

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

EVOLUÇÃO *IN VITRO* DE MOLÉCULAS CRY ATIVAS CONTRA *Anthonomus grandis* E *Spodoptera frugiperda*.

Gustavo Ramos de Oliveira

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

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientadora: Dra. Maria Cristina Mattar da Silva

Porto Alegre – RS

Maio de 2008

AGENTES FINANCIADORES

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.
- Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I.
- Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior – CAPES.
- Fundo de Apoio à Cultura do Algodão – FACUAL.
- Fundo de Incentivo à Cultura do Algodão em Goiás – FIALGO.

Dedico este trabalho aos meus Pais, Irmã, Avós, Magda, Tios e Primos.

Agradeço

À DEUS.

Ao Hudson, amigo e companheiro de trabalho.

Aos meus pais, irmã e avós, pelo amor, carinho e paz passados ao longo de tantos anos de convívio.

À Magda, minha amada noiva, amiga, companheira, exemplo de luta e conquistas.

À Dra. Fátima, pela orientação e oportunidades.

À Dra. Cristina, pelo apoio e orientação.

Ao Dr. Thales, pela amizade, companheirismos e ensinamentos.

Aos meus tios e primos, pelo apoio imensurável e pelos momentos de descontração.

Aos amigos e colegas de trabalho.

I - LISTA DE ABREVIATURAS

Å - angstrom

ABRAPA - Associação Brasileira de Produtores de Algodão

AP - fosfatase alcalina

BBMVs - *Brush border membrane vesicles*

BSA - albumina bovina

Bt - *Bacillus thuringiensis*

°C - célsius

cm - centímetro

Cry - proteína Cry

Cyt - proteína Cyt

DNA - ácido desoxirribonucléico

f1 - bacteriófago

fd - bacteriófago

g – gramas

G – força G

hs - horas

ha - hectares

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa - Kilo Daltons

L - litros

LC - concentração letal

M - molaridade

mA - miliamper

min - minutos

mL - mililitros

mm - milímetros

mM - milimolar

M13 - bacteriófago

ng - nanogramas

P III - proteína III

pb - pares de base
PBS - Phosphate-buffered saline
PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase
pComb3XSS - fagomídeo
pH - potencial hidrogeniônico
qsf - quantidade suficiente
SDS - Sodium Dodecyl Sulphate
Seg - segundos
Sfi I - enzima de restrição *Sfi* I
ssDNA - DNA fita simples
TBE - Tris-Borate -EDTA
TBS - Tris-buffered Saline
VCSM13 – bacteriófago, também denominado M13
VIP - Vegetative Insecticidal Protein
 α - alfa
 β - beta
 δ - delta
% - porcentagem
 μ g - microgramas
 μ L - microlitros
 μ M - micromolar

II - LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Histórico dos últimos 16 anos de safras do algodão exibindo a variação da produção e área plantada.....	18
Figura 02 - Distribuição da produção obtida de cereais, leguminosas e oleaginosas no Brasil no ano de 2006.....	19
Figura 03 (A e B) - Larvas de <i>S. frugiperda</i>	24
Figura 04 (A e B) - Células vegetativas e cristais de <i>B. thuringiensis</i>	27
Figura 05 - Estrutura terciária das toxinas Cry.....	31
Figura 06 - Esquema do modelo de formação de podão pelas toxinas Cry.....	33
Figura 07 - Esquema da Técnica de DNA <i>shuffling</i>	37
Figura 08 - Organização da estrutura de uma partícula viral do bacteriófago M13.....	39
Figura 09 - Mapa do vetor pComb3XSS para expressão heteróloga em sistema fago.....	47
Figura 10 - Representação esquemática da infecção de células de <i>E. coli</i> por fagos filamentosos e o ciclo de seleção.....	49
Figura 11 - Mapa do vetor comercial pET101/D-TOPO para expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	58
Figura 12 (A e B) - Esquema ilustrativo do sistema de ligação do produto de PCR no vetor de pEt101/D-TOPO.....	59
Figura 13 - Mapa dos vetores cry8Ha1PET101 e cry8BI25PET101 para expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	60
Figura 14 - Etapas da técnica de DNA <i>shuffling</i>	68

Figura 15 - Interação entre BBMV's de <i>A. grandis</i> e fagos de fusão dos rounds de seleção.....	69
Figura 16 - Interação entre BBMV's de <i>S. frugiperda</i> e fagos de fusão dos rounds de seleção.....	70
Figura 17 - PCR de colônia de variantes da biblioteca BI.....	71
Figura 18 - Dot Blot de mutantes da proteína Cry8 selecionadas contra <i>A. grandis</i>	72
Figura 19 - Dot Blot de mutantes da proteína Cry8 selecionadas contra <i>S. frugiperda</i>	73
Figura 20 - Gráfico exibindo número de modificações nucleotídicas de variantes BI.....	78
Figura 21 (A e B) - Gel SDS-PAGE 12% e Western Blot de proteínas Cry.....	79
Figura 22 - Relação entre concentração da proteína Cry/BI-25 por mL de dieta de <i>A. grandis</i> e mortalidade.....	81

III - LISTA DE TABELAS

Tabela I - Reagentes das PCRs.....	43
Tabela II - Programas utilizados nas PCRs.....	43
Tabela III - Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos.....	44
Tabela IV - Enzima de restrição.....	44
Tabela V - Reações com enzimas <i>Sfi</i> I e DNaseI e clonagem no PET.....	44
Tabela VI - Dieta artificial de <i>A. grandis</i>	54
Tabela VII - Dieta artificial de <i>S. frugiperda</i>	55
Tabela VIII - Atividade de variantes contra larvas neonatas de <i>A. grandis</i>	75
Tabela IX - Atividade de Cry8 selvagem e mutantes contra larvas neonatas de <i>A. grandis</i>	76
Tabela X - Atividade de variantes contra larvas de 1° instar de <i>S. frugiperda</i>	77
Tabela XI - Bioensaio com a proteína Cry/BI-25 purificada contra larvas neonatas de <i>A. grandis</i>	80

IV - RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva que produz cristais protéicos durante a fase de esporulação. Os cristais, são formados por proteínas Cry e apresentam atividade tóxica específica a determinadas classes de insetos-praga, sendo o seu uso bastante difundido na agricultura. O presente trabalho teve como objetivo gerar uma biblioteca de variantes, do gene *cry8Ha1*, isolado da estirpe S811 de *B. thuringiensis* e selecionar variantes com atividade melhorada para pragas do algodoeiro. A biblioteca foi construída por meio da técnica de DNA *shuffling* e selecionada contra os insetos-praga *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda* pela técnica de *Phage display*. As variantes foram selecionadas pela afinidade aos receptores presentes nas membranas dos intestinos do bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) e da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*), principais pragas do algodoeiro. Após expressão em fago, proteínas variantes foram testadas em bioensaios contra larvas dos insetos-alvo (*A. grandis* e *S. frugiperda*) e seqüenciadas. Os resultados de atividade, mostraram variantes mais efetivas para as duas pragas-alvo, quando comparado com a proteína original Cry8Ha1. O mutante Cry/BI-25 (ativo contra *A. grandis*) foi selecionado, por diferir estatisticamente do controle, e subclonado no vetor de expressão em bactéria. A proteína foi purificada e utilizada em bioensaio contra larvas de *A. grandis*. Os resultados indicaram um aumento de atividade entomotóxica de 333% da proteína mutante (Cry/BI-25) quando comparada com a proteína original (Cry8Ha1). A nova molécula, Cry/BI-25, está sendo utilizada em programas de melhoramento de plantas de algodão visando a obtenção de plantas resistentes à praga-alvo.

V - ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a gram-positive bacterium that produces protein crystals during its sporulation phase. These crystals are formed by Cry proteins that show specific toxicity to some insect-pest classes, which makes their use very common in agriculture. This work aimed at obtaining a library of *cry8Ha1* gene variants, isolated from *B. thuringiensis* S811 and the selection of gene variants, whose products would have an improved insecticidal activity against cotton insect-pests. The library was constructed using DNA *shuffling* and selected against the insect-pests *Anthonomus grandis* and *Spodoptera frugiperda* using *Phage display*. The variants were selected by affinity to Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs) of *A. grandis* and *S. frugiperda* midguts. After phage expression, variant proteins were tested in bioassays against the target insects and their genes sequenced. The mutant Cry/BI-25 showed higher insecticidal activity against *A. grandis* and was subcloned to a bacterium expression vector. The purified expressed protein Cry/BI-25 is 333% more active when compared with protein original (Cry8Ha1). Gene variants selected against *S. frugiperda* are still under analysis. The new improved protein Cry/BI-25 will be used in cotton plant transformation experiments, with the purpose of developing insect-pest resistant GM cotton plants.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas proteínas, com finalidade de aplicação biotecnológica visando à redução dos danos causados por insetos-praga vem contribuindo como alternativa ao controle químico. O controle biológico consiste, principalmente, na utilização de microorganismos como, parasitóides, predadores e patógenos, inimigos naturais das pragas, e tem a finalidade de promover a regulação da população dos principais insetos-praga a níveis não prejudiciais aos cultivos agrícolas (ARANDA *et al.*, 1996). Entre os patógenos destaca-se a bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, que produz uma inclusão paraesporal, protéica, contendo toxinas específicas (proteínas Cry) para diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e Hemiptera, além de outros organismos, como nematóides, ácaros e protozoários (SCHNEPF *et al.*, 1998; GÓMEZ *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2005; PIGOTT & ELLAR, 2007).

