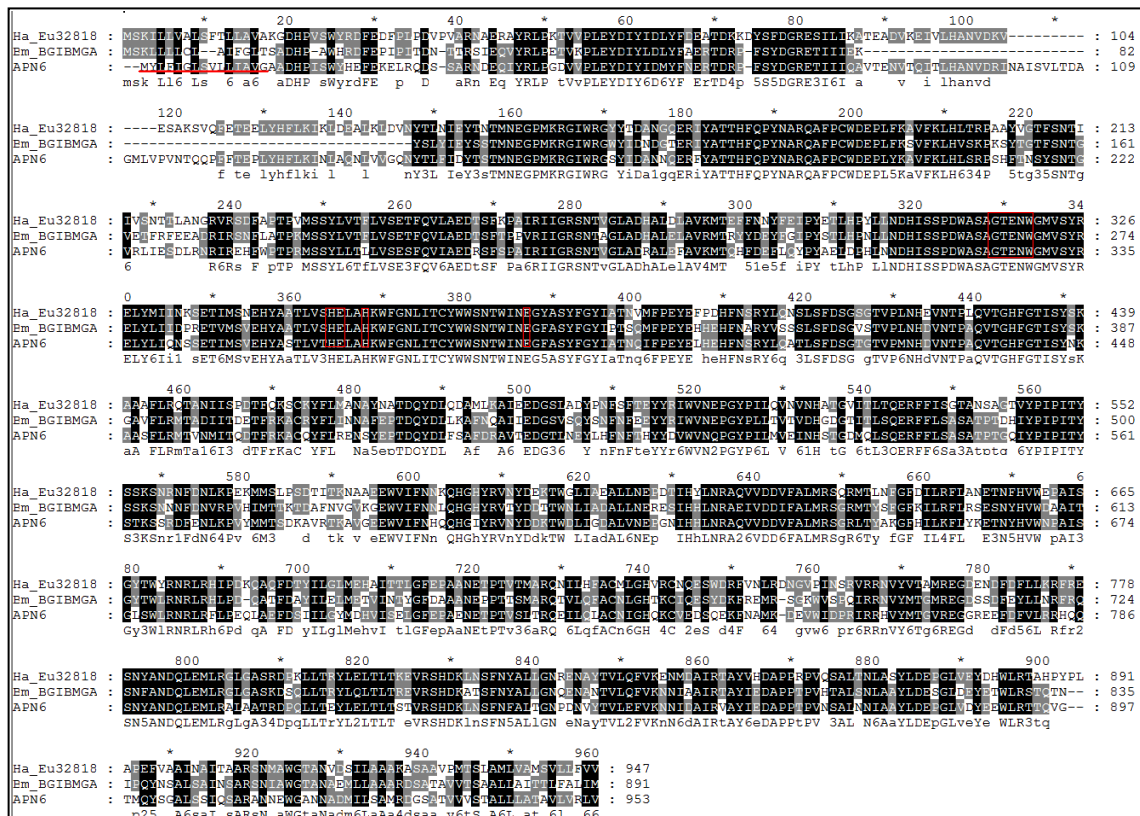


Figura 9B.

Figura 9. 9A(OnAPN5-KC776603) 9B(OnAPN6-KC776602): alinhamento de seqüências proteicas putativas da aminopeptidase *O. nubilalis* no Clustal X. motivo GAMENWN e HEXXH (X)18 E de zinco de ligação são enquadrados. Peptídeos sinal estão sublinhados. Tons pretos indicam 100% de identidade entre as sequencias de aminoácidos; as cinzentas indicar a identidade de 80%.

4.4 Maior expressão da aminopeptidase APN 7

Neste estudo, a análise de expressão gênica revelou que os três genes de aminopeptidases expressaram predominantemente em tecidos do intestino, enquanto que no tecido adiposo e no tegumento ocorreu a expressão somente da aminopeptidase da classe 7, (Figura 10).

