

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÃO DA TOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis*
ÀS MICROVILOSIDADES APICAIS DAS CÉLULAS
COLUNARES DO INTESTINO MÉDIO DE *Helicoverpa
armigera* HÜBNER, 1805 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM
DIFERENTES ÍNSTARES LARVAIS**

Igor Henrique Sena da Silva

Engenheiro Agrônomo

2017

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

**INTERAÇÃO DA TOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis*
ÀS MICROVILOSIDADES APICAIS DAS CÉLULAS
COLUNARES DO INTESTINO MÉDIO DE *Helicoverpa*
armigera HÜBNER, 1805 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM
DIFERENTES ÍNSTARES LARVAIS**

Igor Henrique Sena da Silva

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Co-orientador: Dr. Fernando Hercos Valicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2017

S586i Silva, Igor Henrique Sena da
Interação da toxina Cry1ac de *Bacillus thuringiensis* às microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio de *Helicoverpa armiger*, Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes ínstares larvais / Igor Henrique Sena da Silva. – – Jaboticabal, 2017
vi, 50 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk
Coorientador: Fernando Hercos Valicente
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Luis Garrigós Leite
Bibliografia

1. Controle biológico. 2. *Helicoverpa armigera*. 3. Toxina Cry1Ac. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:595.786

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INTERAÇÃO DA TOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* ÀS MICROVILOSIDADES APICAIS DAS CÉLULAS COLONARES DO INTESTINO MÉDIO DE *Helicoverpa armigera* HÜBNER, 1805 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES ÍNSTARES LARVAIS

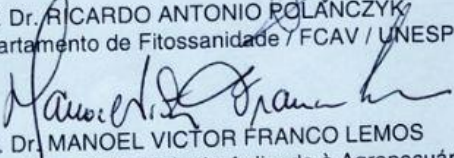
AUTOR: IGOR HENRIQUE SENA DA SILVA

ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

COORIENTADOR: FERNANDO HERCOS VALICENTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE
Departamento de Fitossanidade / Instituto Biológico de São Paulo / Campinas/SP

Jaboticabal, 26 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IGOR HENRIQUE SENA DA SILVA - Nascido em Sete Lagoas - MG, no dia 26 de dezembro de 1989. É bacharel em Biossistemas (2014) e em Engenharia Agrônômica (2015) pela Universidade Federal de São João Del Rei, *Campus* de Sete Lagoas, MG. Foi bolsista PIBIC do Fundo de Amparo às Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por 4 anos, trabalhando nos laboratórios de Ecologia Microbiana e de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). No Laboratório de Controle Biológico trabalhou em pesquisas visando o controle de *Spodoptera frugiperda* com o uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Baculovirus spodoptera* (SfMNPV 6-NR). Neste período participou de 27 eventos na área de atuação, publicou 3 artigos em revistas indexadas, 2 trabalhos completos e 30 resumos em anais de congressos, 12 deles apresentados de forma oral ou pôster. Realizou estágio de pesquisa na empresa Btheck Biotecnologia (Brasília, DF), onde realizou testes de potência de diferentes lotes de Bt subespécie *kurstaki* em *S. frugiperda*. Ingressou no curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em agosto de 2015, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, Jaboticabal, na área de Entomologia Agrícola, sendo bolsista do Fundo de Amparo às Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP) no período de julho de 2016 a julho de 2017. Realizou parte da pesquisa do mestrado (4 meses) em um estágio de pesquisa no exterior (BEPE/FAPESP) no Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autónoma do México (UNAM), Cuernavaca, México, sob supervisão da Dra. Alejandra Bravo, onde desenvolveu atividades relacionadas aos mecanismos de resistência de *Helicoverpa armigera* à proteína Cry1Ac de Bt.

"Se ansiamos tanto assim por um propósito cósmico, vamos, então, encontrar para nós mesmos, um objetivo digno"

(Uma fábula reconfortante, Carl Sagan)

DEDICATÓRIA

Dedico, ao meu filho Bernardo por ter dado um novo sentido a minha vida e por me fazer a todo o tempo buscar o meu melhor, por ele e para ele, te amo muito meu filho.

À minha companheira Natália Machado, por todas as palavras de carinho, força e por ter sempre estado ao meu lado nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Carlos José e Rosa Lúcia, por terem me dado a benção da vida, ter me educado e me guiado para que eu pudesse chegar até aqui, vocês dois são e sempre serão a razão de tudo.

Às minhas irmãs Rose Darlin e Ruanny Sena e Cristiane, meus sobrinhos João Victor e Carlos Henrique, pela motivação, brincadeiras e todos lindos momentos em família.

À todos meus familiares que torcem e que, de alguma forma, sempre se lembram de mim: Minha vó Terezinha, vó Neuza, tios Liane, Wesley, Patrícia, Ney, Edméia, Beth e Camilo, aos meus amados primos: André, Camila, Luana, Lucas, Luciana, Maila e Sinaira.

À todos amigos que a vida me presenteou e que estão sempre ao meu lado onde quer que estejam.

Em especial, ao meu amigo Robinho *"in memoriam"*, onde quer que você esteja meu irmão, isto é para você.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Jaboticabal, São Paulo, e aos docentes e discentes do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) desta instituição, em especial ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, por toda orientação e preciosos ensinamentos;

Ao Fundo de Amparo as Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, incentivo à realização deste projeto, e pela concessão da bolsa no exterior, concessões (2015/24330-5 e 2016/21464-3)

Ao meu co-orientador Dr. Fernando Hercos Valicente, pela orientação, amizade, conselhos, pela contribuição neste trabalho e de minha formação profissional e pessoal como um todo;

À todos amigos do laboratório de Controle Biológico, da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG) pela ajuda nos experimentos e momentos de descontração.

À Dra. Alejandra Bravo, Dr. Mário Soberón, Dra. Isabel Gomez, Dr. Sabino Pacheco e Jorge Quintero por toda a orientação e ajuda na condução dos experimentos no Instituto de Biotecnologia (IBT) da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM), Cuernavaca, México,

À todos os colegas do laboratório Bravo/Soberón do IBT-UNAM, em especial para Leivi Portugal, Mary Carmem, Diana de Castro, Joshua Ocelotl, Árlen Peña, Christian, Sergio, Zeyu Wang, Alejandro, Janete Onofre, por terem feito de meus quatro meses no México, uma das melhores experiências de minha vida.

Enfim, a todos os colegas, amigos e professores que de alguma forma contribuíram com esse trabalho e fizeram parte de minha vida durante essa maravilhosa etapa.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT -	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805)	4
2.1.1 Origem e distribuição geográfica	4
2.1.2 Aspectos biológicos de <i>Helicoverpa armigera</i>	5
2.1.3 Aspectos morfológicos de <i>Helicoverpa armigera</i>	6
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner: Uma bactéria com propriedades inseticidas	7
2.2.1 Aspectos gerais das proteínas Cry	8
2.2.2 Modo de ação das proteínas Cry	10
2.2.3 Interação dos receptores com proteínas Cry1A	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Determinação dos ínstares de <i>Helicoverpa armigera</i>	15
3.2 Bioensaios de toxicidade	16
3.3 Expressão, purificação e ativação proteolítica da proteína Cry1Ac	17
3.4 Extração do intestinos e preparação das BBMV's	17
3.5 Atividades enzimáticas de ALP e APN.....	18
3.6 Ensaios de ligação de ELISA	19
3.7 Ensaio de imunoprecipitação	19
3.8 Identificação das proteínas por LC-MS/MS.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 Determinação dos ínstares de <i>Helicoverpa armigera</i>	21
4.2 Bioensaios de toxicidade	21
4.3 Ativação proteolítica da proteína Cry1Ac	22
4.4 Atividades de ALP e APN	23
4.5 Ensaios de ligação de ELISA	24

4.6 Ensaio de imunoprecipitação e identificação das proteínas.....	26
4.7 Identificação de proteínas por LC-MS/MS	27
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Média e desvio padrão da largura da cápsula cefálica (CC), número de larvas (n) e razão de crescimento (RC) entre os ínstaes larvais de <i>Helicoverpa armigera</i>	21
Tabela 2 - Concentração letal (CL ₅₀) das proteínas Cry1Ac sobre diferentes ínstaes larvais de <i>Helicoverpa armigera</i>	22
Tabela 3 - Atividade específica das enzimas aminopeptidase-N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) em homogeneizado total e BBMVs isoladas de diferentes ínstaes larvais de <i>H. armigera</i> e seus respectivos enriquecimentos.....	23
Tabela 4 - Proteínas de BBMVs de larvas de segundo ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> identificadas como ligantes da proteína Cry1Ac. As proteínas foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS-MS)	27
Tabela 5 - Proteínas de BBMVs de larvas de quinto ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i> identificadas como ligantes da proteína Cry1Ac. As proteínas foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS-MS)	28

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas de adultos de <i>Helicoverpa armigera</i> . Vista dorsal (1) e ventral (2) da fêmea; vista dorsal (3) e ventral (4) do macho.....	7
Figura 2 - Estrutural tridimensional da proteína Cry1Aa (PDB: 1C1Y)	9
Figura 3 - Modelo de ativação pela proteína quinase A (PKA)	11
Figura 4 - Mecanismo de ação de proposto para descrever a atividade inseticida da proteína Cry1Ab em <i>Manduca sexta</i> segundo o modelo de ligação sequencial.....	12
Figura 5 - Perfil proteico de proteína Cry1Ac em sua forma não ativada e após ativação com tripsina em SDS-PAGE 10%.....	23
Figura 6 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) em BBMVs isolados de diferentes ínstares de <i>Helicoverpa armigera</i> em gel SDS-PAGE (10%).....	24
Figura 7 - Ligação da proteína Cry1Ac (0-100 nmols) às BBMVs de diferentes ínstares larvais de <i>Helicoverpa armigera</i>	25
Figura 8 - Correlação entre toxicidade de Cry1Ac e afinidade de ligação da proteína às BBMVs isoladas de diferentes ínstares de <i>Helicoverpa armigera</i> . Correlação de Pearson de 0,95.....	25
Figura 9 - Detecção de proteínas ligadas à proteína Cry1Ac de BBMVs de segundo (A) e quinto ínstar (B) larval de <i>H. armigera</i> usando a técnica de imunoprecipitação	26

**INTERAÇÃO DA TOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* ÀS
MICROVILOSIDADES APICAIS DAS CÉLULAS DO INTESTINO MÉDIO DE
Helicoverpa armigera HÜBNER, 1805 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM
DIFERENTES ÍNSTARES LARVAIS**

RESUMO – *Helicoverpa armigera* é uma praga altamente polífaga e ataca culturas de grande importância agrícola em diversos países do mundo. O controle desta praga é realizado primariamente por inseticidas químicos. Porém, o uso indiscriminado do controle químico levou a resistência de populações desta praga a maioria dos inseticidas químicos usados para seu controle, dificultando o seu manejo no campo. Além do controle químico, o controle de *H. armigera* tem sido realizado com uso de plantas transgênicas que expressam a proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou por bioinseticidas que contêm esta e outras proteínas. No entanto, estudos têm demonstrado uma diminuição significativa na susceptibilidade de *H. armigera* às proteínas Cry com o aumento de seu desenvolvimento larval. O mecanismo de resistência mais comum dos insetos às proteínas Cry é a redução de ligação da proteína aos receptores presentes na membrana, levando a uma menor afinidade de ligação da proteína aos receptores intestinais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de lagartas de diferentes ínstares de *H. armigera* à Cry1Ac e correlacionar com a capacidade de ligação da proteína Cry1Ac às microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio (BBMVs) isoladas de todos ínstares larvais. Além disso, por meio de ensaios de imunoprecipitação e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massa, identificar as proteínas envolvidas na interação com a proteína Cry1Ac no segundo e quinto ínstares de *H. armigera*. Foi observada uma redução significativa na susceptibilidade dos últimos ínstares larvais de *H. armigera* à proteína Cry1Ac comparado aos ínstares iniciais. Os valores estimados de CL₅₀ variaram de 31,1 a 2525,7 ng de proteína/cm² de dieta, em lagartas de primeiro e sexto ínstar, respectivamente. Estes resultados evidenciam uma diferença de 80 vezes na susceptibilidade à proteína Cry1Ac do último para o primeiro ínstar. Nos testes de ligação de ELISA da proteína Cry1Ac às BBMVs dos diferentes ínstares, foi constatada uma diminuição total na capacidade de ligação da proteína Cry1Ac as BBMVs dos estádios mais tardios comparados aos iniciais, com afinidade de ligação aparente de 3,88 vezes menor no último ínstar comparado ao primeiro. Assim, uma clara correlação direta entre toxicidade de Cry1Ac e a afinidade de ligação da proteína às BBMVs de *H. armigera* foi demonstrada. Os resultados dos ensaios de imunoprecipitação demonstraram um padrão diferenciado de interação com a proteína Cry1Ac no segundo e quinto ínstar. A proteína fosfatase alcalina (ALP) foi identificada apenas no segundo ínstar, bem como, outras proteínas de membrana, como proibitina e uma proteína de canal iônico, que podem estar envolvidas para a alta toxicidade de Cry1Ac em ínstares iniciais de *H. armigera*. A identificação e o papel funcional das proteínas de ligação nos diferentes estádios de desenvolvimento de *H. armigera*, facilitará a elucidação do mecanismo de ação da proteína Cry1Ac e poderá ajudar a propor estratégias que retardem a evolução da resistência dos insetos às cultivares transgênicas que expressam esta proteína.

Palavras-chave: Aminopeptidase N, controle biológico, ensaios de ligação, fosfatase alcalina, espectrofotometria de massa, cromatografia líquida, imunoprecipitação

**INTERACTION OF Cry1Ac TOXIN FROM *Bacillus thuringiensis* TO BRUSH
BORDER MEMBRANE OF *Helicoverpa armigera* HÜBNER, 1805
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) MIDGUT IN DIFFERENT LARVAL INSTARS**

ABSTRACT - *Helicoverpa armigera* is a highly polyphagous pest and attacks important crops worldwide. The control of this pest is carried out primarily by chemical insecticides. However, the indiscriminate use of chemical control, led to pest populations to develop resistance to most of the chemical insecticides used for their control, making it difficult to management in the field. In addition to chemical control, *H. armigera* has been done by transgenic crops expressing Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* (Bt) or by biopesticides that contains Cry1Ac or other toxins. However, studies have demonstrated a susceptibility decrease of *H. armigera* to Cry toxins with their larval development increase. The most common mechanism of resistance used by insects against Cry toxins is the reduced toxin binding to receptors present on the membrane, leading to a lower binding affinity of the toxin to intestinal receptors. Thus, the objective of this work was to evaluate the susceptibility of different instar larvae of *H. armigera* to Cry1Ac toxin and to correlate with the Cry1Ac toxin binding capacity to BBMVs isolated from all larval instar. Furthermore, by pull-down techniques and liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis, to identify the proteins involved in the Cry1Ac toxin interaction in the second and fifth instars of *H. armigera*. A significant reduction in the susceptibility of the late instars of *H. armigera* to Cry1Ac toxin was observed compared to early instars. LC₅₀ estimated values ranged from 31.1 to 2525.7 ng of toxin/cm² of diet in first and sixth instar larvae, respectively. These results point a difference of 80-fold in the susceptibility to Cry1Ac toxin from late to first larval instar. In the ELISA binding assays results to BBMVs of the different instars was found a total decrease in the binding capacity of Cry1Ac toxin to BBMVs from late instars compared to BBMVs from early instars, presenting an apparent binding affinity of 3.88 times lower in the last instars than the first. Thus, a clearly correlation between Cry1Ac toxicity and binding toxin affinity to *H. armigera* BBMVs has been demonstrated. The pull-down assays demonstrated a different pattern of the interaction between Cry1Ac toxin with the second and fifth instars. The protein phosphatase alkaline (ALP) was identified only in the second instar, as well as, other membrane proteins, as prohibitin and an ion channel protein, which may be involved for higher toxicity of Cry1Ac in early instars of *H. armigera*. The identification and functional role of binding proteins in the different stages of development of *H. armigera* will facilitate the elucidation of the Cry1Ac toxin mechanism of action and will may help to propose strategies that delay the insect resistance evolution to transgenic crops that express this protein.