No ambiente natural, as proteínas Cry são encontradas sob a forma de protoxinas contidas em cristais protéicos, que quando clivadas proteoliticamente liberam a toxina, porção ativa, a qual é formada por três domínios, denominados I, II e III responsáveis, respectivamente, pela formação do poro no intestino médio do inseto susceptível, ligação específica a receptores, e estabilização da estrutura e também especificidade (BOONSERM *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2005). Pela atividade que apresenta a determinadas classes de insetos, as proteínas Cry vêm sendo amplamente utilizadas como substrato em processos que empregam ferramentas moleculares.

Nas últimas três décadas, diferentes estratégias vêm sendo aplicadas para a obtenção de novos genes, utilizando técnicas de evolução molecular *in vitro*.

Este fato se deve ao surgimento de ferramentas biotecnológicas que servem como plataforma de engenharia genética no desenvolvimento de novas moléculas com atividade melhorada, visando sua aplicação, principalmente, no melhoramento de plantas e na indústria farmacêutica (YUAN *et al.*, 2005).

Para a construção de bibliotecas combinatórias de genes variantes, diferentes estratégias podem ser aplicadas para gerar mutações em uma ou mais seqüência(s) gênica(s), dentre as quais se destaca a técnica de DNA *shuffling* (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997; ABÉCASSIS *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2005; ROSIC *et al.*, 2007). Esta técnica tem como objetivo a evolução molecular dirigida, buscando melhoria na atividade das novas moléculas por meio de mutações aleatórias na seqüência nucleotídica (STEMMER, 1994; YUAN *et al.*, 2005). A metodologia da técnica resume-se basicamente na fragmentação aleatória do gene de interesse (30-50pb) e a recombinação deste produto em PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase), permitindo a amplificação da população de genes variantes. Variantes geradas por DNA *shuffling*, a partir de um único gene podem apresentar apenas mutações pontuais, enquanto que bibliotecas geradas, a partir de dois ou mais genes homólogos, podem apresentar variantes constituídas de fragmentos dos diferentes genes parentais, assim como mutações pontuais (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997).

Para selecionar novas moléculas, a partir de bibliotecas de variantes, muitos trabalhos vêm utilizando a técnica de *Phage display* (BARBAS III *et al.*, 1992; ANDRIS-WIDHOPF *et al.*, 2000; STOOP *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2007). Durante o procedimento de seleção, os fagos que possuem a proteína heteróloga funcional, denominados fagos de fusão, se ligam a receptores de membrana do

intestino (BBMVs – “Brush border membrane vesicles”) (KEETON *et al.*, 1998) do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), sendo eluídos após sucessivos ciclos de lavagem e amplificação (BARBAS III *et al.*, 2000; ANDRIS-WIDHOPF *et al.*, 2000).

O trabalho aqui apresentado teve como objetivo gerar, pela técnica de DNA *shuffling*, uma biblioteca combinatória de variantes do gene *cry8Ha1*. As novas moléculas Cry foram selecionadas pela técnica de *Phage display* por apresentar afinidade a BBMVs do bicudo-do-algodoeiro e da lagarta-do-cartucho. Esta estratégia tem se mostrado eficiente na identificação de novas moléculas com a característica desejada (STOOP *et al.*, 2000). A atividade inseticida de novas toxinas foi identificada para o bicudo-do-algodoeiro e a lagarta-do-cartucho por meio de bioensaios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALGODÃO

A cultura do algodoeiro é de grande importância sócio-econômica, devido ao volume e valor da produção da fibra e dos empregos gerados direta e indiretamente. Como a cultura apresenta poucas exigências em termos de solo e de clima, o algodão é também a fibra vegetal mais utilizada e cultivada no mundo, podendo ser produzido praticamente em todos os continentes (RICHETTI & MELO FILHO, 2001).

A cotonicultura mundial abrange uma área de 34,2 milhões de hectares (ha), com aproximadamente 71% da produção concentrada nos países em desenvolvimento (SHELTON *et al.*, 2002; ICAC, 2006). O Brasil já foi o quarto maior produtor de algodão em pluma do mundo. Porém, entre 1985 e 1996, a cotonicultura brasileira passou por um período de desestímulo, causado, principalmente, pela disseminação do bicudo-do-algodoeiro, o que provocou uma redução drástica da área plantada (de 2.250.000 para 745.000ha cultivados) e da produção (de 2.700.000 para 950.000 toneladas de algodão em caroço) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 2001). Entretanto, a partir de 1997, a atividade teve um novo crescimento. Entre os fatores responsáveis por este novo cenário, destacam-se o deslocamento do eixo produtor da fibra do Sul-Sudeste para o Centro-Oeste do Brasil; a promoção de condições favoráveis para o desenvolvimento da cultura; a utilização de variedades adaptadas; e o uso de modernas técnicas de cultivo, resultando em um aumento substancial da produtividade (BELTRÃO, 1999).

Conforme demonstrado pela ABRAPA (Associação Brasileira de Produtores de Algodão), o histórico de produção do algodão herbáceo (em caroço) no Brasil apresenta uma variação de produtividade nos últimos 16 anos, exibindo um significativo aumento da área plantada e da produção entre 2000 e 2007 (figura 01) (ABRAPA, 2007). Este aumento se deve principalmente ao avanço da cultura do algodão no Brasil, alcançado por meio da competitividade, dos resultados das pesquisas em busca de um produto de excelência e do investimento em tecnologia para atingir melhor produtividade.

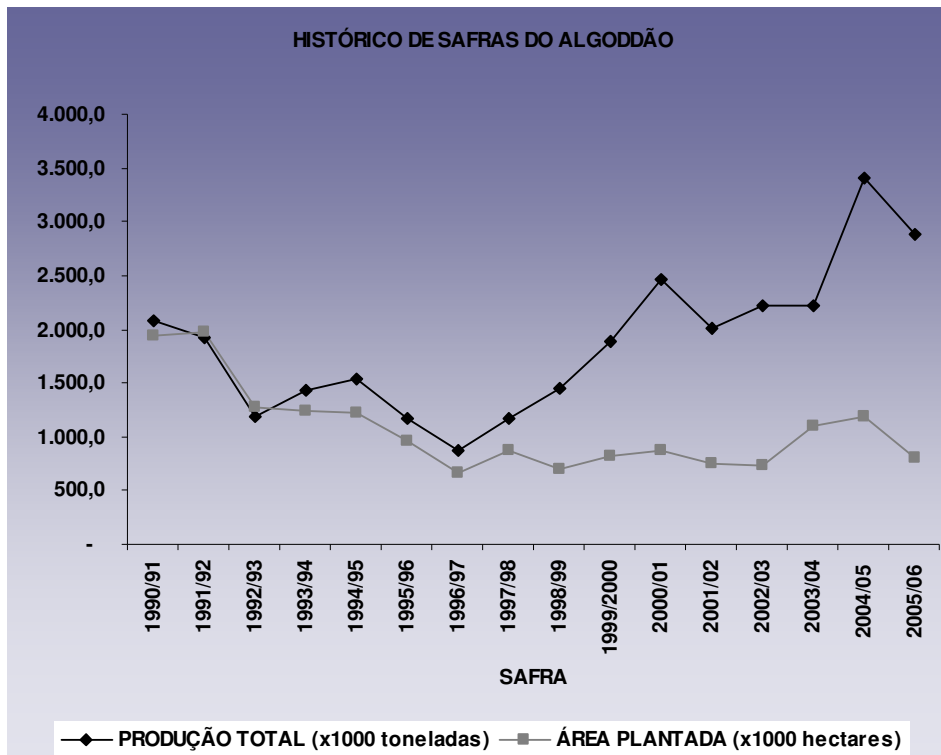


Figura 01. Histórico dos últimos 16 anos de safras do algodão exibindo a variação da produção e área plantada. Disponível no endereço eletrônico: (<http://www.abrapa.com.br/>).

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a cultura do algodão totalizou 2,89 milhões de toneladas, equivalente a 1,6% da

produção, em relação a distribuição percentual obtida de cereais, leguminosas e oleaginosas, no ano de 2006 (Figura 02) (IBGE, 2007). Em 2007, essa distribuição alcançou 3,8 milhões de toneladas, um aumento de 76%, e para 2008 estima-se 4,1 milhões de toneladas (ABRAPA, 2007; IBGE, 2007). Atualmente, o estado do Mato Grosso se destaca como maior produtor de algodão no Brasil, contribuindo com cerca de 53% da produção nacional (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO ORÇAMENTO E GESTÃO, 2007).

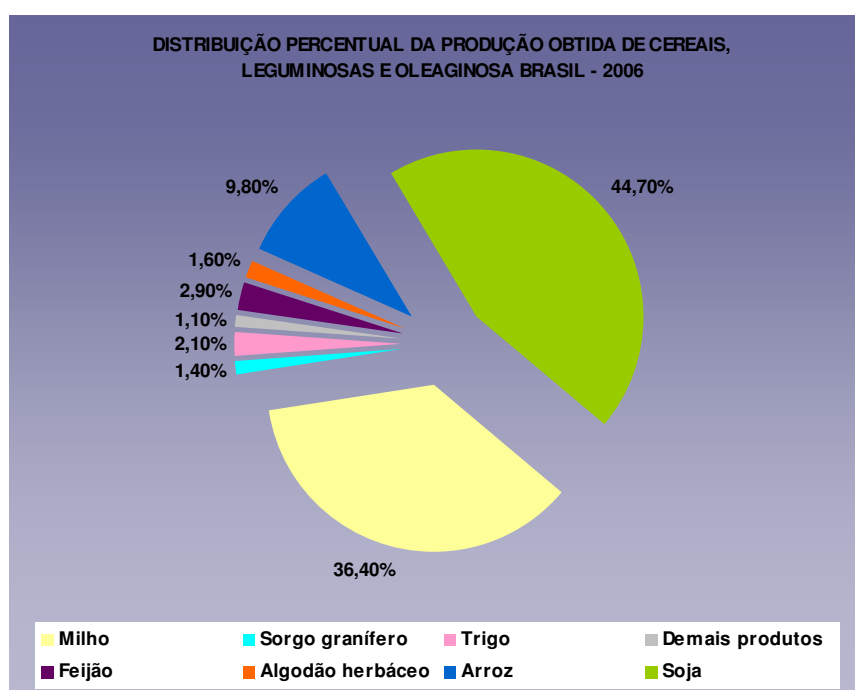


Figura 02. Distribuição da produção obtida de cereais, leguminosas e oleaginosas no Brasil no ano de 2006. O algodão herbáceo (em caroço) participa com 1,6% do percentual da produção. Fonte: IBGE, 2007.