A predominância de expressão da APN em tecido intestinal também foi verificada por Khajuria et al. (2001), este fato pode estar intimamente ligado aos vários tipos de células secretoras de enzimas comuns a digestão, como também acontece no homem: as amilases, maltase, invertases, lipases e proteases, que hidrolisam respectivamente o amido, maltose, sacarose, lipídeos e proteínas.

Angelucci et al (2008), também justificam a predominância de expressão verificada no tecido do intestino, por relacionar a função dessas enzimas na digestão de proteínas neste ambiente, podendo interagir também com as proteínas Cry de *B. thuringiensis* e desencadear o processo tóxico em muitas situação quando a proteína é ingerida pelo inseto.

A aminopeptidase, APN7, apresentou expressão de 7,5 vezes mais no tegumento quando comparado com o intestino e de 4,9 vezes mais no tecido adiposo quando comparado com o intestino. As APN5 e APN6 apresentam expressão residual no tecido adiposo, o que poderia ser resultado de uma contaminação durante o processo de dissecção dos tecidos. Os autores, Khajuria et al. (2011), justificam que a ausência de expressão das diferentes proteínas APN no tecido adiposo, pode ser devido ao material de extração de RNA (tecido intestinal) para a obtenção a biblioteca de cDNA, embora em nosso estudo o cDNA de *O. nubilalis* foi obtido através de extrações de RNA de tecido intestinal e ocorreu a expressão da APN7. A ausência de expressão de aminopeptidase no tecido adiposo de *O. nubilalis*, também é relatado por outros autores como Crava et al., (2010), e também em estudo de expressão de diferentes APN com outra espécies de insetos como *Helicoverpa armigera* e *Trichoplusia ni* (ANGELUCCI et al., 2008; WANG et al., 2005).

Possíveis explicações podem ser sugeridas para as expressões diferenciadas das aminopeptidases, APNs, nos tecido utilizado neste estudo. De acordo como Gallo et al. (2002) a tegumento do inseto é um conjunto de diferentes tecidos (epiderme, procutícula e epicutícula) onde se encontram diversos tipos células (enócitos, célula tricógenas e glândulas dérmicas) que estão ligados direta ou indiretamente com a formação da cutícula. No processo de ecdise as células da epiderme tornam-se ativas, produzindo enzimas que digerem parte da velha cutícula constituída por um complexo proteico com quitina, e fornecendo compostos para a formação da nova cutícula. O mesmo é proposto por Khajuria et al. (2011), onde sugerem que a expressão de APN em tecido adiposo, pode estar relacionada ao significativo desempenho na metamorfose do inseto.

Assim sugerimos com este trabalho a relação da alta expressão da aminopeptidase da classe 7 no tecido adiposo e no tegumento, com o processo de

metamorfose e ecdise da larva de quinto e ultimo instar de *O. nubilalis*, e menor expressão da aminopeptidase da classe 7 no tecido intestinal.