Key-words: Aminopeptidase N, biological control, binding assay, alkaline phosphatase, mass spectrometry analysis, liquid chromatography, pull-down.

1. INTRODUÇÃO

Helicoverpa armigera (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das pragas agrícolas mais importantes do mundo. Altamente polífaga, esta praga ataca 68 famílias de plantas diferentes, entre elas várias culturas economicamente importantes, como algodão, soja, milho, sorgo, trigo, tomate, entre outras espécies cultivadas e não cultivadas (FITT, 1989; ZALUCKI et al., 1994; POGUE, 2004). Os custos anuais em todo o mundo para o controle desta praga são estimados em mais de 2 bilhões de dólares, excluindo os custos socioeconômicos e ambientais associados ao seu controle (TAY et al., 2013).

O controle químico é o principal método de controle de *H. armigera* em diferentes partes do mundo, principalmente através de pulverizações de organofosforados (clorpirifós), carbamatos (carbaril e tiodicarbe), piretróides sintéticos (deltametrina e cipermetrina) e inseticidas fisiológicos (spinosad e abamectina) (RAFIEE-DASTJERDI et al., 2008). No entanto, com a elevada pressão de seleção causada pelo uso indiscriminado dos inseticidas químicos vários casos de resistência de populações de *H. armigera* aos inseticidas químicos têm sido relatados em diversos países (McCAFFERY, 1998; AHMAD; ARIF; ZAHOOR, 2001; KRANTHI et al., 2002; BASKAR; IGNACIMUTHUA, 2012). Esta espécie é a que apresenta maior número de relatos de resistência a inseticidas químicos em todo o mundo (WYCKHUYS et al., 2013). Além disso, uma série de problemas relacionados a contaminação ambiental, efeito deletério sobre os inimigos naturais e danos à saúde humana estão frequentemente associados aos inseticidas químicos. Desta forma, a utilização de outras formas de controle que sejam efetivas contra esta praga e mais sustentáveis são necessárias, como por exemplo a utilização do agente entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* (Bt) na forma de bioinseticida ou planta transgênica.

Bt é uma bactéria gram-positiva, que em sua fase de esporulação produz proteínas na forma de cristais, conhecidas como proteínas Cry, que possuem atividade inseticida sobre insetos de diversas ordens de importância agrícola, tais como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, nematoides e insetos vetores de doenças humanas (LUO et al., 1997; SCHNEPF et al., 1998; MARROQUIN

et al., 2010; IBRAHIM et al., 2010; Van FRANKENHUYZEN, 2013). A proteína Cry1Ac de Bt é extremamente tóxica para esta praga e, atualmente, tem sido usada em todo o mundo em culturas transgênicas ou na forma de bioinseticidas formulados para o controle desta praga (AKHURST et al., 2003; TABASHNIK et al., 2012).

O modo de ação das proteínas Cry foi proposto e foi particularmente bem definido em proteínas Cry1A em *Manduca sexta* (Lepidoptera: Shingidae) (BRAVO et al., 2011). O processo de intoxicação de um inseto é complexo e composto de múltiplos eventos, envolvendo solubilização e ativação da proteína, interação da proteína com diferentes receptores no epitélio do intestino médio, oligomerização da proteína, inserção dos oligômeros na membrana, formação de poros na membrana, lise celular, choque osmótico resultando na morte do inseto (VACHON et al., 2012; PARDO-LOPÉZ et al., 2013).

O modelo de ligação sequencial proposto por Bravo et al. (2004) sugere que a proteína Cry após solubilizada e ativada no lúmen intestinal do inseto interage inicialmente com as proteínas aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP), ambas ancoradas em uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (GOMEZ et al., 2006). Esta interação ocorre com baixa afinidade, no entanto, esta ligação concentra a proteína ativada na superfície das microvilosidades apicais da membrana das células do intestino médio (BBMVs), que em seguida, liga-se com alta afinidade ao segundo receptor, uma proteína do tipo-caderina (GOMEZ et al., 2006). Essa interação com caderina facilita a clivagem proteolítica da extremidade N-terminal incluindo α -1 do domínio I e induz a oligomerização da proteína e a formação de um tetrâmero da proteína, conhecido como, estrutura pré-poro (GOMEZ et al., 2002). A estrutura oligomérica da proteína ganha uma alta afinidade aos receptores ancorados em GPI, ALP e APN (ARENAS et al., 2010). A ligação da estrutura pré-poro com ALP e APN finalmente conduz a proteína a inserção dentro da membrana, formação do poro, choque osmótico, lise celular e morte do inseto (PARDO-LOPEZ et al., 2013).

Entre as proteínas descritas na literatura como receptores proteicos envolvidos na interação das proteínas Cry1 às BBMVs de Lepidoptera, incluem, ALP e APN, uma proteína do tipo caderina e um glicoconjugado de 270KDa (BRAVO et al., 2007; PIGOTT & ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009). No entanto, tem-se sugerido, que outras moléculas podem estar envolvidas nesta interação, tais como glicolipídios

(GRIFFITTS et al., 2003), α -amilases (FERNANDEZ-LUNA et al, 2010) e um transportador do tipo ABC (ABCC2) (ZHOU et al., 2016). Além das proteínas já identificadas como receptores para Cry1Ac, outras proteínas podem estar envolvidas na interação com esta proteína e podem desempenhar papel fundamental para exercer o seu efeito tóxico, bem como podem estar relacionadas a mutações para resistência.

Concomitante a isso, existem vários estudos que demonstram uma diminuição significativa na susceptibilidade de *H. armigera* às proteínas Cry com o aumento de seu desenvolvimento larval (BIRD; AKHURST, 2007; LI; BOWER, 2012). Esta diferença de suscetibilidade da praga às proteínas Bt ao longo de seu desenvolvimento torna a eficiência da proteína dependente da composição etária da praga em campo, uma vez que os ínstaes tardios são os mais vorazes e os menos susceptíveis. Desta forma, é necessário um monitoramento etário constante da praga na área para realizar aplicação de bioinseticidas à base de Bt ou para avaliar a eficiência de controle por culturas Bt.

O mecanismo de resistência mais comum dos insetos às proteínas Cry, se dá pela redução de ligação da proteína aos receptores presentes nas BBMVs da membrana do intestino médio dos insetos, que em diferentes espécies de lepidópteros incluem mutações nos receptores caderina, ALP e APN, levando a uma menor afinidade de ligação da proteína Cry aos receptores intestinais, ou ainda, uma menor expressão destes receptores na membrana (RAUSSEL et al., 2000; GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; JURAT -FUENTES et al., 2004a; HERRERO et al., 2005; GRIKO et al., 2008; ZHANG et al, 2009).

Além disso, a identificação das moléculas de ligação das proteínas Cry tem sido realizada basicamente por técnicas *in vitro*. No entanto, existem poucos resultados de pesquisa que envolvam estas moléculas de ligação, como participantes no mecanismo de ação de proteínas Cry1A *in vivo*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de diferentes ínstaes larvais de *H. armigera* a proteína Cry1Ac e correlacionar com a capacidade de ligação da proteína às BBMVs isoladas de cada ínstar. Além disso, identificar por meio de ensaios de

imunoprecipitação as proteínas envolvidas na toxicidade de Cry1Ac em ínstaes iniciais e tardios de *H. armigera*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805)

Helicoverpa armigera (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de importância global, praga-chave na cultura do algodão em diversas regiões do mundo, e ataca várias espécies de importância agrícola, tais como, soja, milho, sorgo, trigo, feijão, tomate, hortaliças, plantas ornamentais (LAMMERS; MCLEOD, 2007; FATHIPOUR; NASERI 2011). Estima-se que a perda mundial anual causada por esta espécie em diferentes culturas chega a 5 bilhões de dólares (LAMMERS; MACLEOD, 2007). Sharma et al. (2008) relataram que a perda anual causada por *H. armigera* supera R\$ 5 bilhões na Europa e que o custo anual da aplicação de inseticidas nas lavouras, para o controle dessa praga é de R\$ 1,5 bilhão.

2.1.1 Origem e distribuição geográfica

H. armigera é uma espécie endêmica de regiões da África, Europa, Ásia continental, Japão, ilhas Canton e Fiji, Nova Zelândia, Nova Caledônia, Austrália, Nova Guiné, leste da Indonésia, Kiribati e Polinésia (HARDWICK, 1965) (EPPO, 2007; LAMMERS; MCLEOD, 2007).

Recentemente, tem sido relatada a ocorrência de *H. armigera* na América do Sul, sendo que em 2013 foi o primeiro relato de sua ocorrência no Brasil, atacando cultivos de soja e algodão, nos estados da Bahia, Mato Grosso e Goiás (CZEPACK et al., 2013), Paraguai (SENAVE, 2013), em 2014 na Argentina (MURÚA et al., 2014) e em 2016 no Uruguai (CASTIGLIONI et al., 2016). Porém, com a extensão da área infestada, é provável que *H. armigera* esteja presente em toda América do Sul, mesmo antes de sua primeira detecção (KRITICOS et al., 2015).

Embora o primeiro relato dessa espécie no Brasil tenha sido em 2013, Sosa-Gomez et al. (2016) enfatizam que provavelmente esta espécie já está presente no Brasil desde 2008 e passou despercebida por parte dos agricultores devido a sua semelhança com *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

Em 2015, o serviço de Inspeção Sanitária do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos reportou a primeira ocorrência de *H. armigera* no país, em um cultivo de tomate, na Flórida (APHIS, 2015). Desde que foi detectado a presença de *H. armigera*, em um cultivo de feijão, em Porto Rico, em setembro de 2014, especialistas têm alertado os produtores, principalmente, quanto ao seu monitoramento e desenvolvendo táticas de controle para conter o avanço da praga nos centros produtores dos EUA (APHIS, 2014).

2.1.2 Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera*

Entre os principais aspectos bioecológicos de *H. armigera* se destacam: polifagia, alta capacidade de migratória, alta capacidade reprodutiva, diapausa facultativa e rápido ciclo de vida. Estas características fisiológicas e ecológicas facilitam a sua sobrevivência, mesmo em habitats instáveis e favorecem sua adaptação às mudanças sazonais (NASERI et al., 2010). De acordo com Jadhav et al. (2013) todas estas características facilitam a dispersão global dessa espécie.

As fêmeas de *H. armigera* podem colocar até 3000 ovos em condições de laboratório, no entanto, seu potencial de fecundidade situa-se na faixa de 500-1000 ovos, dependendo das condições ambientais (MIRONIDIS; SAVOUPOLLOU, 2008). Frequentemente, a fecundidade desta espécie está em função da longevidade do adulto (geralmente 7-20 dias em condições de laboratório) (SOLEIMANNEJAD et al., 2010), condições climáticas e disponibilidade de hospedeiros (MAELZER; ZALUCKI, 1999).

O desenvolvimento larval de *H. armigera* compreende entre seis a sete ínstarres dependendo de condições climáticas. O limite mínimo de desenvolvimento oscila entre 11-12 °C, e são necessários aproximadamente 475 graus-dias para completar o ciclo da fase de ovo até a fase adulta. A temperatura ideal para o seu

desenvolvimento é de cerca de 31-34 °C, com um limite superior de cerca de 37-42 °C (MIRONIDIS; SAVOUPOLLOU, 2008).

Em regiões subtropicais e temperadas *H. armigera* entra em diapausa no seu estágio de pupa durante os meses de inverno (FITT, 1989). Em regiões tropicais, poucas populações de *H. armigera* entram diapausa, isto ocorre devido ao alto regime de chuvas e a alta abundância de plantas hospedeiras que permitem a sobrevivência da praga durante todo o ano (MAELZER; ZALUCKI, 1999). Em geral, a diminuição do fotoperíodo juntamente com baixas temperaturas durante os estádios larvais e pré-pupa determinam a proporção da população de *H. armigera* que entra em diapausa, com as temperaturas de primavera/inverno determinando o tempo de emergência (DUFFIELD; DILLON, 2005).

2.1.3 Aspectos morfológicos de *Helicoverpa armigera*

H. armigera é um inseto holometábolo, ou seja, possui metamorfose completa (ovo-larva-pupa-adulto). Os ovos desta espécie são inicialmente de coloração branco-amarelada com aspecto brilhante logo e tornam-se marrons perto da eclosão da larva (ALI; CHOUDHURY, 2009). As fêmeas ovipositam durante o período noturno e os ovos são colocados isoladamente ou em pequenos grupos, preferencialmente na face abaxial (inferior) das folhas ou sobre talos, flores, frutos e brotações terminais das plantas hospedeiras (MENSAH, 1996).

O desenvolvimento da fase larval de *H. armigera* estende-se por seis ínstares em condições tropicais. Os ínstares iniciais apresentam coloração branco-amarelada a marrom-avermelhada e cápsula cefálica entre marrom-escuro a preto. As lagartas alimentam-se inicialmente das partes mais tenras das plantas, onde podem produzir um tipo de teia, característico de noctuídeos. À medida que as lagartas se desenvolvem apresentam listras de coloração marrom lateralmente no tórax, abdômen e na cabeça, de modo que, o tipo de dieta utilizado pela larva pode influenciar na sua coloração (ÁVILA et al., 2013).

A partir do quarto ínstar, as lagartas passam a apresentar tubérculos escuros e bem visíveis na região dorsal do primeiro segmento abdominal, o que auxilia em sua identificação e diferenciação de outras espécies de Heliothinae (CZEPAK et al., 2013).

Além disso, uma particularidade desta espécie é o tegumento levemente coriáceo, o que tem sido frequentemente relacionado com a alta capacidade de resistência que populações deste inseto aos inseticidas, especialmente para os produtos que têm ação de contato, como piretroides, organofosforados e carbamatos (AHMAD et al., 2001; MCCAFFERY; NAUEN, 2006).

O adulto de *H. armigera* apresenta, sobre as asas anteriores, uma linha com sete a oito manchas, além de uma faixa marrom ampla transversal, na parte central, ocorre uma marca em forma de vírgula. As asas posteriores são mais claras e na extremidade apical apresentam uma borda marrom escura, com uma mancha clara no centro (EPPO, 1981) (Figura 1).