Apesar do avanço alcançado no Brasil, a cultura do algodão se encontra susceptível a um complexo de pragas. Embora existam flutuações populacionais, grandes infestações podem provocar sérios prejuízos à cultura, ocasionando danos às raízes, caule, folhas, botões florais, flores, maçãs e capulhos, afetando a

produtividade da planta (SANTOS, 2001). Isso ocorre devido à presença de inúmeras glândulas, denominadas nectários, que produzem uma secreção líquido-resinosa açucarada, tornando o algodão atrativo aos insetos e gerando gastos com defensivos para o controle de insetos-praga, os quais representam a maior parcela dos custos de produção, aproximadamente 25% dos gastos totais (GALLO *et al.*, 2002).

Entre os principais insetos-praga que atacam a cultura estão incluídos: a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); o bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis* (Coleoptera: Curculionidae); a lagarta-rosada, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae); a lagarta-das-maçãs, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e o curuquerê-do-algodoeiro, *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) (GALLO *et al.*, 2002). O bicudo-do-algodoeiro é considerado o inseto que causa danos mais sérios à cultura do algodão no continente americano {SILVIE, 2001 #1508}.

2.2. BICUDO-DO-ALGODOEIRO (Boheman, 1843)

No Brasil, a detecção do bicudo-do-algodoeiro ocorreu inicialmente em fevereiro de 1983, na região de Campinas, São Paulo. A partir daí, a praga disseminou-se para outras regiões, e em 1985 havia se dispersado por cerca de 350 mil hectares de algodão, nos Estados de São Paulo, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Pela sua rápida disseminação, grandes danos causados nas áreas cotonicultoras do Brasil, capacidade de adaptação a novos ambientes, reforçado por suas características biológicas e comportamentais favoráveis, o bicudo-do-algodoeiro tornou-se uma praga-chave da cultura do algodão no país (ALMEIDA & SILVA, 1999).

Como uma das pragas mais danosas à cotonicultura do continente americano, o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) contribui significativamente para a inviabilização da cultura, principalmente no Brasil {SILVIE, 2001 #1508}. Pertencente à família Curculionidae, subfamília *Anthonominae*, caracteriza-se por utilizar os botões florais e frutos do seu hospedeiro (FRANCO *et al.*, 2004) como fonte de alimento e local de desenvolvimento, causando prejuízos diretos à produção e comercialização da fibra de algodão {Haynes, 1992 #1462}.

O período compreendido entre os 40 e 90 dias se constitui na fase crítica de ataque do bicudo para o algodoeiro. As plantas de algodão de lavouras recém-emergidas exercem forte atração sobre grupos de bicudos sobreviventes da entressafra. O ataque se inicia a partir de bordaduras da cultura, causando danos às partes vegetativas das plantas, como folhas, pecíolos e gemas apicais {Beltrão, 1999 #1537}.

O processo de infestação tem início quando os botões florais do algodão atingem cerca de 6 mm de diâmetro. Ovos são postos isoladamente neste órgão, atingindo um total médio de 150 ovos por fêmea. Tipicamente, o período de incubação dos ovos é de três dias, seguindo-se da eclosão das larvas que apresentam três ínstaes, os quais duram, em média, de dois a quatro dias, cada. O período pupal que se segue dura de quatro a seis dias. Da ovoposição até a saída do adulto, todas as fases da vida do bicudo processam-se no interior do botão floral ou da maçã (fase endofítica), tendo um desenvolvimento em habitat relativamente bem protegido. Um ou dois dias após a primeira muda de pele da larva, o botão floral infectado cai ao solo e a larva continua seu desenvolvimento por cerca de 10 a 11 dias, empupando e tornando-se um novo adulto {Beltrão, 1999 #1537}.

Grandes esforços vêm sendo realizados no intuito de controlar o bicudo-do-algodoeiro, entre os quais estão a utilização de patógenos como o fungo *Beauveria bassiana* (WRIGHT & CHANDLER, 1991; SILVA, 2001), o uso de armadilhas e o controle químico (RAMALHO, 2003). Porém, o bicudo-do-algodoeiro ainda se mantém como praga que causa os maiores prejuízos à cultura do algodão no Brasil. Desta maneira, o uso da biotecnologia se apresenta como uma alternativa promissora, tendo em vista que as diferentes estratégias aplicadas até o momento ainda não apresentaram uma solução muito eficiente no controle da praga. Neste contexto, a incorporação de genes inseticidas levando à obtenção de plantas de algodão geneticamente modificadas (GM), poderá contribuir como alternativa no controle desse importante inseto-praga (PERLAK & DEATON, 1990).

Dados gerais mostram que eventos de algodão geneticamente modificados (GM) não apresentaram efeitos negativos sobre o meio ambiente e a produção, tendo ainda ganhos econômicos e diminuição na aplicação de inseticidas químicos (QUAIM & ZILBERMAN, 2003; FRISVOLD *et al.*, 2006; FRISVOLD & REEVES, 2008). Atualmente, são comercializadas diferentes eventos de algodão GM expressando proteínas Cry, específicas para o controle de lepidópteros. Entre estes, estão, plantas de milho GM contendo o gene *cry1Ab* (Syngenta Bt176, Bt11; Monsanto Mon80100, Mon802, Mon809, Mon810), o gene *cry1Ac* (Dekalb DBT418 - Bt Xtra™), o gene *cry3Bb1* (Monsanto, Mon863-5), o gene *cry9C* (Avenis ACS-ZM4-3, StarLink™); e plantas de algodão GM com o gene *cry1Ac* (Monsanto, Mon531-Bollgard®) e transformadas com o gene *cry1Ac* associado com o gene *cry2Ab* (BollgardII®, DOW 3006, Calgene 31807). Os eventos de algodão GM disponíveis atualmente são eficientes no controle de vários insetos que atacam o algodoeiro, mas não são resistentes ao bicudo-do-algodoeiro. Este fato reforça a necessidade da busca por novas moléculas para a geração de novos eventos de algodão GM.

2.3. LAGARTA-DO-CARTUCHO (J. E. Smith, 1797)

Originária da região neotropical, onde se localizam seus centros de migração, a lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) (Figura 03. A) apresenta ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, até a Argentina e Uruguai, na América do Norte (Estados Unidos e México) e no Caribe (ANDREWS, 1980; ASHLEY *et al.*, 1989).



Figura 03. Larvas de *S. frugiperda*. A) Danos provocados pela *S. frugiperda* ao milho, disponível no endereço eletrônico: (www.biocontrole.com.br), B) Danos ao algodão, disponível no endereço eletrônico: (www.uni-bayreuth.de).

No Brasil, a lagarta-do-cartucho é um importante inseto-praga, causando danos a diferentes espécies cultiváveis, tais como milho, arroz, soja e algodão, entre outros. Suas mariposas, que possuem em média 25mm de comprimento e 35mm de envergadura (FREIRE *et al.*, 1997), migram entre plantas e culturas hospedeiras existentes nas regiões agrícolas (SANTOS, 2001), provocando danos que são causados desde a emergência até a maturação das plantas. O ciclo larval completo é de 12 a 30 dias dependendo da temperatura e o número de ovos postos variável de acordo com a alimentação e a temperatura (BUSATO *et al.*, 2005).

Os ovos, que são colocados sob as folhas existentes na base do ponteiro, eclodem de três a sete dias após a oviposição. Geralmente, logo após a eclosão,

a lagarta possui 1,5mm de comprimento, cor verde-clara, cabeça preta, com pêlos negros (SANTOS, 2001). As lagartas recém-eclodidas raspam o parênquima das folhas, deixando-as necrosadas e translúcidas. Posteriormente, ainda nos estádios iniciais, destroem a epiderme das brácteas, dos botões florais, das flores e das maçãs (Figura 3. B). Já as lagartas de tamanho médio e grande raspam a base das maçãs antes de perfurá-las (FREIRE *et al.*, 1997; SANTOS, 2001). As lagartas de último estágio atingem tamanhos que variam entre 35 e 50mm de comprimento e possuem coloração variando de esverdeada a pardo-escura (SANTOS, 2001). Após o ciclo larval, as lagartas caem no solo e passam à fase de pupa. Esta etapa do ciclo de vida pode durar de cinco a dez dias, na qual a crisálida ou pupa é marrom-avermelhada e torna-se progressivamente mais escura, ficando praticamente preta próxima à emergência do adulto (CRUZ *et al.*, 1999).

Uma série de fatores contribui para os surtos deste inseto-praga no algodão, tais como: condições climáticas favoráveis; aplicação excessiva e inadequada de inseticidas; e a rotação do algodoeiro com cultivares de milho, sorgo, soja e aveia, hospedeiros potenciais da lagarta-do-cartucho (SOARES & VIEIRA, 1998). Por isso, sua importância como praga do algodão tem aumentado ano após ano, especialmente diante da intensificação dos ataques em vários estados brasileiros, principalmente Mato Grosso, Goiás, Bahia e Paraíba (ALMEIDA & SILVA, 1999).