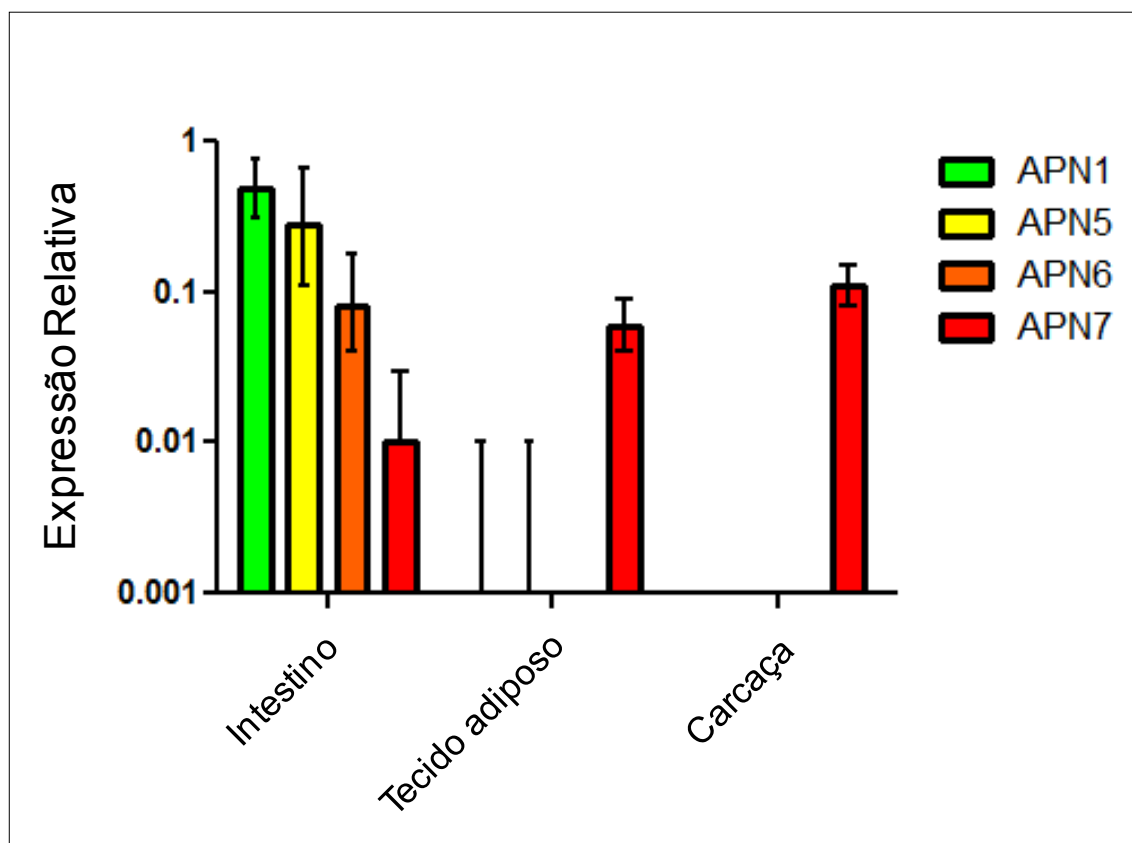


Figura 10. Perfis de expressão de OnAPN em larvas de *O. nubilalis* de quinto instar demonstrado em gráfico Log¹⁰.

Devido à demonstração de que as APNs estão envolvidas como um dos principais receptores das proteínas Cry, os resultados apresentados nessa tese facilitaram estudos para melhor caracterizar interações de ligação da proteína Cry de *B.thuringiensis* com o receptor APN, pois são dados que complementam o entendimento não somente de interações enzima/receptor como também sugere funcionalidade diferenciadas para a expressão de cada APN nos diferentes tecidos em que foi observado. Tendo como resultado básico as informações nesse trabalho descrito, poderão auxiliar em estudos posteriores, como por exemplo, BBMV, onde se pode observar a interação de diferentes proteínas Cry e Vip com receptores intestinais de forma qualitativa e quantitativa, proporcionando uma forma de compreender o desenvolvimento da resistência à proteína Cry *B. thuringiensis*, e

outras proteínas que por ventura poderão surgir, sendo assim fundamental para elaborar futuras estratégias adequadas para o manejo da resistência de pragas.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados e nas condições estudadas, pode-se concluir que:

- Com estratégia utilizadas neste trabalho possibilitaram com sucesso a identificação e clonagem de duas aminopeptidases, APN5 e APN6, do lepidóptero *Ostrinia nubilalis*.
- As APN5, APN6 em estudo se agruparam nas respectivas classes, quando comparadas com sequencias de diversas aminopetidase de diferentes insetos.
- A partir do tecido intestinal do lepidóptero *Ostrinia nubilalis*, foi possível identificar a expressão de APN5, APN6 e APN7, como possíveis receptores das proteínas de *B.thuringiensis*.
- Nesse estudo, sugerimos, que a aminopeptidase relacionada com a metamorfose do inseto é APN7 que foi expressa no tecido adiposo e no tegumento do lepidóptero *Ostrinia nubilalis*.