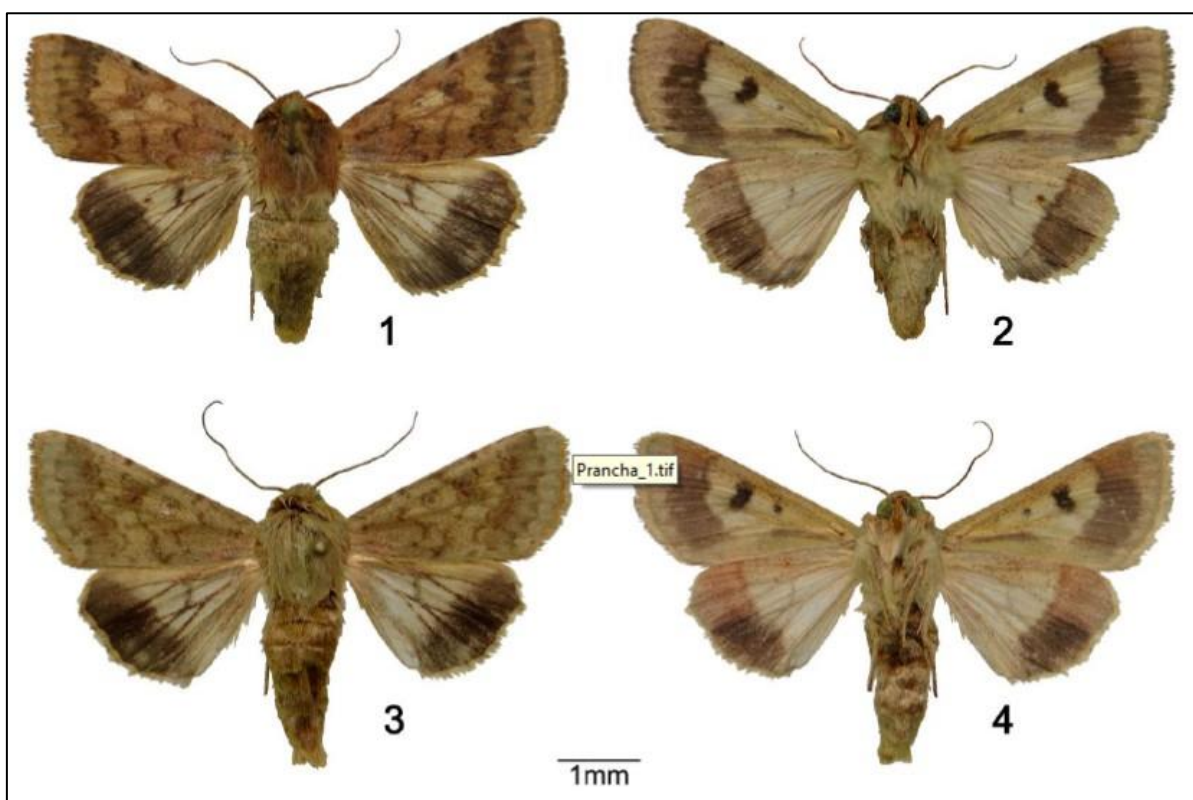


Figura. 1. Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas de adultos de *Helicoverpa armigera*. Vista dorsal (1) e ventral (2) da fêmea; vista ventral (3) e dorsal (4) do macho, adaptado de Santos (2016).

2.2 *Bacillus thuringiensis* Berliner: Uma bactéria com propriedades inseticidas

A atividade inseticida da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi reconhecida muito antes da bactéria ser identificada, alguns relatos têm sugerido que Bt tenha sido

usado anteriormente nas civilizações antigas como a egípcia e chinesa (SANAHUJA et al, 2011). No entanto, esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1901 pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwatari, quando investigava a causa de uma doença que dizimava grandes populações de bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Posteriormente, em 1911, a mesma bactéria foi isolada por Ernst Berliner a partir da traça-da-farinha do Mediterrâneo, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) na província alemã da Turíngia, por esta razão ela foi chamada de *Bacillus thuringiensis* Berliner (SIEGEL, 2000).

Bt é uma bactéria gram-positiva, pertencente à família Bacillaceae e ao Grupo *cereus*, que inclui *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus weihenstephanensis* (SAUKA; BENITENDE, 2008). Este grupo de bactérias é caracterizados principalmente pela formação de endósporos e por crescerem na presença de oxigênio.

B. anthracis e *B. cereus* são agentes patogênicos de mamíferos, *B. anthracis* é o agente causador do antraz, uma doença aguda, e muitas vezes letal para os seres humanos e animais, enquanto que, *B. cereus* é um agente patogênico humano, oportunista, que pode causar gastroenterite, infecções oculares e doença periodontal, entre outras doenças (IBRAHIM et al., 2010). Bt se distingue dos outros membros do Grupo *cereus* pela característica de produzir cristais durante a sua fase esporulação. As inclusões cristalinas, conhecidos como proteínas Cry, produzidos por esta bactéria são naturalmente tóxicas para organismos invertebrados, especialmente, algumas ordens de insetos.

2.2.1 Aspectos gerais das proteínas Cry

As proteínas Cry definidas são inclusões cristalinas produzidas por Bt, que possuem atividades inseticidas contra organismos alvos, principalmente, diferentes ordens de insetos, tais como, Coleoptera (subsp. *Morrisoni* biovar *tenebrionis*), Diptera (subsp. *israelensis*) e Lepidoptera (subsp. *kurstaki*, *aizawai* e *galleriae*), bem como para outros invertebrados, como nematoides e protozoários (SCHNEPF et al., 1998; IBRAHIM et al. 2010). As proteínas Cry têm sido amplamente utilizadas no controle de pragas na agricultura, seja na inserção e expressão de genes *cry* em plantas ou

em produtos formulados para pulverização. Estas proteínas têm sido reconhecidas como proteínas formadoras de poros, agem principalmente no tecido digestivo dos insetos, causando disrupção das células do epitélio intestinal, choque osmótico e morte do inseto alvo (BRAVO et al., 2007).

A classificação das proteínas Cry baseia-se atualmente na identidade de sequência de aminoácidos. As sequências de genes *cry* foram divididas em pelo menos quatro famílias de proteínas filogeneticamente não-relacionadas que podem ter diferentes modos de ação: a família de três domínios das proteínas Cry (3D), a família de proteínas Cry mosquitocidas (Mtx), a família do tipo-binária (Bin) e a família das proteínas Cyt (Cyt). Além disso, algumas cepas de Bt produzem proteínas inseticidas em sua fase de crescimento vegetativo, nomeadas proteínas VIP (BRAVO et al., 2011). Atualmente, existem cerca de 74 subgrupos principais de proteínas Cry (Cry1, Cry2, Cry3, Cry74), variando de 369 (Cry34) a 1344 aminoácidos (Cry43) (ADANG, CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

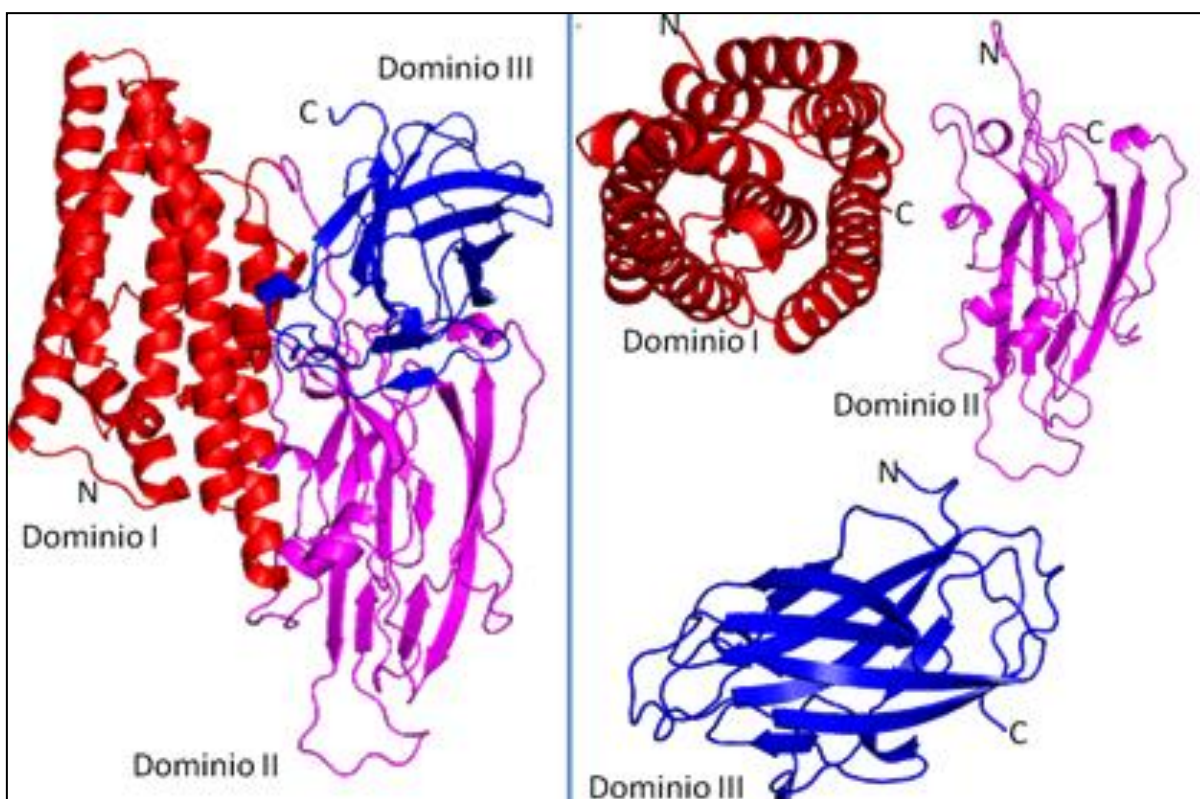


Figura 2. Estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa (PDB: 1C1Y). a) Domínio I está representado na cor vermelha; enquanto que o domínio II e domínio III estão

representados na cor rosa e azul, respectivamente. b) rotação em z do domínio I, o domínio III está rotacionado em 90°. Adaptado de Grochulski et al. (1995).

A maior família de proteínas Cry, compreende as proteínas do grupo 3D, sendo que representam 89% de todas proteínas Cry atualmente descritas, formadas por pelo menos 40 subgrupos. A Figura 2 mostra a estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa. O domínio I é formado por um agrupamento de sete α -hélices e está envolvido na inserção da proteína dentro da membrana, oligomerização da proteína e formação de poros. O domínio II é um beta-prisma de três folhas β -antiparalelas em torno de um núcleo hidrofóbico com regiões de alças expostas que estão envolvidas no reconhecimento do receptor. O domínio III, é um β -sanduíche de duas folhas β antiparalelas. Ambos os domínio II e III estão envolvidos na especificidade do inseto alvo, por mediar interações específica com as proteínas presentes nas microvilosidades apicais do epitélio do intestino médio (BRAVO et al., 2007).

2.2.2 Modo de ação das proteínas Cry

Uma das características mais importantes das proteínas Cry é a sua alta especificidade aos insetos alvo. Esta especificidade é em grande parte determinada pela capacidade de ligação específica das proteínas Cry aos receptores presentes na superfície das microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio das lagartas (BBMVs) (BRAVO et al., 2011). No caso dos lepidópteros, as proteínas de união às proteínas Cry são: caderina, ancoradas em glicosilfosfatidil inositol (GPI), como a aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP), glicoconjugado de 270 kDa e uma proteína chamada P252 (BRAVO et al., 2007; PIGGOT e ELLAR, 2007). Este mecanismo pode ser ainda mais complexo, uma vez que outras moléculas podem estar envolvidas, tais como glicolipídios (GRIFFITTS et al., 2003), α -amilases (FERNANDEZ-LUNA et al, 2010) e um transportador do tipo ABC (ABCC2) (ZHOU et al., 2016).

O mecanismo de ação de proteínas Cry tem sido extensivamente estudado na ordem Lepidoptera, especialmente na espécie *Manduca sexta*. Atualmente, os dois modelos principais para descrever o mecanismo molecular de atividade das proteínas Cry é o modelo de ativação pela proteína quinase A (PKA) proposto por Zhang et al.

(2006) e o modelo de ligação sequencial proposto por Bravo et al. (2004). O primeiro foi proposto mediante a expressão heteróloga do receptor do tipo caderina de *M. sexta* em linha celular *High Five*TM, de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) e o segundo modelo foi proposto com base em dados obtidos em *M. sexta*, ambos têm sido propostos para descrever a atividade da proteína Cry1Ab. Além disso, um terceiro modelo tem sido proposto para explicar o modo de ação da proteína Cry1Ac em *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Este modelo sugere que a citotoxicidade da proteína Cry se deve a efeitos combinados de lise osmótica e sinalização intracelular, e, portanto, elementos de ambos os modelos propostos por Bravo et al. (2004) e Zhang et al. (2006).

O modelo de ativação de PKA sugere que uma única interação da proteína com o receptor primário induz a morte dos insetos susceptíveis, enquanto que o modelo de ligação sequencial envolve a interação com pelo menos três moléculas após o cristal ser ingerido, resultando na formação de poros na membrana do epitélio do intestino do inseto. Ambos os modelos concordam nos primeiros passos de solubilização e ativação da proteína no lúmen intestinal do inseto.

2.2.2.1 Modelo de ativação pela PKA

Zhang et al. (2006) propõe que a correlação entre a formação de poros e a citotoxicidade não foi demonstrada adequadamente e sugere um modelo de modo de ação alternativo em que a proteína Cry1Ab mata as células de inseto exclusivamente por lise osmótica.

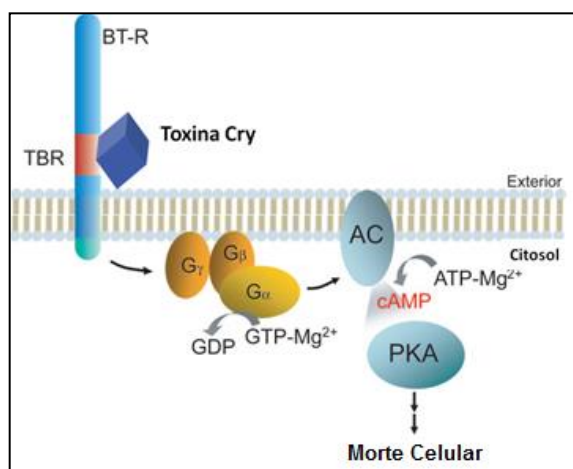


Figura 3. Modelo de ativação pela proteína quinase A (PKA). Adaptado de Zhang et al. (2006).

De acordo com este modelo, a proteína monomérica Cry1Ab se une especificamente ao receptor do tipo caderina e inicia uma cascata de sinalização dependente de Mg^{2+} . Esta cascata estimula a síntese da proteína G, da proteína adenilato ciclase, acumulação de AMP cíclico (AMPc) e ocorre a ativação da proteína PKA. A proteína PKA uma vez ativada, leva a desestabilização das células do citoesqueleto, dos canais iônicos da membrana e subsequente a morte celular (Figura 3).