2.4. CONTROLE BIOLÓGICO

Na maioria dos países onde o algodão é cultivado, a vulnerabilidade às pragas representa o principal problema desta cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, os produtores utilizam defensivos agrícolas como única forma de proteção das lavouras. Embora eficientes, os inseticidas químicos são onerosos e potencialmente danosos ao homem e ao meio ambiente. A longo prazo podem também, ocasionar o desencadeamento de processos de resistência, ressurgimento de pragas e redução na incidência de inimigos naturais {PANIZZI, 1977 #1504; PANIZZI, (1977) #1504; PANIZZI, 1977 #1504; PANIZZI, (1977) #1504; PANIZZI, (1977) #1504}. Devido a este fato, alternativas ao uso de inseticidas químicos como o controle biológico são desejadas.

O controle biológico consiste na utilização de inimigos naturais das pragas, dentre eles parasitóides, predadores e patógenos, com a finalidade de promover o controle da população dos principais insetos-praga em níveis não prejudiciais aos cultivos agrícolas (ARANDA *et al.*, 1996; CRICKMORE, 2006).

A diversidade biológica de microrganismos e compostos orgânicos, encontrados na natureza, possibilita o desenvolvimento de novos produtos com maior patogenicidade e especificidade a insetos-alvo. Dentre esses microrganismos, uma grande descoberta foi a utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico e como fonte de moléculas potenciais para programas biotecnológicos destinados à obtenção de plantas GM resistentes a insetos-praga. Utilizando-se esta estratégia, foi possível reduzir a níveis toleráveis as populações de insetos agrícolas, sem os efeitos danosos dos defensivos agrícolas {Perlak, 1990 #1505}.

2.5. *Bacillus thuringiensis* Berliner

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada em ambientes como o solo (MARTIN & TRAVERS, 1989; CHILCOTT & WIGLEY, 1993; URIBE *et al.*, 2003; VALICENTE & BARRETO, 2003), superfície de folhas, insetos doentes e mortos (CHILCOTT & WIGLEY, 1993; DAMGAARD, 2000) e em produtos e sementes armazenados (DAMGAARD, 2000).

A primeira referência a respeito da bactéria *B. thuringiensis* (Figura 04. A) ocorreu em 1901, no Japão, onde foi isolada a partir de lagartas mortas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), as quais tiveram a causa da morte atribuída a uma proteína ou proteínas associadas com esporos desta bactéria. Como a proteína matava os indivíduos rapidamente, a bactéria foi denominada *Bacillus sotto*, já que “sotto” significa colapso súbito em japonês (YAMAMOTO & DEAN, 2000).

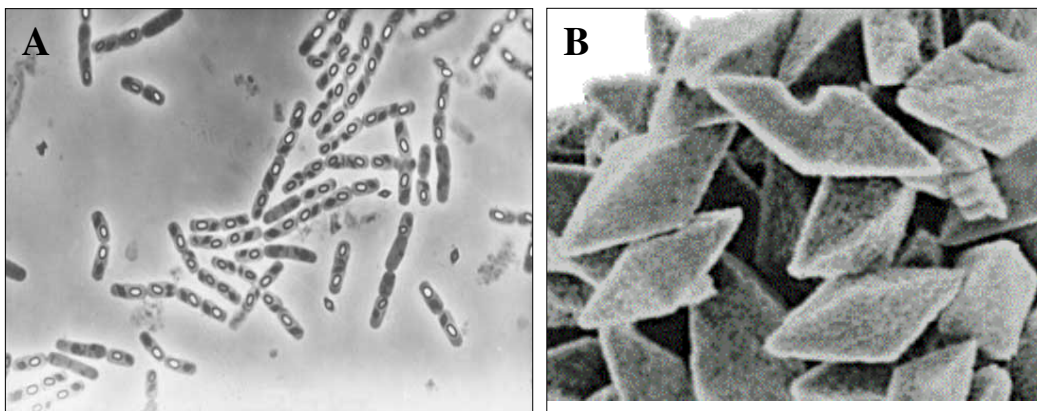


Figura 04. Células vegetativas e cristais de *B. thuringiensis*. A) Células vegetativas de *B. thuringiensis*, disponível no endereço eletrônico: (www.futura-sciences.com), B) Cristais de *B. thuringiensis*, disponível no endereço eletrônico: (www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/).

Uma década mais tarde, em 1915, um bacilo que causava morte em lagartas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) também foi isolado. Além da elucidação de alguns aspectos da patogenicidade, a bactéria foi descrita e denominada *B. thuringiensis* por Berliner, sendo este material, considerado como *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (sorotipo H-1) (HABIB & ANDRADE, 1998).

Desde então, milhares de cepas de *Bt* têm sido isoladas em várias regiões do mundo e classificadas em subespécies, de acordo com a sorologia flagelar. Conforme descreveu Lecadet *et al.* (1999), 82 sorovariedades foram caracterizadas, sendo 69 sorotipos e 13 grupos sub-antigênicos. Entre as sorovariedades, *B. thuringiensis kurstaki* tem sido mundialmente utilizada em formulações comerciais devido ao seu amplo espectro de ação contra importantes lepidópteros, pragas agrícolas e florestais (YAMAMOTO & DEAN, 2000).

À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode se manter em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais protéicos em um dos pólos da célula, chamado de corpo paraesporal (Figura 04. B) (SAYYED *et al.*, 2001; ARONSON, 2002). Estes cristais, responsáveis pela toxicidade específica a determinadas classes de insetos, são compostos por uma ou várias proteínas: as α e β -exotoxinas, as proteínas VIP "Vegetative Insecticidal Protein" (ESTRUCH *et al.*, 1996 a; YU *et al.*, 1997), e as δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt). A durabilidade dos cristais é altamente variável, dependendo das condições ambientais, já o esporo, que

representa a forma de resistência da bactéria, pode sobreviver durante vários anos (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

Vários estudos têm demonstrado a efetividade de proteínas Cry no controle de larvas de mosquitos, bem como de outros insetos (REGIS *et al.*, 2000; MAAGD *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2005; CRICKMORE, 2006; SOBERON *et al.*, 2007). As proteínas produzidas por *B. thuringiensis* que apresentam atividade inseticida sobre insetos da ordem coleóptera são as proteínas Cry3, Cry7, e Cry8, bem como, Cry1B e Cry1I, as quais apresentam dupla atividade contra lepidópteros e coleópteros {Bravo, 1998 #10}. Dequech *et al.* (2005) relatam a atividade inseticida do produto comercial Xen Tari (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda), à base de *B. thuringiensis aizawai*, sobre larvas da lagarta-do-cartucho. Estudos em laboratório com eventos de plantas GM de milho, com o gene *cry1Ac* e algodão com o gene *cry1Ab*, efetivos no controle de insetos da ordem Lepidoptera, concluíram que plantas *Bt* não apresentam nenhum efeito direto sobre os inimigos naturais, bem como aos que se alimentam destes (ANDOW *et al.*, 2006). A classificação das proteínas Cry, atualizada, encontra-se disponível no endereço eletrônico (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/).

2.5.1. PROTEÍNAS Cry E SEU MECANISMO DE AÇÃO

As proteínas Cry ou δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Bt) fazem parte de um grupo de proteínas com atividade contra diferentes ordens de insetos, tais como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, além de nematóides (SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007). Portanto, a utilização desta bactéria é uma alternativa de controle de insetos-praga na agricultura, bem como de importantes vetores de doenças humanas. As proteínas Cry compreendem pelo menos 50 subgrupos, com mais de 200 membros que formam inclusões paraesporais, ou cristais (BRAVO *et al.*, 2005). Uma ou mais proteínas Cry podem estar contidas em um cristal protéico, os quais possuem formas variadas, podendo ser bipiramidais, esféricos, cubóides, romboidais, retangulares ou irregulares (MAAGD *et al.*, 2003).

Atualmente são conhecidas as estruturas das proteínas Cry1Aa (LI *et al.*, 1991), Cry2Aa (GROCHULSKI *et al.*, 1995), Cry3Aa (MORSE *et al.*, 2001), Cry3Bb (GALISTKY *et al.*, 2001), Cry4Ba (BOONSERM *et al.*, 2005) e Cry4Aa (BOONSERM *et al.*, 2006), definidas por padrões de difração de cristalografia de raios-X. A estrutura terciária dessas proteínas revelou três domínios bem distintos, envolvidos na atividade da proteína (figura 05).

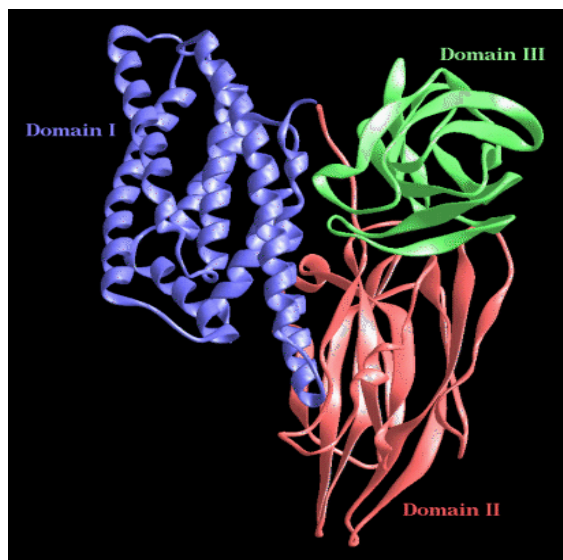


Figura 05. Estrutura terciária das proteínas Cry. Disponível no endereço eletrônico: www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/bttox.htm.