6. REFERÊNCIAS

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Chichester, v. 68, n. 9, p. 4583-4592, 2002.

ANGELUCCI, C.; BARRETT-WILT G. A.; HUNT, D. F.; AKHURST, R. J.; EAST, P. D.; GORDON K. H. J.; CAMPBELL, P. M. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the δ -endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Kidlington, v. 38, n. 7, p. 685–696, 2008.

BARRETT, A. J. The many forms and functions of cellular proteinases. **Federation Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 9-14, Jan. 1980.

BATES, S. L.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nat. Biotechnol.**, New York v. 23, n. 1, p. 57-62, 2005.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.

BENDTSEN J.D., NIELSEN H., VON HEIJNE G., BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides SignalP 3.0. **Jornal de Biologia Molecular**, London, v. 340, p. 783–795, 2004.

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*, London v. 348, n. 2, p. 363–382, 2005.

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., Soberón, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol., Oxford**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus Thuringiensis*: Mecanismos and use In:_____. **Comprehensive molecular inset science**. Amsterdam:Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1667, n. 1, p. 38–46, 2004.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest management science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CRAVA, C. M.; BEL, Y.; LEE, S. F.; MANACHINI, B.; HECKEL, D. G.; ESCRICHE, B. Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and *Bombyx mori* (L.): sequences, mapping and expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Kidlington, v. 40, p. 506-515, 2010.

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

DENOLF, P.; HENDRICKX, K.; VAN DAMME, J.; JANSENS, 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. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 248, n. 3, p. 748-761, 1997.

DESTÉFANO, R. H. R. Detecção e identificação de *Meta rhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea sacaralis* por primers específico. 72p. Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2003.

EWING, B.; GREEN, P: Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FERRE, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 47, p. 501–533, 2002.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with *Bacillus thuringiensis* resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, Washington, v. 29, n. 5531, p. 8857–8860, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1060949>>.

GALLO, D.; HAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCZYNSKI, S. F.; ADANG, M. J. *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) $\hat{I}'$ -endotoxin binding APN in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. **Insect Biochem. Molecular Biol.**, Kidlington, v. 25, n. 4, p. 409-415, 1995.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; FRANCIS, V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, n. 45, p. 27277-27282, 1995.

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

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

HALL, I. M. Some fundamental aspects of applied insect pathology. **Advances in Pest Control Research**, New York, v. 4, p. 13-24, 1967.

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

HOFMANN, C.; LUTHY, P.; HUTTER, R.; PLISKA, V. Binding of the d endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Eur. J. Biochem.**, Chichester, v. 173, p. 85-91, 1988a.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HOFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* $\hat{I}'$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 7844-7848, 1988b.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Review**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**., Amsterdam, v. 354, p. 1–6, 1994.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays Biochem.**, London, v. 38, p. 1-8, 2002
In:_____. Comprehensive molecular insect science. **Amsterdam:Elsevier BV**, 2005.
p. 175-206.

KHAJURIA, C.; BUSCHMAN; L. L.; CHEN, M. S.; SIEGFRIED, B. D.; ZHU, K. Identification of a novel aminopeptidase P-Like Gene (OnAPP) Possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*). **Plos One**, v. 6, p. 10, 2011. Disponível em: <
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0023983>>.

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. **Mol. Microbiol.**, Chichester, v. 11, n. 3, p. 429-436, 1994.

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 Biochem. Mol. Biol.**, Kidlington, v. 37, n. 3, p. 189–201, 2007.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

LAUSTSEN, P. G., VANG, S. KRISTENSEN, T. Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase. **Eur. J. Biochem.** v. 268, p. 98-104. 2001.

LERECUS D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Ed.). *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: J. Wiley e Sons, 1993. p.37-70.

LI, CARREL, J. J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6.347, p.815-821, 1991.

LU, Y. J.; ADANG, M. J. Conversion of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Kidlington, v. 26, p. 33-40, 1996.