2.2.2.2 Modelo de ligação sequencial

O modelo de ligação sequencial foi sugerido por Bravo et al. (2004) e tem sido particularmente bem definido mediante a ação da proteína Cry1Ab em *M. sexta* (Figura 4). O cristal proteico é ingerido pelo inseto e dissolvido devido ao alto pH no lúmen intestinal do inseto, a protoxina é então, processada proteoliticamente por proteases alcalinas presentes no lúmen, liberando um fragmento tóxico ativo de 65 kDa. A proteína Cry passa por complexos eventos de ligação sequenciais com as diferentes proteínas presentes nas BBMVs, resultando na inserção da mesma na membrana, formação de poro e posterior morte do inseto.

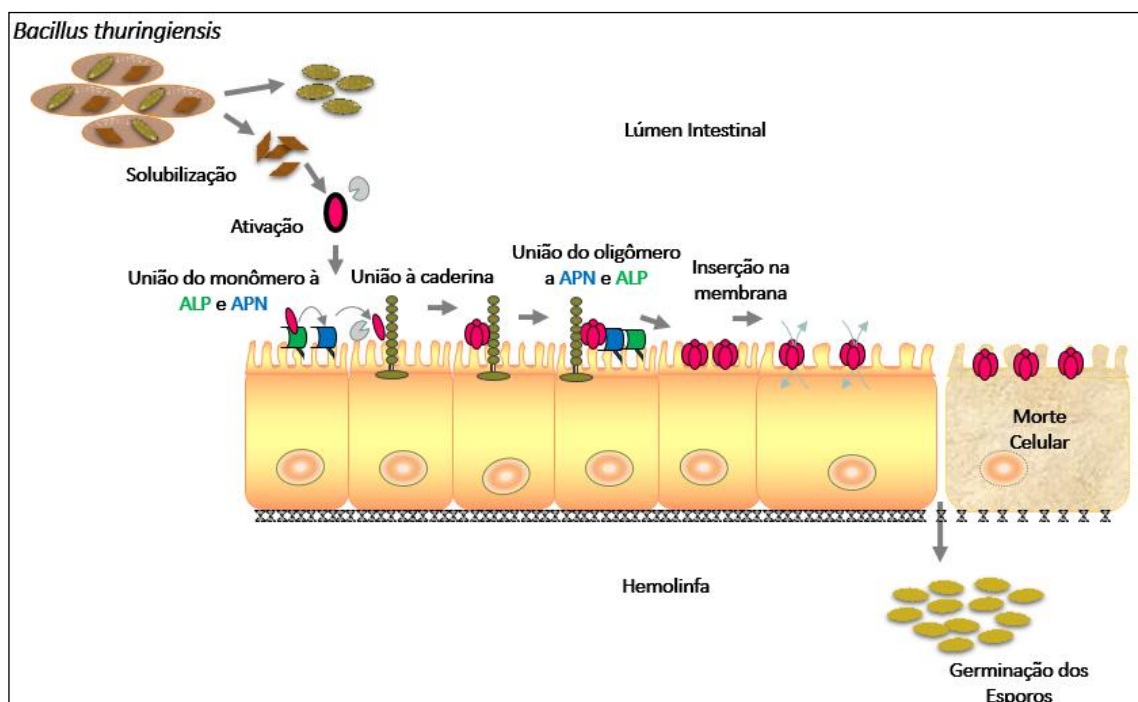


Figura 4. Mecanismo de ação de proposto para descrever a atividade inseticida da proteína Cry1Ab em *Manduca sexta* segundo o modelo de ligação sequencial proposto por Bravo et al. (2004). Adaptado de Pacheco et al. (2009).

A primeira interação de ligação da proteína Cry ocorre através de regiões expostas do domínio II e o domínio III da mesma com APN e ALP de *M. sexta* (GOMEZ et al., 2006). Esta interação ocorre com baixa afinidade, no entanto, esta ligação concentra a proteína ativada na superfície das microvilosidades apicais da membrana das células do intestino médio, que em seguida, liga-se com alta afinidade ao segundo receptor, um receptor do tipo-caderina, através de alças expostas do domínio II, incluindo a α -2 e α -8 e particularmente a alça 3 em *M. sexta*, *H. virescens* e *B. mori* (XIE et al., 2005; GOMEZ et al., 2006; ATSUMI et al., 2008). Essa interação com caderina facilita a clivagem proteolítica da extremidade N-terminal incluindo α -1 do domínio I, que induz a formação de um oligômero da proteína, conhecido como estrutura pré-poro (GOMEZ et al., 2002). A estrutura oligomérica da proteína ganha uma alta afinidade aos receptores ancorados em GPI, ALP e APN, envolvendo a alça 2 do domínio II (ARENAS et al., 2010). A ligação da estrutura pré-poro com ALP e APN finalmente conduz às proteínas a inserção na membrana, causando a formação do poro, choque osmótico, lise celular e morte do inseto por septicemia (PARDO-LOPEZ et al., 2013).

2.2.3 Interação dos receptores com proteínas Cry1A

A identificação das moléculas de ligação das proteínas Cry1A tem sido realizada basicamente por técnicas *in vitro*, tais como, ensaios de imunoprecipitação, *ligand blot* e recentemente, através de estudos de proteômica. No entanto, existem poucos resultados de pesquisa que envolvam estas moléculas de ligação, como participantes no mecanismo de ação das proteínas Cry1A *in vivo*.

2.2.3.1 Aminopeptidase N

A família das enzimas aminopeptidases é uma classe de enzimas que desempenham um papel importante na degradação de proteínas durante a digestão. Estas enzimas catalisam a clivagem de aminoácidos localizados na extremidade amino terminal dos peptídeos e proteínas (PIGOTT; ELLAR, 2007). Estas enzimas

estão largamente distribuídas em organismos procariotos e eucariotos, além disso, tem sido sugerido, que estão envolvidas no transporte de peptídeos através das BBMV's (ANTONOV et al., 1984). As aminopeptidases de insetos pertencem à família das aminopeptidase N (APN) e estão presentes em alta abundância nas BBMV's do intestino (WANG; ZHANG, 2005).

A APN foi a primeira molécula descrita como receptora para a proteína Cry1Ac por KNIGHT e ELLAR (1994). A partir disso, trabalhos tem sugerido que APN é uma proteína de ligação *in vitro* de outras proteínas Cry1A em insetos da ordem Lepidoptera (MASSON et al., 1995; YAOI et al., 1997; COOPER et al., 1998; ZHANG et al., 2009; PACHECO et al., 2009). Em *M. sexta*, quatro isoformas foram relatados de APN como receptoras para proteínas Cry1A, APN1 (KNIGHT et al., 1994), APN2 (DENOLF et al., 1997), APN3 e APN4 (DANIEL; ADANG, 2002), no entanto, sua participação *in vivo*, apenas foi estudada em APN1 no mecanismo de ação da proteína Cry1Ac.

Pesquisas que abordam a importância da APN no mecanismo de ação *in vivo* em outros lepidópteros são escassas. No entanto, têm sido conduzidos estudos utilizando técnicas de RNA de interferência para compreender o papel funcional de APN como receptor das proteínas Cry1 em várias espécies de lepidópteros *in vivo*. Em *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), observou-se que após o silenciamento do gene *apn*, as lagartas foram menos susceptíveis à proteína Cry1Ca (RAJAGOPAL et al., 2002). Em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), os ensaios realizados *in vivo* por Yang et al. (2010) demonstraram que o silenciamento de três diferentes isoformas de APN, resultaram numa diminuição significativa da susceptibilidade à proteína Cry1Ab. Além disso, a participação de APN *in vivo* tem sido associada com a evolução da resistência às proteínas Cry1, e esta tem sido correlacionada com a diminuição da expressão dos transcritos ou mutações no gene *apn* (ZHANG et al., 2009).

2.2.3.2 Fosfatase Alcalina

As fosfatases alcalinas (ALP) são proteínas do tipo hidrolases responsáveis por catalisar a remoção de grupos fosfato a partir de muitas moléculas, incluindo

nucleotídeos, proteínas e alcaloides. ALP são encontradas praticamente na maioria dos animais e estão localizados principalmente nas células epiteliais do intestino dos insetos. Tem sido proposto que ALP estejam envolvidos na absorção dos metabolitos e em processos de transporte de peptídeos nas membranas do epitélio do intestino médio dos insetos (EGUCHI, 1995).

A função de ALP como receptores das proteínas Cry tem sido investigado recentemente. Desta forma, os trabalhos referentes ao seu papel funcional são limitados, em comparação com APN e o proteínas do tipo caderina. Entretanto, resultados preliminares sugerem que ALP pode atuar como receptor em alguns lepidópteros, coleópteros e dípteros.

Alguns autores têm demonstrado por análises de *ligand blot* que ALP é receptor da proteína Cry1Ac em *M. sexta* (MCNALL; ADANG, 2003) e *H. virescens* (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004a). Além disso, também se tem sugerido que funcionam como receptores para as proteínas Cry1Ab em *M. sexta* (ARENAS et al., 2010) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) para as proteínas Cry4Ba (DECHKLAR et al., 2011) e Cry11Ba (HUA et al., 2008). Jurat-Fuentes et al. (2011) associou diferentes mecanismos de resistência de *H. armigera*, *H. virescens* e *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) com diferenças na expressão de ALP. Estes autores observaram que os insetos resistentes as proteínas Cry1 apresentavam menor expressão de transcritos e menor atividade enzimática de ALP.

Atualmente, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação das proteínas Cry em diferentes espécies e ordem de insetos. No entanto, vários aspectos da toxicidade destas proteínas ainda permanecem obscuros. Este trabalho visa aumentar o entendimento do modo de ação da proteína Cry1Ac sobre *H. armigera*, um importante lepidóptero praga em importantes culturas no Brasil e em diferentes países do mundo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação dos ínstaes de *H. armigera*

A determinação do número de ínstaes e sua duração em *H. armigera* foi realizada segundo metodologia proposta por Parra e Haddad (1989). Medições das cápsulas cefálicas de cada larva foram realizadas diariamente em 20 lagartas de *H. armigera*, desde sua eclosão até a passagem para fase de pupa. Para determinação da razão de crescimento das cápsulas cefálicas, seguiu-se a regra de Dyar (DALY, 1890). As lagartas usadas foram provenientes do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Jaboticabal-SP. Os insetos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. A criação dos insetos foi realizada seguindo a metodologia apresentada por Pinóia (2012) e dieta artificial como descrito por Greene et al. (1976).

3.2 Bioensaios de toxicidade

Os bioensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG. Foi utilizado o método de contaminação superficial, como descrito em Arenas et al. (2010). Os mesmos foram realizados em recipientes plásticos esféricos de 3 cm de diâmetro e 2 cm de altura, totalizando uma área de superfície de $7,07 \text{ cm}^2$. Em cada recipiente foi vertido 3 mL de dieta artificial. Após a secagem da dieta, foi aplicada superficialmente uma alíquota de cristais puros de Cry1Ac e transferida uma larva *H. armigera* de cada ínstar larval. Os bioensaios foram realizados com lagartas do 1º ao 6º ínstar de *H. armigera*, com 6 concentrações de proteína Cry1Ac e 48 lagartas por concentração. Foram realizados testes prévios de mortalidade para determinação das concentrações de proteínas a serem utilizadas para cada ínstar. A avaliação foi feita sete dias após à exposição das lagartas à dieta contaminada com Cry1Ac. Os insetos foram mantidos em sala climatizada ajustada para a temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. A concentração letal (CL_{50}) de cada ínstar foi estimada através por análise de Probit ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.3 Expressão, purificação e ativação proteolítica da proteína Cry1Ac

As inclusões cristalinas de Cry1Ac foram produzidas e expressas na cepa HD-73 de Bt, as colônias bacterianas foram cultivadas em meio ágar HCT, por 72 h à 30 °C. Após completa esporulação, as colônias foram recuperadas e suspensas em água destilada (pH 4,0) e centrifugadas a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a pastilha sedimentada suspensa em solução com 0,3 M de NaCl, 0,01 M de EDTA, pH 8,0 e centrifugadas três vezes a 10000 x g por 10 min. Após isso, o sobrenadante foi descartado e a pastilha ressuspensa em fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 1 mM e centrifugada por mais três vezes a 10000 x g por 1 min. Após isso, a pastilha resultante foi suspensa em solução contendo PMSF e uma alíquota de 1mL foi centrifugada a 10000 x g por 10 min. A pastilha foi recuperada em 2 mL de tampão de carbonatos e centrifugada a 700 x g por 20 min à 37 °C por três vezes, ao final das centrifugações, o sobrenadante foi recuperado. A protoxina Cry1Ac foi ativada por proteólise utilizando tripsina pancreática bovina (Sigma) (1:20; v/v), a incubação foi mantida por 1 h a 700 x g à 37 °C. Após incubação, a reação foi inativada adicionando PMSF 1M e centrifugado a 10000 x g por 10 min. A concentração de protoxina e proteína Cry1Ac ativada foi quantificada pelo método de Bradford (1976) usando soro albumina bovina (BSA) como padrão e verificada em gel SDS-PAGE (10%).

3.4 Extração do intestinos e preparação das BBMV's

Aproximadamente 1 g de tecido intestinal de cada ínstar de *H. armigera* foram dissecados de acordo com a metodologia proposta por Wolfersberger (1993). As lagartas foram previamente refrigeradas por 15 min e seccionadas próximo ao quarto par de apêndices abdominais e primeiro par de apêndices torácicos. O tegumento foi aberto e afastado para expor o intestino médio. A membrana peritrófica e os túbulos de Malpighi foram retirados com auxílio de pinças e fórceps. O intestino médio foi lavado com solução tampão MET gelado (0,2 M de manitol, 17 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 7,5) e acondicionados em tubos Eppendorf e imediatamente estocados em freezer -70 °C para posterior preparação das BBMV's. A extração dos intestinos e

preparação das vesículas foram realizadas no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo.

As BBMV's foram preparadas segundo metodologia proposta por Wolfersberger (1993). Alíquotas de 2 g de intestino foram transferidos para tubo Falcon contendo 10 mL de tampão de homogeneização MET gelada (300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, 10mM de Hepes, 5mM de EGTA, 2mM de DTT e 1mM de PMSF, 600 µg/mL de sulfato de neomicina, 100/mL de leupeptatina, 5 µg/mL de peptatina e pH 7,4) e submetidos a 9 pulsos em homogeneizador "blender-polytron" (Glass-Col® Terre Haunt, USA), com duração de 1 min cada. Após homogeneização, foram adicionados 10 mL de solução com 24 mM de MgCl₂ e incubado em gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 4500 x g por 15 min e a 16000 rpm por 30 min a 4 °C em rotor Beckman JA-20. Após isso, o sobrenadante foi descartado e a pastilha ressuspensa em solução contendo tampão MET gelado e 24 mM MgCl₂ (1:1, v/v) e repetido o processo de centrifugações. A pastilha foi ressuspensa, homogeneizada em água deionizada e tampão MET (1:1, v/v) e estocadas a -70 °C até a sua utilização. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) usando BSA como padrão (Pierce).