O domínio I é altamente conservado e consiste de sete α -hélices, sendo a quinta α -hélice rodeada pelas demais. Alguns estudos demonstraram que este domínio é responsável pela interação entre monômeros e que as α -hélices se inserem na membrana celular formando poros (VON TERSCH *et al.*, 1994; GROCHULSKI *et al.*, 1995; BRAVO, 1997; BRAVO *et al.*, 2002; BOONSERM *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 2007; SOBERÓN *et al.*, 2007). O domínio II é formado por três folhas β antiparalelas e alguns “loops” que estão envolvidos na ligação ao receptor, na membrana intestinal (SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2005). O domínio III apresenta uma estrutura em β sanduíche (LI *et al.*, 1991; BRAVO *et al.*, 2005) e acredita-se, que este domínio seja importante na estabilidade da proteína e ligação da toxina com a membrana do intestino do inseto (BRAVO *et al.*, 2005). É necessária a

participação dos três domínios que formam a toxina Cry ativa para ocorrer a lise celular e, conseqüente, a morte do inseto.

Para elucidar o mecanismo de ação destas toxinas, estudos têm sido realizados e os modelos propostos foram descritos em experimentos utilizando, na maioria, toxinas da família Cry1A. Inicialmente, ocorre a ingestão do cristal protéico pelo inseto e a solubilização deste cristal no ambiente alcalino do intestino médio do inseto, expondo as pró-toxinas que o compõem. As pró-toxinas em solução são então ativadas por proteases, que clivam as porções N-terminal e C-terminal, liberando um monômero de aproximadamente 60-70kDa (GROCHULSKI *et al.*, 1995; BRAVO, 1997; LÜTHY & WOLFERSBERGER, 2000; YAMAMOTO & DEAN, 2000; GÓMEZ *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2005; FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 2007; PIGOTT & ELLAR, 2007; SOBERON *et al.*, 2007). Em Lepidópteros, as principais enzimas digestivas envolvidas na clivagem das proteínas Cry são as proteases serínicas, como a tripsina e a quimiotripsina (SCHNEPF *et al.*, 1998) e em coleópteros, as proteases cisteínicas e aspárticas (MAAGD *et al.*, 2001). A partir deste ponto, dois modelos distintos são propostos para a ação das toxinas. No modelo de sinalização, estudos realizados em cultura de células de inseto sugerem que, após a ativação por proteases, estruturas monoméricas se ligam a caderinas, iniciando uma via de sinalização magnésio-dependente, culminando na morte celular por apoptose (ZHANG *et al.*, 2005, ZHANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008).

No modelo de toxicidade proposto por Bravo *et al.* (2007), a toxina interage com dois receptores diferentes. Na forma monomérica, a toxina liga-se a uma

caderina (Bt-R1), ocorrendo um novo processamento proteolítico, no qual é retirada a primeira α -hélice e, assim permitindo a oligomerização da toxina. A estrutura oligomérica resultante (estrutura denominada de pré-poro) liga-se, então, ao segundo receptor, uma aminopeptidase N (APN) GPI-ancoradas, direcionando o oligômero a zonas denominadas de “lipid rafts”, ocorrendo a inserção na região apical da membrana. Deste modo, ocorre a formação do poro, causando o descontrole osmótico, lise celular (BRAVO, 1997; BRAVO *et al.*, 2002; BRAVO *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 2007; SOBERON *et al.*, 2007) e morte do inseto por inanição (SCHNEPF *et al.*, 1998; SCHWARTZ & LAPRADE, 2000; BRAVO *et al.*, 2007; SOBERON *et al.*, 2007). A figura 06 ilustra, de maneira geral o modelo de ação proposto por Bravo *et al.* (2007).

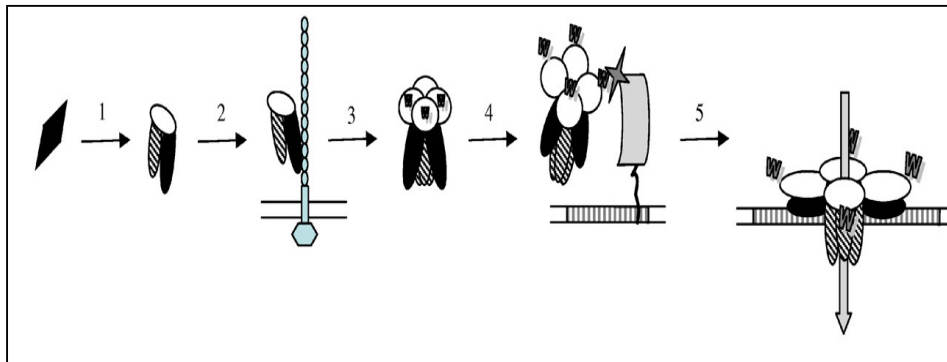


Figura 06. Esquema do modelo de formação de poro pelas proteínas Cry. 1) Solubilização do cristal e clivagem proteolítica da pró-toxina, liberando a proteína ativa. 2) Proteína ativa se ligando ao receptor primário do tipo caderina. 3) Formação do oligômero (estrutura conhecida como pré-poro), aumento da afinidade da proteína pelos receptores secundários. 4) Ligação do oligômero com os receptores secundários. 5) Interação entre a membrana da célula e o oligômero formado de proteínas ativas e a formação do canal iônico, causando efeitos citopatológicos que acarretam na lise celular. Figura adaptada de (BRAVO *et al.*, 2007).

2.6. DNA shuffling

A prospecção de genes codificadores de proteínas que conferem resistência contra insetos-praga e patógenos, com especificidade elevada, tem sido de grande importância para os programas de melhoramento de plantas. Novas proteínas estão constantemente sendo caracterizadas contra os diversos organismos alvo para a determinação do grau de toxicidade e especificidade. Além da busca de moléculas com estas características, o emprego de técnicas de biotecnologia, como a evolução molecular *in vitro*, constitui uma via alternativa para a obtenção destas proteínas visando sua utilização em produtos agrícolas melhorados (LASSNER & BEDBROOK, 2001).

A evolução molecular é um processo lento e natural que ocorre ao longo dos anos e está relacionada a modificações sofridas por um determinado organismo vivo em seu material genético (DNA ou RNA), as quais ocorrem na forma de remoções, inserções e/ou substituições de nucleotídeos (CHOPRA & RANGANATHAN, 2003). Na ideia de “Evolução em laboratório” ou “Evolução dirigida” (FARINAS *et al.*, 2001; POWELL *et al.*, 2001; TAO & CORNISH, 2002) descrita nos anos de 1994 a 2003 (STEMMER, 1994; CRAMERI *et al.*, 1997; HAMES & PLUCKTHUN, 1997; CRAMERI *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 1998; OSTERMEIER *et al.*, 1999; LASSNER & BEDBROOK, 2001; CHOPRA & RANGANATHAN, 2003), técnicas para simular a evolução molecular *in vitro* são utilizadas para melhorar as propriedades de proteínas como as de interesse farmacêutico, industrial e agrônomo (CHRISTIANS *et al.*, 1999; LASSNER & BEDBROOK, 2001; PATNAIK *et al.*, 2002).

Dentre as diferentes estratégias empregadas para gerar mutações, como mutagenese sítio-dirigida, PCR tendente a erro e utilização de oligonucleotídeos degenerados em regiões específicas, destaca-se a técnica de DNA *shuffling*, descrita inicialmente por Stemmer (1994) em estudos de evolução molecular com o gene *TEM-1* codificador de β -lactamase, no qual foi produzida uma molécula 32000 vezes mais ativa em relação à proteína original.

Diferentes relatos comprovam a eficiência da técnica em produzir novas moléculas com atividade melhorada (ZHAO & ARNOLD, 1997; ABÉCASSIS *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2005; ROSIC *et al.*, 2007). Sua aplicação tem resultado em produtos como enzimas com uma melhor cinética, substrato alterado ou produto específico, ou enzimas com função melhorada em diferentes ambientes celulares. Jager *et al.* (2007) obtiveram uma nova Penicilina acilase com atividade enzimática aumentada em até 90%. FAN *et al.* (2007) geraram novas moléculas de quitinase com aumento de atividade de 36 a 56% em relação a molécula original. Outros trabalhos também têm empregado a técnica com êxito, produzindo novos carotenóides, moléculas que proporcionam o aumento da desintoxicação de herbicidas poluentes e genes conferindo resistência a insetos como os codificadores para as proteínas Cry (LASSNER & BEDBROOK, 2001).

A técnica de DNA *shuffling* envolve as seguintes etapas: (1) isolamento do gene ou dos genes de interesse; (2) digestão enzimática; (3) recombinação dos fragmentos gênicos e (4) amplificação das novas seqüências (figura 07) (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997; SILVA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005), como resumidamente descritas a seguir:

(1) Obtenção do substrato. O substrato da reação consiste de um ou mais genes que apresentam variada taxa de homologia. Estes genes podem ser obtidos por meio de digestão com enzimas de restrição, a partir de seus plasmídeos originais ou por meio de amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na obtenção do gene devem conter sítios para as enzimas de restrições, a fim de permitir futuras subclonagens em vetores de expressão.

(2) Fragmentação do(s) gene(s). O substrato é fragmentado randomicamente, utilizando, de modo geral a enzima *DNase*I, sob condições controladas. Alternativamente, utilizam-se enzimas de restrição, as quais, neste caso, permitem estimar o tamanho dos fragmentos gerados.