LYNCH, R. E.; ROBINSON, J. F.; BERRY, C. E. European corn borer [*Ostrinia nubilalis*]: yield losses and damage resulting from a simulated natural infestation. **J. Econ. Entomol.**, Lanham, v. 73, n. 1, p. 141-144, 1980.

NAGAMATSU, Y.; TODA, S.; KOIKE, T.; MIYOSHI, Y.; SHIGEMATSU, S.; KOGURE, M. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 62, p. 727-734, 1998a.

OCHOA-CAMPUZANO, C.; REAL, M. D.; MARTINNEZ-RAMIREZ, A. C.; BRAVO, A.; RAUSELL, C. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **Biochem Biophys Res Commun.**, Philadelphia, v. 36, n. 2, p. 437-442, 2007.

OPPERT, B.; KRAMER, K. J.; BEEMAN, R. W. JOHNSON, D.; MCGAUGHEY, W. H. Proteinase mediada resistência a insetos de *Bacillus thuringiensis* toxinas. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 272, p. 23473-23476, 1997.

PARKER, M. W.; FIEL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PEER, W. A. The role of multifunctional M1 metallopeptidases in cell cycle progression. **Ann. Bot.**, Oxford, v. 107, n. 7, p. 1171-1181, 2011.

PIGOTT, C.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>>.

RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; SELVAPANDIYAN, A.; S. SIVAKUMAR, S.; AHMAD, S.; BHATNAGAR, R. K. Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. **Biochem. J.**, London, v. 370, p. 971-978, 2003.

RAJAGOPAL, R.; SIVAKUMAR, S.; AGRAWAL, N.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K. Silencing of midgut aminopeptidase-N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 277, n. 47, p. 46849–46851, 2002.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 34, p. D270-D272, Jan.2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp971>>.

ROZEN, S., SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**. New York, v.132, p. 365-386. 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

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 $86\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, n. 13, p. 10088-10092, 1994.

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

SEMENZA, G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. **Annu. Rev. Cell Biol.**, Palo Alto, v. 2, p. 255-313, 1986.

SOBERON, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 66, n. 8, p. 1337–1349, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversity in Lepidopteran serine proteases. **Cell. Molecular Biol. Lett.**, Wroclaw, v. 11, n. 1, p. 132-154, 2006.

TAKESUE, S., K. YOKOTA, K.; MIYAJIMA, S.; TAGUCHI, R.; IKEZAWA, H.; TAKESUE, Y. Partial release of aminopeptidase N from larval midgut cell membranes of the silkworm, *Bombyx mori*, by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Comp. Biochem. Physiol. B: biochem. mol. biol.**, Philadelphia, v. 102, n. 1, p. 7-11, 1992.

THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

VADLAMUDI, R. K.; JI, T. H.; BULLA JR., L. A. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 17, p. 12334-12340, 1993.

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*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, n. 10, p. 5490-5494, 1995.

VALAITIS, A. P.; JENKINS, J. L.; LEE, M. K.; DEAN, D. H.; GARNER, K. J. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, Hoboken, v. 46, n. 4, p. 186–200, 2001.

Wang P.; Zhang X.; Zhang J. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Kidlington, v. 35, p. 611–620, 2005.

WITKOWSKI, J. F.; WEDBERG, J. L.; SEFFEY, K. L.; SLODERBECK, P. E.; SIEGFRIED, B. Bt corn and european corn borer: long term success through resistance management. Ames: Iowa State University, 1997. Disponível em: <<http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc7055.html>>.

WOLFERSBERGER, M. G. Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. **Am. Zool.**, Oxford, v. 24, p. 187-197, 1984. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/icb/24.1.187>>.

YAMAMOTO. T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE. A.; NIELSEN-LE ROUX . C. (Ed). **Entomopathogenic bacteria**: from laboratory to field application. Netherlands: kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.

ZHANG, R.; GANG H.; TRACY, M. A.; ADANG, M. J. A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Biochemistry**, Washington, v. 47, n. 43, p. 11263-11272, 2008.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA, L. A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death Differ.**, London, v. 12, n. 11, p. 1407–1416, 2005.