3.5 Atividades enzimáticas de ALP e APN

A partir desta etapa, todos os ensaios foram realizados no Laboratório Bravo/Sobserón, no Instituto de Biotecnologia da Universidade Autónoma do México (UNAM), Cuernavaca, México. A atividade de APN e de ALP determinada como descrito em Arenas et al. (2010). Foram utilizados L-leucina-*p*-nitroanilina (LPN) e *p*-nitrofenol-fosfato (PNS) como substrato para determinação de APN e ALP, respectivamente. O conteúdo enzimático foi quantificado pelo método colorimétrico DC (Bio-Rad) usando BSA como padrão (Pierce). A taxa inicial de 405 nm foi utilizada para calcular a atividade de ambas enzimas. Para determinação da atividade de APN, foi utilizada a solução com 400 µL de H₂O mili-Q, 200 µL de Tris-HCL 1 M, 250 µL de NaCl 1M, 100 µL de LPN, 5 µL de BBMV's e realizada a leitura. Para determinação da atividade de ALP, 2,5 µL de BBMV's foram incubadas em 250 µL de PNS por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 250 µL de EGTA e

realizada a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec II; GE Healthcare). Uma unidade de atividade específica de APN foi definida como a quantidade de enzima para catalisar a hidrólise de 1 μmol de LPN.mg de proteína⁻¹.min⁻¹ a 25 °C. O coeficiente de absorção de LPN usado foi de $9,9 \times 10^{-3} \cdot \text{mol}^{-1}$. Uma unidade de atividade de ALP específica foi definida como a quantidade de enzima para produzir 1 μmol de PNS.mg de proteína⁻¹.min⁻¹ a 25 °C.

A determinação da atividade de ALP em gel foi realizada como descrito em Upadhyay e Singh (2011). Uma fração de 20 μg de BBMV de cada ínstar larval de *H. armigera* foi separado em 10% de gel de poliacrilamida. O gel contendo as proteínas ALP foi lavado com Tris-HCl 0,1 M, NaCl 100 mM, MgCl₂ a 50 mM, pH 9,5 durante 10 min. Para detecção de ALP o gel foi lavado com substrato BCIP/NBT (Sigma) até total visualização das proteínas referentes a ALP.

3.6 Ensaios de ligação de ELISA

Uma fração de 100 ng de BBMV/poço de ELISA de cada ínstar larval de *H. armigera* foi suspenso em tampão fosfato salino (PBS) e incubado durante toda a noite a 4 °C. Uma placa de ELISA com 96 poços foi utilizada. Após incubação, cada poço foi bloqueado com 200 μl de PBS + leite em pó (2%) e incubados a 37 °C durante 2 h. Cada poço foi lavado três vezes com tampão de PBS seguido por incubação com diferentes concentrações de proteína Cry1Ac (0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 nmols) a temperatura ambiente. O excesso de proteína não ligada foi removido por lavagem com PBS + Tween 20 (0,1%) e cada poço foi incubado com anticorpo anti-Cry1Ac (1/30000) durante 1 h. Após a lavagem, os poços foram incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase durante 1 h. Após a lavagem, adicionou-se solução de substrato e mediu-se a absorbância a 490 nm.

3.7 Ensaio de imunoprecipitação

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados como descrito em Zhou et al. (2016), com algumas modificações. A proteína Cry1Ac ativada foi purificada pelo método de afinidade iônica acoplando 1mg de proteína a CNBr ativada com Sepharose 4B™ (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. 1 mg

de proteína Cry1Ac ativada e purificada foi incubado com 500 µL de agarose CNBr em 0,1 M de NaHCO₃, 0,5 de NaCl, pH 8,3 a 4 °C durante toda a noite. O CNBr livre não ligado foi bloqueado por incubação com 0,1 M de Tris-HCl a 4°C por 2 h. A proteína Cry1Ac não ligada foi removida por 5 lavagens com 500 µL de solução PBS conforme descrito pelo fabricante.

Após a incubação, 500 µg de proteínas de BBMVs de segundo e quinto ínstar previamente solubilizadas foram incubadas com 50 µL de agarose CNBr-Cry1Ac. As proteínas de BBMVs não ligadas foram removidas por centrifugação a 30000 x g durante 30 min a 4 °C. A amostra de CNBr-Cry1Ac foi lavada 3 vezes com 500 µL de PBS suplementado com 1 M de NaCl, seguido por três lavagens com 500 µL de PBS para remover todas as proteínas não ligadas. As proteínas que permaneceram ligadas à CNBr-Cry1Ac foram consideradas proteínas de ligação à Cry1Ac e foram dissociadas da agarose por aquecimento durante 10 min em 30 µL de tampão de eletroforese (0,1 de Tris-Cl, 0,2 M de DTT, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, pH 6,8) e separadas por SDS-PAGE (12%).

3.8 Identificação das proteínas por LC-MS/MS

O gel separado por SDS-PAGE (12%) referente as proteínas de BBMVs de lagartas de segundo e quinto ínstar foi cortado em cinco e sete frações, respectivamente, de acordo com a disposição das proteínas no gel. Os géis contendo as proteínas foram enviadas ao Laboratório de Proteômica do Instituto de Biotecnologia da UNAM para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massa (LC-MS/MS). LC-MS/MS foi usado para a identificação das proteínas nativas isoladas das BBMVs de diferentes instares de *H. armigera* que se ligaram à proteína Cry1Ac ativada.

Os dados foram pesquisados por HPRC contra ncbi_Insecta_201401 201401 usando o motor de busca Mascote (Matrix) Ciência, Londres, Reino Unido. As identificações peptídicas foram aceitas caso atendessem uma probabilidade pré-estabelecida superior a 50% conforme especificado pelo Algoritmo PeptideProphet (KELLER et al., 2002). Identificações das proteínas foram aceitas caso atendessem a probabilidade pré-estabelecida superior a 90%, continham pelo menos dois peptídeos

únicos identificados e uma sequência de cobertura > 4%. As probabilidades de proteínas foram atribuídas pelo algoritmo ProteinProphet (NESVIZHSKII et al., 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação dos ínstaes de *Helicoverpa armigera*

Seis ínstaes foram determinados para *H. armigera*, com uma razão média de crescimento de 1,56. A razão aproximada de 1,5 apresentada em todos os ínstaes permitiu corroborar a identificação visual de duração dos ínstaes (Tabela 1).

A determinação do número e duração dos diferentes ínstaes de uma espécie é extremamente importante para definir a idade certa das lagartas a serem utilizadas em bioensaios de susceptibilidade. Além disso, conhecer a idade precisa de cada ínstar larval é importante para realização das dissecações dos intestinos e todas avaliações relativas às BBMV's, visto que as concentrações e atividades enzimáticas, podem variar de acordo com o balanço hormonal no controle da metamorfose e tem influência direta na alimentação do inseto.

Tabela 1. Média da largura da cápsula cefálica (CC) (mm) e $\pm$ intervalo de confiança de 95%, número de larvas (n) e razão de crescimento (RC) entre os ínstaes larvais de *Helicoverpa armigera*

Ínstar	CC $\pm$ IC 95%	n	RC
1º	0,252 $\pm$ 0,022	20	1,54
2º	0,389 $\pm$ 0,037	20	1,64
3º	0,636 $\pm$ 0,0091	20	1,49
4º	0,951 $\pm$ 0,0116	20	1,61
5º	1,526 $\pm$ 0,0132	20	1,50
6º	2,288 $\pm$ 0,0133	20	--
Média	--	--	1,56

4.2 Bioensaios de toxicidade

A concentração letal capaz de matar 50% dos insetos (CL₅₀) de cada ínstar aumentou do primeiro para o sexto ínstar, 31,1 e 2525,4 ng/cm², respectivamente. As lagartas de primeiro ínstar foram mais susceptíveis a proteína Cry1Ac, enquanto que as lagartas de terceiro e quarto ínstar de *H. armigera* foram as únicas que apresentaram CL₅₀ estatisticamente semelhantes, 535,7 e 602,8 ng/cm², respectivamente. As lagartas dos demais ínstares tiveram sua susceptibilidade reduzida à proteína Cry1Ac com o aumento do desenvolvimento larval. As lagartas de sexto ínstar de *H. armigera* foram 80 vezes menos sensíveis a proteína Cry1Ac do que as de primeiro ínstar (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração letal (CL₅₀) estimada de Cry1Ac para diferentes ínstares larvais de *Helicoverpa armigera*.

Ínstar	CL ₅₀ (IC 95%) ¹	Slope ²	χ ² ³	Toxicidade Relativa ⁴
1º	31,1 (30,5 - 31,8)	0,0115 ± 0,0010	0,518	--
2º	318,2 (312,5 - 323,8)	0,0018 ± 0,0009	0,508	10,21
3º	535,7 (507,5 - 566,3)	0,1538 ± 0,0004	0,501	17,20
4º	602,8 (547,8 - 655,2)	0,0518 ± 0,0011	0,984	19,36
5º	1420,6 (1330,8 - 1505,3)	0,0322 ± 0,0021	0,541	45,62
6º	2525,4 (2372,7 - 2674,4)	0,0217 ± 0,0008	0,589	80,25

¹ Intervalos de confiança de 95% de probabilidade que não se sobrepõe indicam diferenças estatisticamente significativas entre valores de CL₅₀;

² Coeficiente angular ± erro padrão;

³ Qui-quadrado ($P < 0,05$);

⁴ Toxicidade relativa em relação ao primeiro ínstar larval.

4.3 Ativação proteolítica da proteína Cry1Ac

Os perfis proteicos da protoxina Cry1Ac e proteína Cry1Ac ativada separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%) apresentaram bandas equivalentes à 130 e 65 KDa, compatíveis com o tamanho esperado para a sua forma não ativada e ativada, respectivamente (Figura 5).

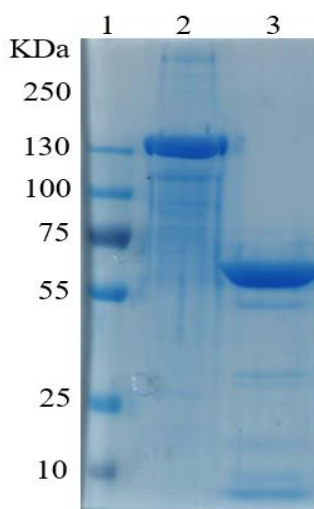


Figura 5. Perfil proteico de proteína Cry1Ac em sua forma não ativada e após ativação com tripsina em SDS-PAGE 10%. 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2: protoxina Cry1Ac (~130kDa); 3: proteína Cry1Ac ativada (~65kDa).

4.4 Atividades de ALP e APN

As BBMVs foram preparadas a partir de homogeneizados de intestino médio de lagartas de diferentes ínstares larvais e a qualidade das BBMVs foi determinada através da análise do enriquecimento de ALP e APN (Tabela 3). As diferentes preparações de BBMVs apresentaram um aumento médio na atividade específica de ALP e APN de aproximadamente 4,5 e 10,3, respectivamente.

Tabela 3. Atividade específica das enzimas aminopeptidase-N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) no homogeneizado total e BBMVs isoladas de diferentes ínstares de *Helicoverpa armigera* e seus respectivos incrementos

Ínstar	Homogeneizado Total		BBMVs			
	Atividade de ALP ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) ¹	Atividade de APN ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) ²	Atividade de ALP ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) ¹	Atividade de APN ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) ²	Incremento de ALP ³	Incremento de APN ³
1º	216,2 $\pm$ 12,7	19,2 $\pm$ 1,0	405,3 $\pm$ 14,1	195,1 $\pm$ 18,8	1,87	10,24
2º	63,1 $\pm$ 9,8	29,2 $\pm$ 2,1	391,2 $\pm$ 17,3	367,4 $\pm$ 19,1	5,75	12,71
3º	129,4 $\pm$ 16,7	28,7 $\pm$ 2,8	554,6 $\pm$ 22,6	369,6 $\pm$ 20,6	4,27	13,05
4º	100,5 $\pm$ 11,8	67,8 $\pm$ 5,8	772,5 $\pm$ 20,6	378,2 $\pm$ 21,0	7,71	5,64
5º	311,9 $\pm$ 10,1	154,9 $\pm$ 11,6	1531,1 $\pm$ 25,1	1506,4 $\pm$ 30,8	4,91	9,73
6º	459,1 $\pm$ 11,4	62,4 $\pm$ 3,6	1130,2 $\pm$ 18,89	668,6 $\pm$ 24,87	2,46	10,77

¹ μmol de p-nitrofenol-fosfato por min por mg de proteína

² μmol de L-leucina-*p*-nitroanilina por min por mg de proteína

³ Razão entre atividade determinada nas BBMVs e no homogeneizado total.

ALP e APN apresentaram atividades em lagartas de todos os ínstaros de *H. armigera*, embora em diferentes níveis (Tabela 3). A atividade de ALP foi maior que a APN em todos os ínstaros. As enzimas aumentaram sua atividade em lagartas do primeiro ao quinto ínstar, com pico de atividade no quinto ínstar, com diminuição no último ínstar. Além da análise de atividade em solução, foi realizada a análise de atividade de ALP em gel e os resultados demonstraram o mesmo padrão de expressão de ALP em solução, ALP esteve presente em todos os ínstaros de *H. armigera* (Figura 6).

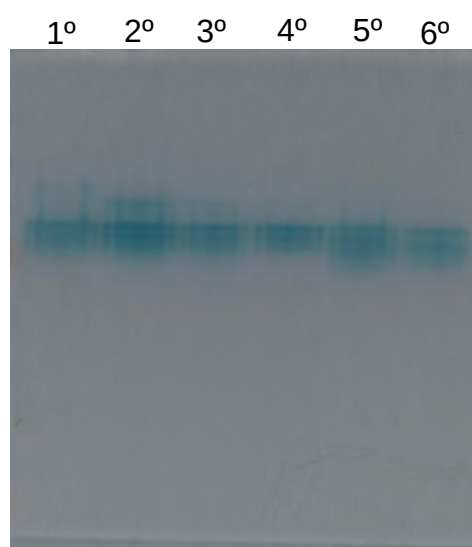


Figura 6. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) em BBMVs isolados de diferentes ínstaros de *Helicoverpa armigera* em gel SDS-PAGE (10%).