(3) Recombinação gênica. Uma PCR, sem adição de oligonucleotídeos iniciadores específicos, é realizada utilizando-se como molde o produto da etapa (2). Os fragmentos isolados, ao se anelarem, formam “homoduplexes” (originados de anelamento de seqüências do mesmo gene) ou “heteroduplexes” (anelamento de seqüências de genes distintos) que funcionarão como “iniciadores” da reação. Uma taxa maior de heteroduplexes, em relação aos homoduplexes, é desejada com intuito de atingir maior diversidade na recombinação. Durante a etapa de extensão, os pequenos duplexes se sobrepõem, formando pontos de junção entre os diferentes segmentos de seqüências homólogas.

(4) Amplificação dos genes recombinados. Uma alíquota do produto da primeira PCR (etapa 3) é submetida a nova PCR, porém com a adição de oligonucleotídeos iniciadores específicos, que contêm as seqüências 5' e 3' dos genes originais. Os homo ou heteroduplexes estendidos atuam como moldes para

a amplificação dos genes recombinados, contendo o mesmo tamanho do gene original.

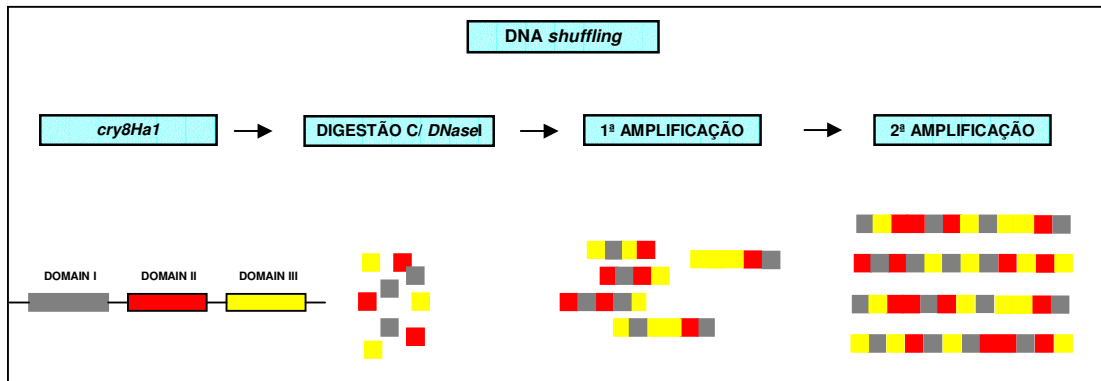


Figura 07. Esquema da Técnica de DNA *shuffling* utilizando um único gene como substrato. O gene *cry8Ha1* foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para inserção do sítio de restrição à enzima *Sfi* e posteriormente utilizado na técnica de DNA *shuffling*.

O sucesso da técnica de DNA *shuffling* é dependente de um eficiente arranjo entre o tamanho da biblioteca, da diversidade biológica originada e da escolha de um processo de seleção eficiente, para a identificação das variantes contendo as características desejadas (ROBERTS & SZOSTAK, 1997; YUAN *et al.*, 2005).

2.7. Phage display

Grande parte dos processos biológicos envolve contatos entre superfícies macromoleculares (enzima-substrato, receptores-efetores, proteínas-ácidos nucléicos, entre outros), que são resultantes das forças físico-químicas, características dessas superfícies contactantes (KENAN *et al.*, 1994). Por meio do entendimento destes processos biológicos, hoje é possível aplicar, em laboratório, métodos que objetivam dirigir artificialmente a evolução molecular e selecionar populações moleculares compostas pelo maior número de variantes (POSNER *et al.*, 1994).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas na geração de bibliotecas conformacionais, entre as quais se destacam as bibliotecas sintetizadas quimicamente, como as de oligonucleotídeos e de peptídeos fixos ou em solução; e as produzidas em sistemas vivos, como as leveduras, bactérias ou bacteriófagos filamentosos (SCOTT, 1993).

Na técnica de *Phage display*, a biblioteca de variantes é apresentada em fagos filamentosos, que passam a ser chamados de fagos de fusão por apresentarem fusionada sua proteína III à proteína heteróloga. A seleção é realizada por meio de incubação dos fagos de fusão com a proteína ligante fixa em um suporte. Os fagos de fusão com afinidade pelo ligante são recuperados e utilizados em experimentos posteriores de caracterização da nova molécula.

A exemplo de bacteriófagos, encontram-se M13, f1, fd, entre outros, pertencentes à família Imunoviridae de bacteriófagos, com material genético DNA fita simples (ssDNA). A infecção viral ocorre via *pilus* sexual de células bacterianas gram negativas, que apresentam o gene da fímbria codificado pelo

plasmídio F. Os fagos gerados são liberados a cada ciclo de infecção, sem que ocorra lise da membrana celular, durante a liberação das novas partículas virais, caracterizando um ciclo lisogênico (BRIGIDO & MARANHÃO, 2002).

O bacteriófago filamentoso M13 (figura 08) é muito utilizado na construção de bibliotecas e possui a seguinte organização estrutural: 9.300 Å de comprimento e 65 Å de diâmetro, sendo montada primeiramente sua extremidade distal recoberta por cinco cópias da proteína pVII (composta por 33 resíduos de aminoácidos) e cinco moléculas de pIX (formada por 32 resíduos de aminoácidos) (figura 8). A extremidade proximal, que é montada por último, possui cinco cópias de pVI (contendo 113 resíduos de aminoácidos) e cinco de pIII (com 406 resíduos de aminoácidos). Entre as duas extremidades, o DNA circular e de fita simples (ssDNA) é recoberto por milhares de cópias de pVIII (contendo 50 resíduos de aminoácidos) (BRIGIDO & MARANHÃO, 2002).

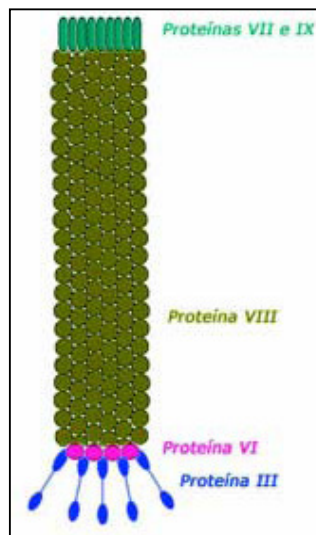


Figura 08. Organização da estrutura de uma partícula viral do bacteriófago M13. Fonte: (BRIGIDO & MARANHÃO, 2002).

A proteína III é a principal proteína estrutural utilizada na apresentação de bibliotecas, sendo, ainda, responsável pela adesão da partícula viral ao *pilus*

sexual (MAKOWSKI, 1993; BRIGIDO & MARANHÃO, 2002). Bibliotecas que utilizam esta proteína para apresentação são ditas monovalentes por apresentarem no máximo três cópias da proteína de fusão, promovendo uma maior afinidade na seleção (BRIGIDO & MARANHÃO, 2002). Com o objetivo de selecionar novas moléculas, trabalhos vêm utilizando a técnica de *Phage display* fusionando proteínas exógenas à proteína III (BARBAS III *et al.*, 1992; ANDRIS-WIDHOPF *et al.*, 2000; STOOP *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2007).

Em vários trabalhos, toxinas Cry são apresentadas na superfície de fagos (MARZARI *et al.*, 1997; KASMAN *et al.*, 1998; VÍLCHEZ *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2007) Recentemente, Ishikawa *et al.* (2007) descreveram um novo sistema para evolução dirigida de proteínas de *B. thuringiensis* (Cry1A) combinado com *Phage display* e utilizando fago T7 no processo de seleção. Neste trabalho foi demonstrado o potencial da metodologia para desenvolver toxinas inseticidas mais ativas, a partir de toxinas com baixa atividade. Em Fernández *et al.* (2008), a técnica de *Phage display* foi utilizada com sucesso, na apresentação de anticorpos de peptídeos da toxina Cry1Ab, fusionados a proteína III do fago M13, para se determinar a interação toxina-receptor.

3. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral a construção de uma biblioteca combinatória com o gene *cry8Ha1*, utilizando-se a técnica de DNA *shuffling*; e selecionar variantes com atividade entomotóxica melhorada contra as larvas dos insetos-praga bicudo-do-algodoeiro e lagarta-do-cartucho, por meio da técnica de *Phage display*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Subclonar o gene *cry8Ha1*, ativo para o bicudo-do-algodoeiro, no vetor pComb3XSS;
2. Construir a biblioteca combinatória do gene *cry8Ha1* por meio das técnicas DNA *shuffling* e *Phage display*;
3. Selecionar variantes com atividade entomotóxica melhorada às pragas-alvo (bicudo-do-algodoeiro e lagarta-do-cartucho);
4. Expressar as variantes em sistema heterólogo (Fago e *E. coli*);
5. Determinar a atividade tóxica das variantes em bioensaios utilizando larvas do bicudo-do-algodoeiro e da lagarta-do-cartucho;
6. Expressar e purificar a variante com maior atividade entomotóxica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *cry8Ha1*

Foi utilizado como substrato para gerar variantes pela técnica de *DNA shuffling* (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997) o gene *cry8Ha1*, contendo 2001pb, isolado da cepa S811 de *B. thuringiensis*, que codifica para proteína ativa contra *A. grandis* (MAGALHÃES *et al.*, em preparação; GROSSI de SÁ *et al.*, patente em preparação).

O gene *cy8Ha1* foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase PCR-1 (tabela I e II), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos 1 e 2 (tabela III) para a inserção da seqüência da enzima de restrição *SfiI* nas extremidades 5' e 3' do gene. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, após eletroforese a 100 Volts durante 90 minutos. O fragmento de DNA amplificado foi extraído do gel utilizando o Kit GENE CLEAN[®] II (BIO 101), seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Posteriormente, o produto amplificado foi digerido com a enzima de restrição *SfiI* (tabela V) e analisado em gel agarose conforme descrito acima. O procedimento de amplificação e digestão foi repetido até se acumularem cerca de 40 microgramas do fragmento de DNA contendo os sítios da enzima *SfiI*.

TABELA I. Reagentes das PCRs

REAGENTES PCR-1	μl
DNA	1
TAMPÃO Taq PHT [10x]	2
dNTP [10mM]	0,4
PRIMER SENSE [12,5 μM]	0,5
PRIMER ANTISENSE [12,5 μM]	0,5
Taq PHT [5 Uindades/ μL]	0,2
H ₂ O	15,4
VOLUME TOTAL	20

REAGENTES PCR-2	μl
PRODUTO DE DNA DIGERIDO POR <i>DNaseI</i>	10
TAMPÃO Taq Platinum [10x]	12,5
dNTP [10mM]	1
MgSO ₄ [50mM]	1
Taq Platinum High Fidelity [5 Uindades/ μL]	0,5
VOLUME TOTAL	25

REAGENTES PCR-3	μl
PRODUTO DA PCR-2	7,6
TAMPÃO Taq Platinum [10x]	50
dNTP [10mM]	10
PRIMER SENSE [12,5 μM]	32
PRIMER ANTISENSE [12,5 μM]	32
MgSO ₄ [50mM]	20
Taq PHT [5 Uindades/ μL]	5
Taq Platinum High Fidelity [5 Uindades/ μL]	5
H ₂ O	338,4
VOLUME TOTAL	500

TABELA II. Programas utilizados nas PCRs

PCR-1	95°C - 5'; 29x {95°C - 40'', 45°C - 40'', 72°C - 40''}; 72°C - 2'.
PCR-2	95°C - 2'; 43x {95°C - 1', 44°C - 1', 72°C - 1' + 5'' por ciclo}; 72°C - 7'.
PCR-3	95°C - 2'; 10x {95°C - 30'', 45°C - 30'', 72°C - 1'}; 14x {95°C - 30'', 43°C - 30'', 72°C - 42'' + 20'' por ciclo}; 72°C - 10'.

TABELA III. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos

1	PRIMERSfiI F	5'CCC GGC CCA GGC GGC CGA CCA CGC GTA TCG A 3'
2	PRIMERSfiI R	5'CCC GGC CGG CCT GGC CGT TCA AGG AAC CGT T 3'
3	PCOMB F	5'GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T 3'
4	PCOMB R	5'CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT 3'
5	Cry8 INTER F	5'CAT ATG CAC AAG CTG CGA ATT 3'
6	Cry8 INTER R	5'GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T 3'
7	BI 25 INTER F	5'AGC GGA TTT GGG CAA TTC AG 3'
8	BI 25 INTER R	5'TAA CAG CTG GAA TTT GAG GA 3'
9	BI25PET F	5'CAC CAT GCG ACA CCT TCT ACA TCT G 3'
10	BI25PET R	5'CTA AGA AGC GTA GTC CGG AAC 3'

TABELA IV. Enzima de restrição

ENZIMA	SÍTIO
<i>Sfi</i> I	5'...GGCCNNNN*NGGCC...3'
	3'...CCGGN*NNNNCCGG...5'

TABELA V. Reações com enzimas as *Sfi* e *DNase* I e clonagem no PET

<i>Sfi</i> 50 °C/24H	DNA p/100µg (µL)	Neb2 (µL)	BSA 100µg/mL (µL)	<i>Sfi</i> 4U/µL (µL)	H ₂ O 10µL/µg de DNA (µL)
	15	107	20	40	1000
<i>DNase</i> I 15°C/20'	DNA µg/seco		Tampão <i>DNase</i> I (µL)	<i>DNase</i> I 124,5U (µL)	
	10		80	0,6	

Neb2[®] (BIOLABS).

Ligase T4 15 °C/24H	Inserto 900 ng (µL)	Vetor 3600 ng (µL)	Tampão (µL)	Ligase T4 4U/µL (µL)	H ₂ O _{qsf} 200 µL
	1	1	40	3	155

pET101/D TOPO 23 °C/20 Min.	Produto da PCR (µL)	Vetor pET101/D TOPO (µL)	SOLUÇÃO SALINA 1.2M NaCl, 0.06M MgCl(µL)	H ₂ O _{qsf} 6µL
	1	1	1	3

4.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA COMBINATÓRIA POR DNA *shuffling*

Para a construção da biblioteca combinatória foi utilizado o gene *cry8Ha1* conforme descrito acima (item 4.1), empregando-se a estratégia que combinou as técnicas de DNA *shuffling* (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997) e *Phage display* (BARBAS III, 1992).

Para o procedimento de DNA *shuffling*, o fragmento de DNA molde foi digerido pela nuclease *DNaseI* de acordo com as condições citadas na tabela V, sendo a reação de digestão interrompida com 5µL de EDTA 0,5M. Nesta etapa, as condições da reação de digestão foram estabelecidas para se obter fragmentos do gene com tamanhos entre 30–50pb. Os fragmentos gerados foram purificados com o kit “HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT®” (ROCHE). Após a eluição, os fragmentos foram utilizados na PCR-2, conforme descrito nas tabelas I e II. Esta reação foi realizada sem a adição de oligonucleotídeos iniciadores específicos, resultando em um “pool” de fragmentos de tamanhos variados, representando a tentativa de reconstituição do gene. O produto desta reação foi usado na PCR-3 (tabelas I e II) com adição dos oligonucleotídeos iniciadores específicos 1 e 2 (tabela III), a fim de se reconstituir o gene.

Os diferentes fragmentos de DNA amplificados após PCR-3 (2001pb) foram analisados em gel de agarose 1% utilizando-se o kit GENE CLEAN® II. Deste DNA, aproximadamente 25µg foram digeridos com a enzima de restrição *SfiI* (reação descrita na tabela V). O produto desta digestão foi analisado em gel de agarose 1% e o DNA correspondente (aproximadamente 2011pb) foi eluído do gel.

A população de variantes contendo as extremidades coesivas em *SfiI* foi inserida no vetor pComb3XSS (ANDRIS-WIDHOPF *et al.*, 2000), usando-se a

enzima T4 DNA Ligase[®] (INVITROGEN), conforme descrito na tabela V. O produto da reação de ligação (plasmídeo pComb3XSS-*cry*) foi utilizado na transformação (figura 09), por eletroporação, de células de *Escherichia coli* XL1-BLUE[®] STRATAGENE, (capacitância 25uFD; resistência 200OHMS; voltagem 2,5kvolts). Após a transformação, as células foram crescidas durante 17 horas a 37 °C, em meio de cultura Luria Bertani-LB agar (10g/L de Triptona, 5g/L de Extrato de Levedura, 5g/L de Cloreto de Sódio e 20g/L de Agar, pH 7,5, autoclavar) contendo Ampicilina[®] (USB) em uma concentração de 100µg/mL.

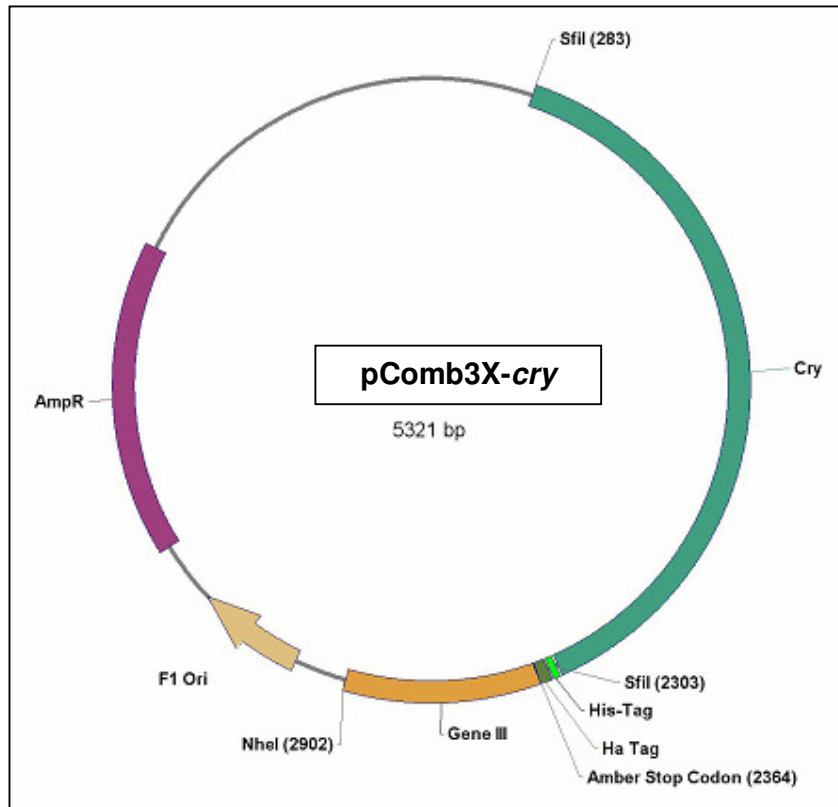


Figura 09. Representação esquemática do vetor fagomídeo utilizado para construção da biblioteca combinatória, contendo o gene *cry8Ha1* e variantes do gene *cry8Ha1*, inseridos no sítio de restrição *SfiI*.

SfiI: sítios de restrição à enzima *SfiI* (283pb – 2303pb), clonagem do gene *cry*.

His-Tag: seqüência de 18 nucleotídeos codificadores de 6 resíduos do aminoácido histidina utilizados no processo de purificação da proteína heteróloga.