4.5 Ensaios de ligação de ELISA

A ligação específica da proteína Cry1Ac as BBMVs de lagartas dos diferentes ínstaros de *H. armigera* provou ser dependente da concentração de proteína e saturável com saturação de ligação em aproximadamente 50 nmols de proteína Cry1Ac. (Figura 7),

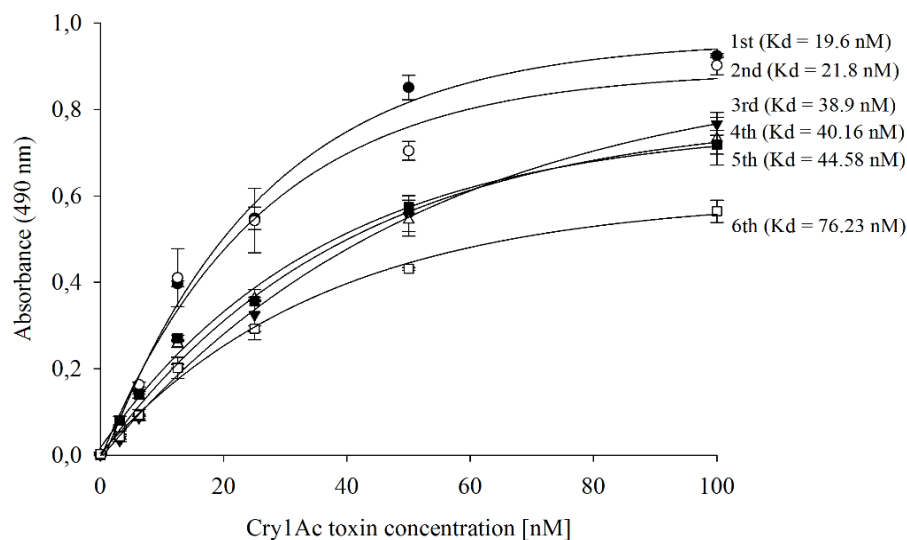


Figura 7. Ligação da proteína Cry1Ac (0-100 nmols) às BBMVs de diferentes ínstares larvais de *Helicoverpa armigera*.

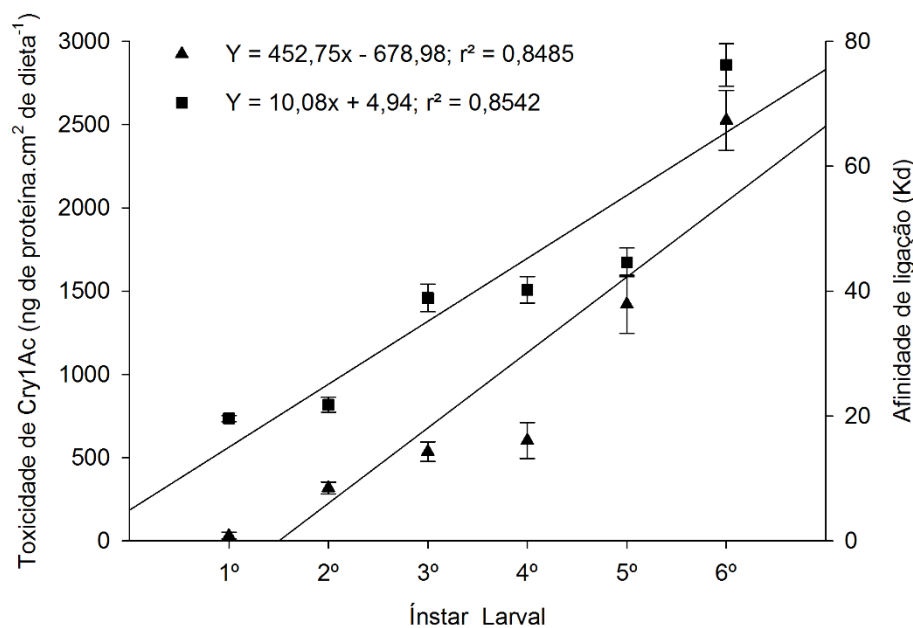


Figura 8. Correlação entre toxicidade de Cry1Ac e afinidade de ligação da proteína às BBMVs isoladas de diferentes ínstares de *Helicoverpa armigera*. Correlação de Pearson de 0,95.

A afinidade de ligação foi determinada em termos de constante de dissociação (K_d) e diminuição da capacidade total de ligação em lagartas de últimos ínstares comparado as de primeiro ínstar. Os valores de K_d variaram de 19,6 a 76,2 nM, em lagartas de primeiro ao último ínstar, respectivamente. As lagartas de sexto ínstar demonstraram uma afinidade de ligação aparente 3,88 vezes menor do que as de

primeiro ínstar (Figura 7). Uma clara correlação entre a toxicidade de Cry1Ac e afinidade de ligação total da proteína às BBMV's de *H. armigera* foi demonstrada (Figura 8).

4.6 Ensaio de imunoprecipitação e identificação das proteínas

Para identificar possíveis proteínas tipo receptoras envolvidas na ligação diferencial da proteína Cry1Ac às BBMV's de lagartas de ínstaes iniciais em comparação com lagartas de ínstaes tardios, foram realizados ensaios de imunoprecipitação com BBMV's de lagartas de segundo e quinto ínstar de *H. armigera*. Diferentes proteínas foram observadas ligadas a proteína Cry1Ac do segundo comparado ao quinto ínstar de *H. armigera* (Figura 9A e 9B). As proteínas ligadas a Cry1Ac em BBMV's de lagartas de segundo e quinto ínstar foram cortadas, como indicado na figura 9A e 9B e enviadas para identificação por LC-MS/MS.

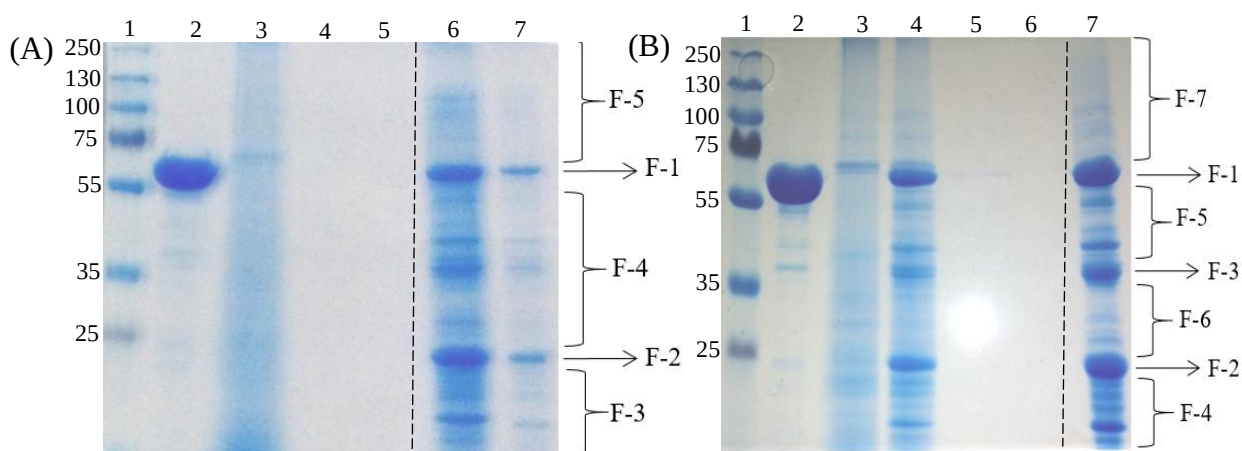


Figura 9- Detecção de proteínas ligadas à proteína Cry1Ac de BBMV's de segundo (A) e quinto ínstar (B) larval de *H. armigera* usando a técnica de imunoprecipitação. **A.** 1: Marcador de peso molecular Rainbow (GE); 2: proteína Cry1Ac ativada; 3: BBMV's solúveis de lagartas de segundo ínstar de *H. armigera*; 4 e 5: Controles negativos, lavagem com solução PBS e com PBS + 1M de NaCl; 6 e 7: proteínas ligadas a Cry1Ac. **B.** 1: Marcador de peso molecular Rainbow (GE); 2: proteína Cry1Ac ativada; 3: BBMV's solúveis de lagartas de quinto ínstar de *H. armigera*; 4: proteínas ligadas a CNBr-Cry1Ac; 5 e 6: Controles negativos, lavagem com solução PBS e com PBS + 1M de NaCl; 6: proteínas ligadas a Cry1Ac.

4.7 Identificação de proteínas por LC-MS/MS

Após o refinamento de acordo com as condições pré-estabelecidas de *score* e probabilidades, um total de 23 e 32 proteínas foram identificadas ligadas à Cry1Ac em BBMVs de lagartas de segundo e quinto ínstar, respectivamente (Tabelas 4 e 5). Das 23 proteínas identificadas em BBMVs de lagartas de segundo ínstar de *H. armigera*, sete proteínas foram identificadas apenas neste estágio larval: canal seletivo dependente de voltagem iônica, proibitina, lipase, proteína ORF5, helicase RecQ, fosfatase alcalina e uma proteína não caracterizada. Entre as proteínas identificadas em lagartas de quinto ínstar, 11 foram identificadas exclusivamente neste ínstar: transferrina, protease do tipo tripsina, proteinase do tipo azurocidina, carboxilesterase, proteína do tipo alfa-amilase, quimotripsinogenio, aldeído desidrogenase, actina, beta-1,3-glucanase, carboxipeptidase, carbamoi-fosfato sintetase/aspartato.

Tabela 4. Proteínas de BBMVs de lagartas de segundo ínstar de *Helicoverpa armigera* identificadas como ligantes da proteína Cry1Ac. As proteínas foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS-MS).

Fração	Número de acesso	Descrição da proteína [espécie] ¹	Cobertura	P.M. (kDa)	Peptídeo único
F-2	d7s000_helam	Serina-protease [Ha]	44%	25	7
	o18438_helam	Quimotripsina [Ha]	23%	30	4
	q2f5j2_bommo	Proibitina [Bm]	16%	30	4
	b6cmf0_helam	Quimotripsina [Ha]	12%	31	3
	a0a1a9fhj3_lalam	Helicase dependente de ATP - RecQ [La]	6%	69	2
	a0a023ngg2_9pico	Proteína ORF5 [Se]	7%	74	2
F-3		Canal seletivo dependente de voltagem iônica [Ha]			
	f5byi4_helam		55%	30	14
	a3riw4_helam	Aminopectidase [Ha]	31%	98	22
	b2lrs7_helam	Aminopectidase-N1 [Ha]	30%	111	19
	q962b3_helam	Aminopectidase-N2 [Ha]	26%	115	21
	q7z0w1_helam	Aminopectidase-N2 [Ha]	24%	115	2
	a9x7k9_helam	Lipase [Ha]	23%	31	4

	q7z266_helam	Aminopectidase-N3 [Ha]	21%	114	16
	q8mu78_helam	Aminopectidase-N3 [Ha]	12%	114	12
	h9juy5_bommo	Proteína não caracterizada [Bm]	10%	34	2
	c0kh33_helam	Epóxido hidrolase [Ha]	6%	52	2
F-4	q86qi6_helam	Aminopectidase-N4 [Ha]	24%	108	5
	q8mu79_helam	Aminopectidase-N4 [Ha]	22%	108	20
	a0a0d3qsh9_helam	Policalina [Ha]	22%	102	17
	q6r3m5_helam	Aminopectidase-N1 [Ha]	18%	103	4
	d5g3h6_helam	Aminopectidase [Ha]	17%	75	11
	b6cmg1_helam	Policalina [Ha]	11%	102	2
	a0a1b0rh8_helze	Fosfatase alcalina [Hz]	8%	59	2

Porcentagem de cobertura > 4% ($P < 0.05$);

P.M: Peso molecular da proteína (kDa);

¹ Bm: *Bombyx mori*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Hz: *Helicoverpa zea*; La: *Lelliottia amnigena*; Se: *Spodoptera exigua*.

Tabela 5. Proteínas de BBMV de lagartas de quinto ínstar de *Helicoverpa armigera* identificadas como ligantes da proteína Cry1Ac. As proteínas foram identificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS-MS).

Fração	Número de acesso	Descrição da proteína [espécie] ¹	Cobertura	P.M. (kDa)	Peptídeo único
F-1	o18439_helam	Serina-protease [Ha]	12%	27	2
F-4	a0a1b0rh7_helze	Serina-protease [Hz]	22%	27	2
F-5	d5g3h7_helam	Aminopectidase [Ha]	53%	38	3
	q962b3_helam	Aminopectidase-N2 [Ha]	53%	115	70
	d5g3h6_helam	Aminopectidase [Ha]	49%	75	4
	b6cmf5_helam	Serina-protease tipo azurocidina [Ha]	45%	18	4
	b2lrs7_helam	Aminopectidase-N1 [Ha]	45%	111	65
	q6r3m5_helam	Aminopectidase-N1 [Ha]	40%	103	2
	q8wsz2_helam	Aminopectidase-N1 [Ha]	38%	113	2
	a0a0d3qsh9_helam	Polycalin-[Ha]	29%	102	17
	c0kh33_helam	Epóxido hidrolase [Ha]	20%	52	6
	b6cmg1_helam	Policalina [Ha]	19%	102	3

	q7z267_helam	Aminopeptidase-N3 [Ha]	16%	114	11
	q86qi6_helam	Aminopeptidase-N4 [Ha]	14%	108	8
	b1nld_helam	α -amilase [Ha]	13%	56	4
	q9nhz9_helpn	Aminopeptidase-N1 [Hp]	12%	112	4
	d2snx0_helvi	Aldeído-desidrogenase [Hv]	11%	41	2
	h9jxt1_bommo	Proteína não caracterizada [Bm]	9%	49	2
	a3riw4_helam	Aminopeptidase [Ha]	8%	98	5
	b1nle1_helam	β 1,3-glucanase [Ha]	6%	42	2
F-6	c3sbk6_helam	Protease tipo tripsina[Ha]	25%	32	6
	b1nle4_helam	Protease [Ha]	19%	28	3
	x5ct98_9neop	Actina [Zf]	13%	44	2
	q6h961_helam	Carboxipeptidase [Ha]	6%	48	2
	h9jhg0_bommo	Proteína não caracterizada [Bm]	5%	81	2
	q3t905_helze	Carboxipeptidase [Hz]	5%	48	2
	l7qpk2_9neop	Carbamoil- fosfato sintase/aspartato transcarbamyilase/dihidr orotase [Nm]	4%	109	2
F-7	o18438_helam	Protease tipo quimotripsina [Ha]	37%	30	3
	a0pgd5_helpn	Quimotripsinogênio [Hp]	14%	30	2
	a0a067yaw9_helam	Transferrina [Ha]	11%	83	4
	h9j9i6_bommo	Proteína não caracterizada [Bm]	7%	80	3
	a0a127kq69_helam	Carboxilesterase [Ha]	6%	79	3

Porcentagem de cobertura > 4% ($P < 0.05$);

P.M: Peso molecular da proteína (kDa);

¹ Bm: *Bombyx mori*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Hp: *Helicoverpa punctigera*; Hz: *Helicoverpa zea*; Hv: *Heliothis virescens*; Nm: *Nematopogon magna*; Zf: *Zigaena filipendulae*.

5. DISCUSSÃO

Os cristais proteicos quando ingeridos pelos insetos são solubilizados no lúmen do intestino médio devido pH altamente alcalino (9-11), no caso dos lepidópteros e posteriormente são clivadas por proteases, perdendo metade da porção C-terminal e de 20-50 aminoácidos na porção N-terminal, liberando um fragmento ativo de aproximadamente 65 kDa (BRAVO et al. 2007). Esta etapa do mecanismo de ação é necessária para que posteriormente a proteína ativada possa passar por complexos eventos sequenciais de ligação com diferentes receptores presentes nas membranas do epitélio intestinal, levando à sua inserção à membrana, formação de poros e morte do inseto. Portanto, tripsina foi utilizada para simular “*in vitro*” o que ocorre naturalmente no intestino do inseto, de forma que, as protoxinas Cry fossem ativadas por essa enzima (Figura 5).

A ligação específica das proteínas Cry aos receptores presentes na membrana do intestino médio dos insetos é um passo crítico no modo de ação dessas proteínas inseticidas. Diferentes proteínas têm sido descritas como receptores de proteínas Cry, tais como ALP, APN, caderina, uma glicoproteína de 270 KDa e, recentemente, um transportador membro da família ABC (ABCC2) (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004; BRAVO et al., 2007; ZHOU et al., 2016). No entanto, a expressão dessas proteínas nas BBMVs do intestino médio é necessária para exercer sua função como receptores das proteínas Cry (XIAO et al., 2017). ALP (~ 65 kDa) e APN (~ 120 kDa) são proteínas ancoradas por uma alça de glicosilfosfatidinositol (GPI) e estão presentes em alta abundância nas BBMVs do intestino médio (PIGOTT; ELLAR, 2007). A proteína Cry1Ac liga-se aos receptores APN e ALP através do domínio III que reconhece a porção de N-acetilgalactosamina (GalNAc) presente nesta proteína em particular (BRAVO et al., 2007). GalNAc possui um papel importante na interação da proteína Cry1Ac com a APN em *M. sexta* (KNIGHT et al., 1994; LUO et al., 1997; BURTON et al., 1999; DERBYSHIRE et al., 2001) e ALP em *H. virescens* (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004).

Mudanças significativas na susceptibilidade dos diferentes ínstares de *H. armigera* à proteína Cry1Ac foram observadas, sendo que as lagartas do sexto ínstar foram 80 vezes menos sensíveis a proteína Cry1Ac do que as lagartas de primeiro ínstar. A redução da susceptibilidade à ação da proteína Cry1Ac em lagartas de ínstares tardios tem sido demonstrada em outros trabalhos (HUANG; BUSCHMAN;

HIGGINS, 1999; LIAO et al., 2002; BIRD; AKHURST, 2007; UPADHYAY; SINGH, 2011; LI; BOWER, 2012).

No caso de M. sexta, a diminuição da suscetibilidade à toxina Cry1Ab nos estádios tardios foi associada a um aumento no número de receptores de caderina por área de área do intestino médio em ínstares larvais tardios, sugerindo que uma maior concentração de toxina Cry1Ab seria necessária para interagir fisicamente com o grande número de moléculas de caderina para matar as larvas maiores (GRIKO et al., 2008). Estes autores ainda propuseram um modelo matemático que poderia explicar a diminuição desta susceptibilidade considerando o aumento do intestino médio com aumento simultâneo do volume do lúmen e concluíram que há uma relação crítica entre proteína-receptor para uma atividade inseticida ideal. No entanto, a racionalidade deste argumento é questionável, uma vez que baixas toxicidades se correlacionam na maioria dos casos com uma diminuição dos locais de ligação aos receptores no intestino médio (RAUSSEL et al., 2000; JURAT-FUENTES et al., 2004b; HERRERO et al., 2005; ZHANG et al., 2009).

Dentro de um contexto envolvendo as plantas transgênicas com resistência a insetos (plantas Bt), o manejo de resistência é fundamental para retardar a evolução de insetos resistentes às proteínas Bt no campo (CARIÈRE; CROWDER; TABASHNIK, 2010). As plantas Bt exercem uma alta pressão de seleção sobre os insetos alvo, normalmente, ocasionada pela alta expressão de proteínas Cry, expressão de apenas uma ou poucas proteínas e à alta exposição dos insetos as proteínas, uma vez que são expressas em todas partes da planta.

O manejo de resistência mais recomendado, atualmente, é a estratégia de “alta-dose” juntamente com uso de refúgios (JIN et al., 2015). Esta estratégia é baseada na idéia que a dose de proteína de uma planta Bt seja capaz de matar todos insetos heterozigotos da área, assumindo que a resistência seja recessiva, juntamente com áreas de refúgio, que são áreas de plantas não-Bt, que tem por função produzirem insetos susceptíveis, que acasalem com possíveis insetos resistentes da área Bt e produzam mais insetos heterozigotos (susceptíveis) (GOULD; 1998; MATTEN et al. 2008; TABASHNIK et al., 2009). No entanto, de acordo com Huang et al. (1999), devido a susceptibilidade diferenciada entre ínstares, o conceito de “alta-

dose” deve ser definido em termos de idade da praga, pois uma estratégia de alta dose válida para os ínstaes iniciais da praga pode ser inválida para os últimos.

Além da redução na susceptibilidade, os resultados dos ensaios de ligação de ELISA da proteína Cry1Ac à BBMV de diferentes ínstaes larvais de *H. armigera* revelaram uma diminuição da capacidade total de ligação de Cry1Ac às BBMV de lagartas de últimos ínstaes comparados aos iniciais (Figura 7). Foi observada uma redução de 3,88 vezes na ligação de lagartas de último ínstar comparado as de primeiro em se ligar a proteína Cry1Ac. Os resultados indicaram uma clara correlação entre a toxicidade de Cry1Ac e a afinidade de ligação de proteína às membranas do intestino médio (Figura 8).

Resultados similares foram relatados por Rausell et al. (2000) em *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Notodontidae), onde uma diminuição da afinidade de Cry1Ab à um dos seus receptores foi observada em lagartas de últimos ínstaes. Estes autores correlacionaram esta redução na afinidade de ligação à reduzida susceptibilidade do inseto à proteína Cry1Ab em lagartas de ínstaes tardios. De forma semelhante, as bases bioquímicas da reduzida susceptibilidade em lagartas de ínstaes tardios de *S. frugiperda* foi investigado por Chou et al. (1995). Estes autores encontraram uma variação nos receptores da proteína durante o desenvolvimento das lagartas, explicando a capacidade reduzida da proteína Cry1C e Cry1D afetar a permeabilidade da membrana nos últimos ínstaes do inseto.

Os resultados de atividades enzimáticas demonstraram que APN e ALP são expressos durante todo o desenvolvimento larval de *H. armigera*, embora em diferentes níveis (Tabela 3). Além disso, foi demonstrado que ambas enzimas tiveram a sua atividade aumentada em lagartas do primeiro ao quinto ínstar, e depois diminuíram em lagartas de último ínstar. A família das APN é uma classe de enzimas que possuem uma variedade grande de funções em uma ampla gama de espécies, no entanto, em lagartas de lepidópteros desempenham um papel importante na degradação de proteínas durante a digestão, catalisando a clivagem de aminoácidos localizados na porção amino terminal polipeptídios derivadas da dieta do inseto (PIGOTT; ELLAR, 2007). Por outro lado, ALP são hidrolases responsáveis por catalisarem a remoção de grupos fosfato de diferentes moléculas, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcaloides, processo conhecido como desfosforilação e tem

papel importante no fornecimento de energia para o inseto, mediante produção de adenosina trifosfato (ATP).

A maior quantidade de alimento requerida pelo inseto de acordo com o seu desenvolvimento, pode explicar o aumento das atividades de APN e ALP, visto que estas enzimas atuam diretamente na digestão do alimento e no fornecimento de ATP, respectivamente. De forma similar, quando o inseto está se aproxima da passagem para o estágio de pupa, a alimentação e o gasto de energia são reduzidos, e consequentemente, a atividade de APN e ALP. Este padrão de atividade de ALP e APN em *H. armigera* também foi observado por Upadhyay e Singh (2011) e em *M. sexta* por Arenas et al. (2010).

Além da análise de atividade APN e ALP em solução, foi realizado a atividade de ALP em gel SDS-PAGE (12%) e os resultados demonstraram o mesmo padrão de atividade do ensaio em gel. ALP esteve presente em todos os ínstares de *H. armigera* (Figura. 6). Além disso, a análise ALP em gel permitiu identificar diferentes tamanhos correspondentes a ALP. Este resultado sugere que diferentes isoformas de ALP podem estar sendo expressas nos diferentes estádios de desenvolvimento do inseto, desta forma, estas isoformas podem ter capacidade e afinidade diferentes para ligação a proteína Cry1Ac, resultando em menor afinidade de ligação em ínstares tardios.

Os ensaios de imunoprecipitação indicaram um padrão diferenciado de proteínas que se ligaram a Cry1Ac em lagartas de primeiros e de últimos ínstares (Tabela 4 e 5), no entanto, APN, anteriormente descritas foram identificadas nos dois ínstares analisados. Foram identificadas 4 diferentes classes de APN como ligantes da proteína Cry1Ac. Estes resultados indicam que APN pode ter papel fundamental na toxicidade de Cry1Ac em todo o desenvolvimento larval de *H. armigera*.

Entre todos os receptores de proteínas Cry descritos em diferentes espécies de insetos, APN é uma das mais investigadas e relatadas. Trinta e oito diferentes APN foram relatadas em 12 diferentes espécies de lepidópteros, sendo classificadas em cinco grupos (PIGOTT; ELLAR, 2007). Das classes de APN reportados na literatura como receptores de proteínas Cry, pelo menos APN1, APN2, APN3 e APN4 foram relatados como ligantes da proteína Cry1Ac (RAJAGOPAL et al., 2002; ANGELUCI et al., 2008). De forma similar, como relatado em Zhou et al. (2016), diferentes classes

de APN foram identificados em zonas do gel que são muito menores do que as previstas para o seu tamanho nativo (120 kDa), isto pode ter ocorrido devido à alta abundância desta proteína nas BBMVs do intestino médio de *H. armigera* e a sua alta susceptibilidade à degradação.

Consistente com outros estudos, ALP foi identificada como ligante a proteína Cry1Ac apenas nas BBMVs de lagartas de segundo ínstar de *H. armigera*, estágio larval em que a proteína Cry1Ac foi altamente tóxica. Arenas et al. (2010) e Flores-Escobar et al. (2013) demonstraram por análise de *ligand blot* da proteína Cry1Ab em BBMVs isolados de lagartas de diferentes instares de *M. sexta*, que ALP é altamente expresso em lagartas neonatas comparados as lagartas de instares tardios, indicando que ALP pode ter um papel importante na toxicidade em lagartas de estádios iniciais. Assim como demonstrado neste trabalho para *H. armigera*, estes resultados se correlacionam com a menor susceptibilidade de *M. sexta* à proteína Cry1Ab nos últimos instares larvais comparados aos iniciais (GRIKO et al., 2008).

ALP foi demonstrada como um receptor de toxinas Cry1A em diversas espécies de insetos, de diferentes ordens, como *M. sexta* (McNall e Adang, 2003), *H. virescens* (Jurant-Fuentes e Adang, 2004a), *Tenebrio molitor* (Zunig) e *A. aegypti* (Fernandez et al., 2006). Em *H. armigera*, a resistência à Cry1Ac correlacionou-se com a diminuição da transcrição de uma ALP ligada à Cry1Ac, indicando que a ALP é um receptor funcional de Cry1Ac nesta espécie (Chen et al., 2015). Consistentemente com os nossos resultados, também foi demonstrado por ensaios de *ligand blot* que Cry1Ab se liga à ALP expressas em larvas neonatas de *M. sexta* em contraste com as larvas de instares tardios (Arenas et al., 2010; Flores et al., 2013). Esses resultados sustentam que ALP pode ser responsável pela alta toxicidade observada neste estágio de desenvolvimento larval de *H. armigera*, no presente neste estudo.

Além das proteínas descritas anteriormente na literatura, no presente estudo, outras proteínas foram identificadas nos ensaios de imunoprecipitação utilizando BBMVs isoladas de lagartas de segundo ínstar (Tabela 4), tal como proibitina, que já foi descrita na literatura como importante na toxicidade de Cry1A e uma proteína relacionada a um canal seletivo dependente de voltagem iônica, que foi identificada de forma contundente na análise por LC/MS-MS, com altos valores de cobertura e único peptídeo. A proteína proibitina foi identificada por Bayyareddy et al. (2009)

localizada em “*lipid rafts*”, conhecido como “balsas lipídicas” e foi previamente indicada como uma proteína ligante a proteínas Cry1A. Estas regiões são micro domínios da membrana plasmática, cuja fluidez é muito menor que a porção a sua volta e é altamente enriquecida com colesterol, fosfolípidios saturados e proteínas de membrana. Esta região é acreditada em concentrar altas quantidade de APN e ALP, que quando ligadas a proteína Cry, facilita a concentração dos oligômeros nesta região da membrana promovendo a inserção da proteína na membrana, formação do poro, choque osmótico, ruptura celular e morte do inseto.

À Luz do nosso conhecimento, não há relatos que evidenciem que uma proteína ligada a um canal iônico seletivo poderia ser uma proteína de ligação a proteínas Cry em qualquer espécie de inseto. Em humanos, uma proteína homóloga (hVDAC3), foi sugerida que estivesse localizada na membrana externa das mitocôndrias (Guardiani et al., 2016), sugerindo que esta proteína pode não estar muito bem envolvida na toxicidade Cry1Ac.

Proteínas do tipo serino-proteases foram identificados ligadas a Cry1Ac em lagartas dos dois estádios de desenvolvimento de *H. armigera* analisados. Trabalhos têm demonstrado que enzimas do tipo serino-proteases, das quais tripsina e quimiotripsina são particularmente predominantes e tem papel essencial na clivagem e ativação das proteínas Cry em diferentes espécies de insetos (OPPERT, 1999; LIGHTWOOD et al., 2000; MIRANDA; ZAMUDIO; BRAVO, 2001). Entretanto, no presente estudo, entre as proteínas ligadas à Cry1Ac identificadas em BBMVs isoladas exclusivamente em larvas de quinto ínstar de *H. armigera*, várias proteínas que poderiam participar na degradação de proteínas, tais como, proteases do tipo tripsina, proteinases do tipo azurocidina e carboxipeptidase foram identificadas (Tabela 5), o que indica que a degradação da proteína Cry1Ac poderia ser uma das razões para a baixa toxicidade de Cry1Ac nas larvas de ínstar tardio de *H. armigera*.

Em conclusão, foi demonstrado neste estudo, uma clara correlação direta entre toxicidade e afinidade de ligação à toxina Cry1Ac às BBMVs isolada de diferentes ínstar larvais de *H. armigera*. Além disso, foi observado um padrão de proteína de ligação à Cry1Ac diferenciado nos ínstar precoces e tardios de *H. armigera*. No futuro, o próximo passo pode ser provar o papel funcional das proteínas

envolvidas na interação entre Cry1Ac em *H. armigera*. Uma possível estratégia para isto, pode ser a utilização de técnicas de RNA de interferência para silenciar os genes que codificam estas proteínas e avaliar se o silenciamento destas proteínas afeta a susceptibilidade do inseto a proteína Cry1Ac. Além disso, clonar e expressar heterológicamente e avaliar o compartilhamento dos sítios de união com outras proteínas Cry. A identificação e o papel funcional das proteínas de ligação nos diferentes estádios de desenvolvimento de *H. armigera*, facilitará a elucidação do mecanismo inseticida da proteína Cry1Ac nesta espécie e poderá ajudar a propor estratégias que retardem a evolução da resistência dos insetos às cultivares transgênicas que expressam esta proteína.

6. CONCLUSÕES

Houve mudanças significativas na susceptibilidade dos diferentes ínstarres de *H. armigera* à proteína Cry1Ac, sendo que o último ínstar foi 80 vezes menos sensível à proteína comparado ao primeiro;

Foi demonstrada uma correlação direta entre a toxicidade de Cry1Ac com a capacidade de ligação à proteína as BBMV's dos diferentes ínstarres;

Os ensaios de imunoprecipitação permitiram identificar proteínas exclusivas no segundo e quinto ínstar larval que podem ter papel fundamental para a alta toxicidade nos ínstarres iniciais de *H. armigera*, como ALP, proibitina, e uma proteína relacionada a um canal seletivo dependente de voltagem iônica.

7. REFERÊNCIAS

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action, **Advances in Insect Physiology**, v. 47, 2014.

AHMAD, M.; ARIF, M. I.; AHMAD, Z. Resistance to carbamate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Crop Protection**, v. 29, p.427-432, 2001.

AKHURST, R. J.; JAMES, W.; BIRD, L. J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 1290-1299, 2003.

ANGELUCCI, C.; BARRETT-WILT, G. A.; HUNT, D. F.; AKHURST, R. J.; EAST, P. D.; GORDON, K. H.; 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 delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 685-696, 2008.

ANTONOV, V. K.; BESSMERTNAYA, L. Y.; MIKHAILOVA, A. G.; ZILBERMAN M. I. Role of intestinal brush border membrane aminopeptidase N in dipeptide transport. **FEBS Letters**, v. 171, p. 227-232, 1984.

APHIS. **Animal and Plant Health Inspection Service**. For information and action, 2014. https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2014-45.pdf. Acesso em 21 Junho de 2017.

APHIS. **Animal and Plant Health Inspection Service**. For information and action, 2015. https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf. Acesso em 21 de Junho de 2017.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GOMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 12497-12503, 2010.

ATSUMI, S.; INOUE, Y.; ISHIZAKA, T.; MIZUNO, E.; YOSHIZAWA, Y.; KITAMI, M.; SATO, R. Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **FEBS letters**, v. 275, p. 4913-4926, 2008.

ÁVILA, J. C.; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. **Circular Técnica**, 23.

BASKAR, K.; IGNACIMUTHUA, S. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory effects of ononitol monohydrate isolated from L. against *Helicoverpa armigera* (Hub.) and

Spodoptera litura (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, v. 88, p. 384–388, 2012.

BAYYAREDDY, K.; ANDACHT, T. M.; ABDULLAH, M. A.; ADANG, M. J. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect of Biochemistry Molecular and Biology**, v. 39, p. 279-286, 2009.

BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 84-94, 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**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

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

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.

BURTON, S. L.; ELLAR, D. J.; LI, J.; DERBYSHIRE, D. J. N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 287, p. 1011-1022, 1999.

CASTIGLIONI, E.; CLÉRISON, R. P.; CHIARAVALLE, W.; JONAS, A. A.; UGALDE, G.; JERSON, V. C. G. Primer registro de ocurrencia de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en soja, en Uruguay. **Agrociencia**, v. 20, p.31-35, 2016.

COOPER, M. A.; CARROLL, J.; TRAVIS, E. R.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment, **The Journal of Biochemistry**, v. 333, p. 677-683, 1998.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 110-113, 2013.

DECHKLAR, M.; ANSUTHANASOMBAT, C.; POOTANAKIT, K. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 159-166, 2011.

DENOLF, P.; 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**, v. 248, p. 748-761, 1997.

DERBYSHIRE, D. J.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. **Acta Crystallography**, v. 57, p. 1938-1944, 2001

DUFFIELD, S. J.; DILLON, M; L. The emergence and control of overwintering *Helicoverpa armigera* pupae in southern New South Wales. **Australian Journal of Entomology**, v. 44, p. 316–320, 2005.

DYAR, H. G. The number of molts of lepidopterous larvae. **Psyche**, v. 5, p. 420-422, 1890.

EGUCHI, M. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111, p. 151-162, 1995.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera***. Bulletin 11, Paris, 1981.

FATHIPOUR, Y.; NASERI, B. Soybean cultivars affecting performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In: **Soybean – biochemistry, chemistry and physiology**. Ed. by Ng TB, InTech, Rijeka, Croatia, 599–630, 2011.

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

FERNANDEZ-LUNA, M. T.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; MIRANDA-RIOS, J. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae), **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 746-757, 2010.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52, 1989.

FLORES-ESCOBAR, B.; RODRIGUEZ-MAGADAN, H.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GOMEZ, I. Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 4543-4550, 2013.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v. 293, p. 857-860. 2001.

GÓMEZ, I.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, v. 513, p. 242-246, 2002.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, G.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*, **Journal of Biology Chemistry**, v. 281, p. 34032-34039, 2006.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701–726, 1998.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487-488, 1976.

GRIFFITTS, J. S.; HUFFMAN, D. L.; WHITACRE, J. L.; BARROWS, B. D.; MARROQUIN, L. D.; MÜLLER, R.; BROWN, J. R.; HENNET, T.; ESKO, J. D.; AROIAN, R. V. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin and host interactions. **Journal of Biology Chemistry**, v. 278, p. 45594-45602, 2003.

GRIKO, N.; ZHANG, X.; IBRAHIM, M.; MIDBOE, E. G.; BULLA, L. A. Susceptibility of *Manduca sexta* to Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* correlates directly to developmental expression of the cadherin receptor BT-R₁. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 151, p. 59-63, 2008.

GROCHULSKI P, M. 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**, v. 254, p. 447-464, 1995.

GUARDIANI, C.; LEGGIO, L.; SCORCIAPIANO, M. A.; DE PINTO, V.; CECCARELLI, M. A computational study of ion current modulation in hVDAC3 induced by disulfide bonds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 813-823, 2016.

GUO, S.; LIU, Y.; WEI, L.; XUE, J.; WU, H.; SONG, F.; ZHANG, J.; WU, X.; HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*, **Journal of Structural Biology**, v. 168, p. 259-266, 2009.

HARDWICK, D. F. The corn earworm complex, **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 40, 1-247, 1965.

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**, v. 24, p. 6-96, 2005.

HUA, G. Z. R.; ABDULLAH, M. A. F.; ADANG, M. J. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. **Biochemistry**, v. 47, p. 5101-5110, 2008.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A. Susceptibility of Different Instars of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Diet Containing *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 3, 1999.

IBRAHIM, M. A.; UNKER, M.; BULLA, L. A. *Bacillus thuringiensis* A genomic and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 31-50, 2010.

JADHAV, D. R.; ARMES, N. J. Diapause in two tachinid (Diptera: Tachinidae) parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern India. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 118-125, 2013.

JIN, L. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 169-174, 2015.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1A receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 3127–3135, 2004a.

JURAT-FUENTES, J. L.; GAHAN, L. J.; GOULD, F. L.; HECKEL, D. G.; ADANG, M. J. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Journal of Biochemistry**, v. 43, p. 14299-14305, 2015b.

JURAT-FUENTES, J. L.; JAKKA, S. R.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C.; PORTILLA, M.; PERERA, O.; ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One**, v. 6, p. 7606, 2011.

KELLER, A.; NESVIZHSHKII, E.; KOLKER, AEBERSOLD, E. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5383–5392, 2002.

KNIGHT, P. J. K.; ELLAR, D. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 429-436, 1994.

KRANTHI, K. R.; JADHAV, D. R.; KRANTHI, S.; WANJARI, S.; ALI, S. S.; RUSSEL, D. A. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. **Crop Protection**, v. 21, p. 449-460, 2002.

KRITICOS, D. J.; OTA, N.; HUTCHISON, W. D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W. T.; BORCHERT, D. M.; PAULA-MOREAS, S. V.; CZEPAK, C.; ZALUCKI, M. P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? PLoS ONE, v. 10, 2015.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. **Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera*** (Hübner, 1808). [S.l.: s.n.], 2007. Disponível em: <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf. Acesso em 21 de junho de 2017.

LI, H.; BOUWER, G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 110-116, 2012.

LIAO, C. Y.; HECKEL, Y.; AKHURST, D. G.; Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 55-63, 2002.

LIGHTWOOD, D. J.; ELLAR, D. J.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5174-5181, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

LUO, K. S.; SANGADALA, L.; MASSON, A.; MAZZA, R.; BROUSSEAU, ADANG, M. J. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. **Insect of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 735-743, 1997;

MAELZER, D. A.; ZALUCKI, M. P. Analysis of long-term light-trap data for *Helicoverpa spp.* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: the effect of climate and crop host plants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, p. 455–463, 1999.

MARROQUIN, L. D.; ELYASSNIA, D.; GRIFFITTS, J. S.; FEITELSON, J. S.; AROIAN. V. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, p. 1693–1699, 2000.

MASSON L., L. Y.-J., MAZZA A., BROUSSEAU R., ADANG M. J. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities, **Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 20309-20315, 1995.

MATTEN, S. R.; HEAD, G. P.; QUEMADA, H. D. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In J. Romeis, A. M. Shelton, and G. G. Kennedy, eds. **Integration of Insect-resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs**, pp. 27–39. Springer, New York, 2008.

McCAFFERY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. **Proceedings of the Royal Society**, v. 353, p. 1735-1750, 1998.

McCAFFERRY, A.; NAUEN, R. The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Public responsibility and enlightened industrial self interest. **Outlooks on Pest Management**, v. 2, p.11-14, 2006.

MCNALL, R. J.; ADANG, M. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 999-1010, 2003.

MENSAH, R. K. Supresssion of *Helicoverpa spp.* (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, v. 35, p. 323-329, 1996.

MIRANDA, R.; ZAMUDIO, F. Z.; BRAVO, A. Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 1155-1163, 2001.

MIRONIDIS, G. K.; SAVOPOULOU, M. Development, survivorship, and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under constant and alternating temperatures. **Environmental Entomology**, v. 37, p. 16–28, 2008.

MORIN, S.; BIGGS, R. W.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHANHECKEL, D. G.; CARRIERE, 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**, v. 100, p. 5004-5009, 2003.

MURÚA, M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M. E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, v. 97, p. 854-856, 2014.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V.; GATEHOUSE, A. M. R. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. **Pest Management**, v. 66, p. 1316–1323, 2010.

NESVIZHSKII, A.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 4646–4658, 2003.

OPPERT, B. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 1-12, 1999.

PACHECO, S.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN M. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors." **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 32750-32757, 2009.

PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 3–22, 2013.

PARRA, R. P. P.; HADDAD, M. L. Determinação do número de ínstaes de insetos. Piracicaba: **FEALQ**, 1989, 49p.

PIGOTT, C. R., ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, p. 255-281, 2007.

PINÓIA, S. S. F. Eficácia de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) e spinosade no combate a *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae) em tomateiro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Técnica de Lisboa, 2012. 89p.

POGUE, M. G. A New Synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and Differentiation of Adult Males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae), **Annals of Entomological Society of America**, v. 97, p. 1222-1226, 2004.

RAFIEE-DASTJERDI, H.; HEJAZI, M.J.; NOURI-GANBALANI, G.; SABER, M. Toxicity of some biorational and conventional insecticides to cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its ectoparasitoid, *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Entomological Society Iranian*, v. 28, p. 27-37, 2008.

RAJAGOPAL, R.; 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." **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46849–46851, 2002.

RAUSELL, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GARCÍA-ROBLES, I.; REAL, M. D. A. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1553-1558, 2000.

SANAHUJA, G.; TWYMAN, R. M.; CAPEL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and comercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283-300, 2011.

SAUKA, D. H.; BENITENDE, G. B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidóperos que son plagas agrícolas. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 124-140, 2008;

SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775–806, 1998.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com, 2004.

SENAVE. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. **Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola**. ABC Color, 2013. Disponível em: <<http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>>. Acesso em 21 de junho de 2017.

SHARMA, H. C.; DHILLON, M. K.; ARORA, R. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin-fed *Helicoverpa armigera* on the survival and development of the parasitoid *Campoletis chloridae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 126, p. 1-8, 2008.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 13–21, 2001.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cell Molecular and Life Sciences**, v. 66, p. 1337-1349, 2009.

SOLEIMANNEJAD, S.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; ZALUCKI, M. P. Evaluation of potential resistance in seeds of different soybean cultivars to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) using demographic parameters and nutritional indices. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1420–1430, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S.A.C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p.101-104, 2016.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 2011–2025, 2009.

CARRIÈRE, Y.; CROWDER, D. W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops, **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 561-573, 2010.

TABASHNIK, B. E.; WUB, K.; WUC, Y. Early detection of field-evolved resistance to *Bt* cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 301-306, 2012.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil, **Plos One**, v. 8, p. 11, 2013.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, P. Role of Alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera*. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 2027-2036, 2011.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 1-12, 2012.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; TONON, A. Activity of *Bacillus thuringiensis* cyt1Ba crystal protein against hymenopteran forest pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 160-162, 2013.

WANG, P.; ZHANG, J. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 611-620, 2005.

WOLFERSBERGER, M. G. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 24, p. 139–147, 1993.

XIAO, Y.; DAI, Q.; HU, R.; PACHECO, S.; YANG, Y.; LIANG, G.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A.; LIU, K.; WU, K. Single Point Mutation Resulting in Cadherin Mislocalization Underpins Resistance against *Bacillus thuringiensis* Toxin in Cotton Bollworm, **Journal of Biology Chemistry**, v. 292, p. 2933-2943, 2017.

XIE, R.; ZHUANG, M.; ROSS, L. S.; GÓMEZ, I.; OLTEAN, D. I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GILL, S. S. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from

Heliothis virescens affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **Journal of Biology Chemistry**, v. 280, p. 8416-8425, 2005.

YANG, Y.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, B. R.; ABEL, C.; HUANG, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 8, 2010.

YAOI, K.; HISANAGA, K.; SHINKAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IWAHANA, H.; SATO, R. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIaA toxin, **European Journal of Biochemistry**, v. 246, p. 652-657, 1997.

ZALUCKI, M. P.; MURRAY, D. A. H.; GREGG, P. C.; FITT, G. P.; TWINE, P. H.; JONES, C. Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Heliothis punctigera* (Wallengren) in the inland of Australia: Larval sampling and host plant relationships during winter and spring. **Australian Journal of Zoology**, v. 42, p. 329-346, 1994.

ZHANG, X.; GRIKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA, 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 Science**, v. 103, p. 9897-9902, 2006.

ZHANG, S.; YULIN, G. A. A.; WANG, A.; LIANG, A.; WU, K. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 421-429, 2009.

ZHOU, Z.; WANG, Z.; LIU, Y.; LIANG, G.; SHU, C.; SONG, F.; ZHOU, X.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; ZHANG, J. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay, **Microbiology Open**, v. 5, p. 659-669, 2016.

WYCKHUYS, K. A. G.; LU, Y.; MORALES, H.; VAZQUEZ, L. L.; JESUSA, C. L.; LEGASPI, J. C.; ELIOPOULOS, P. A.; HERNANDEZ, L. M. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological Control**, v. 65, p.152-167, 2013.

WOLFERSBERGER, M. G. Preparation and Partial Characterization of Amino Acid Transporting Brush Border Membrane Vesicles From the Larval Midgut of the Gypsy Moth (*Lymantria dispar*), **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 24, p. 139-147, 1993.