Ha Tag: seqüência codificante da Hemaglutinina. Utilizada para reconhecimento por anticorpo Anti-Ha.

Amber Stop Codon: códon terminador.

Gene III: seqüência codificante da proteína III.

F1 Ori: região de origem da replicação.

AmpR: gene que codifica para resistência ao antibiótico Ampicilina.

4.3. SELEÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *cry8Ha1* POR *Phage display*

Para a seleção da biblioteca combinatória das variantes geradas por DNA *shuffling* (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997) e apresentadas na superfície de fagos filamentosos, utilizou-se a técnica de *Phage display*, conforme procedimentos descritos por Barbas III *et al.* (2000). As variantes foram selecionadas por apresentarem afinidade pelas proteínas BBMs (*Brush border membrane vesicles*) extraídas da membrana dos intestinos do bicudo-do-algodoeiro e da lagarta-do-cartucho, conforme procedimento descrito por Keeton *et al.* (1998).

O fago helper VCSM13[®] (STRATAGENE) foi adicionado na cultura de bactérias *E. coli* XL1BLUE (STRATAGENE), anteriormente transformada com o fagomídeo pComb3XSS-*cry* (figura 9) contendo as variantes do gene *cry8Ha1*. As bactérias foram infectadas pelo seu *pilus* sexual com o DNA fita simples (ssDNA) do fago (figura 10-1). O ssDNA se liga ao pComb3XSS-*cry* e os novos fagos produzidos têm fusionado à sua proteína III, as proteínas variantes, passando a serem denominados de fagos de fusão (figura 10-2).

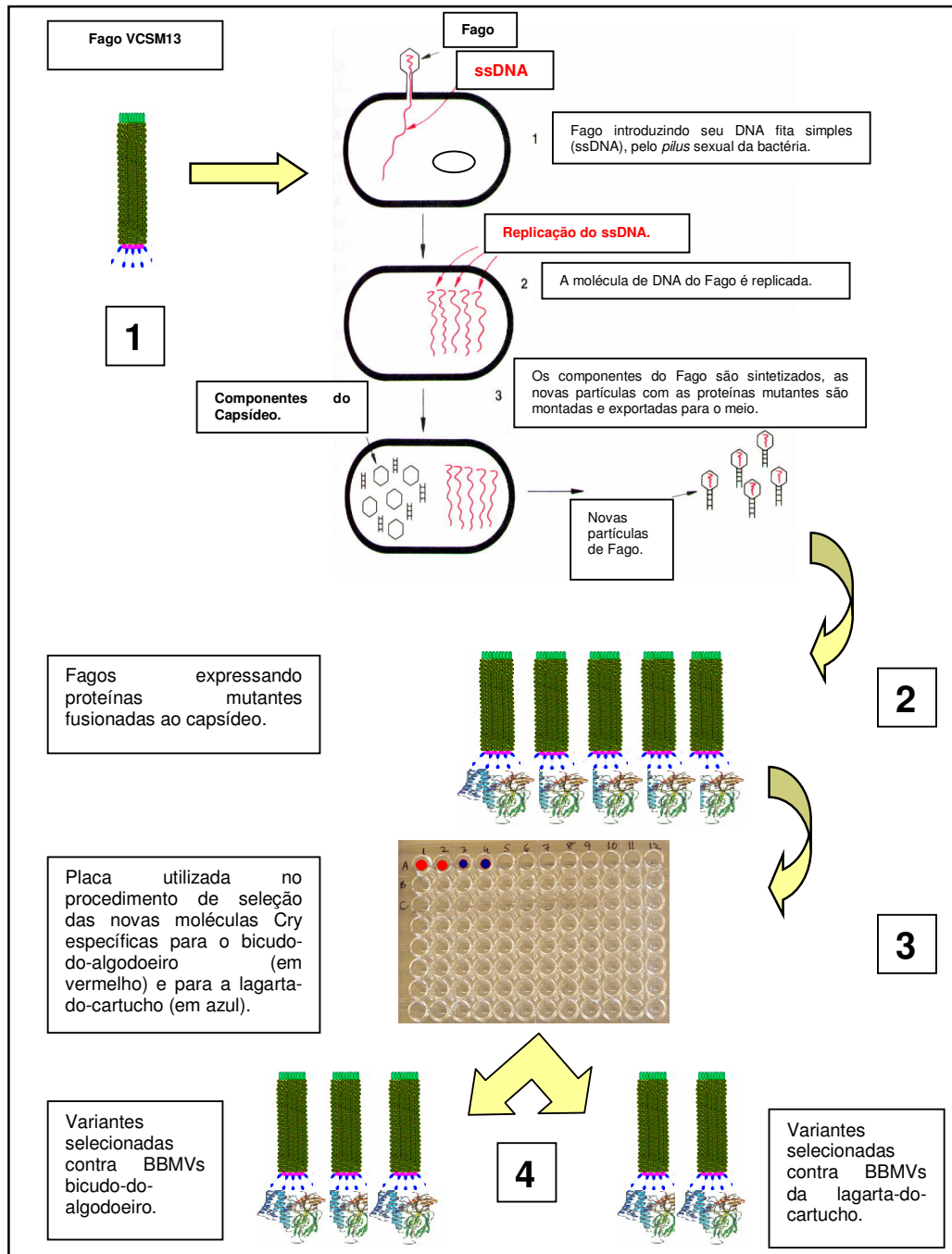


Figura 10. Representação esquemática da infecção de células de *E. coli* por fagos filamentosos e do ciclo de seleção. 1) Processo de replicação do fago. 2) Fagos de fusão expressando variantes fusionadas a proteína III do seu capsídeo. 3) Placa de microtitulação sensibilizada com BBMVs de *A. grandis* (em vermelho) e de *S. frugiperda* (em azul). Os fagos de fusão são incubados nos poços sensibilizados ocorrendo a ligação entre os fagos e as BBMVs. 4) Variantes selecionadas pela afinidade a BBMVs dos insetos alvo. Figura adaptada do site (<http://images.google.com.br/imgres?imgurl=>).

Para o início da seleção, dois poços de uma placa de microtitulação foram sensibilizados com 100µg/cada de BBMV's extraídas do bicudo do algodoeiro e dois poços com 100µg/cada de BBMV's extraídas da lagarta-do-cartucho, utilizados como ligantes em cada poço. Em seguida, os fagos de fusão foram incubados nos poços já sensibilizados. Após esta etapa, foram feitos ciclos de lavagens com a solução PBS-T (137mM de NaCl; 2,7mM de KCl; 12mM de Na₂HPO₄; e 1,2mM KH₂PO₄ – pH 7,4, autoclavado) contendo 0,05% de TWEEN 20® (Polyoxyethylinesorbitan Monolaurate, SIGMA) para a eliminação dos fagos não específicos ou com baixa especificidade (figura 10-3). Os fagos capazes de reconhecer o ligante foram recuperados por meio de eluição ácida, amplificados pela infecção de células de *E. coli* e utilizados em novos ciclos de seleção (figura 10-4).

A cada ciclo de seleção, formas da proteína exógena com maior afinidade ao ligante (BBMV's) foram obtidas. Para a avaliação da afinidade das variantes às BBMV's de *A. grandis* e *S. frugiperda*, uma alíquota dos fagos recuperados em cada ciclo foi armazenada a 4 °C e, posteriormente, a absorbância foi avaliada por espectrometria no comprimento de onda de 405nm, conforme descrito por Barbas III *et al.* (2000), objetivando identificar o ciclo de seleção com maior número de variantes específicas.

Após a determinação do ciclo de seleção com maior absorbância e maior número de variantes, colônias deste ciclo foram analisadas em PCR-1 (tabela I e II), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (1 e 2 - tabela III) e as colônias com o fragmento de DNA no tamanho esperado (aproximadamente 2011pb) foram selecionadas e individualmente expressas no sistema fago.

4.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SELVAGEM E DAS MUTANTES EM FAGO

As colônias selecionadas a partir do ciclo de seleção apresentando maior quantidade de fagos específicos foram utilizadas para inoculação e expressão no sistema fago HELPER VCSM13, realizado em meio de cultura Super Broth – SB (10g/L de Mops; 20g/L de Extrato de Levedura; 30g/L de Triptona - pH 7,0, autoclavar) contendo Ampicilina[®] USB (100µg/mL), Tetraciclina[®] USB (5µg/mL) e Canamicina[™] GIBCO (100µg/mL) como agentes seletivos, durante 18 horas a 37 °C sob agitação, de acordo com procedimentos descritos em Barbas III *et al.* (2000).

O meio de cultura contendo os fagos de fusão foi centrifugado a 4500G (centrífuga JOUAN BR4i, rotor 50.10A)/10 minutos/10 °C. Ao sobrenadante foi adicionado P.E.G. NaCl (1000mL de H₂O; 150g de NaCl; 200g de Polyetyleno Glycol 8000) e incubado no gelo durante 30 minutos. Após a incubação, o material foi centrifugado a 10000G (centrífuga JOUAN BR4i, rotor 50.10A)/20 minutos/10 °C. O precipitado foi ressuscitado em 200µL de TBS (5mM de Tris HCl; pH 7,5; 15mM de NaCl, autoclavado), centrifugado a 12000G (centrífuga EPPENDORF 5415 R, rotor F45-24-11) durante 5 minutos, a 10 °C. E finalmente, o sobrenadante contendo os fagos de fusão foi coletado, transferido para um novo tubo e armazenado a 4 °C, para ser utilizado posteriormente nos ensaios de imunodeteção e de atividade.

4.5. IMUNODETECÇÃO - DOT BLOT

Foram realizados DOT BLOTs com o anticorpo primário Anti-HA[®] Hemaglutinina (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) das variantes expressas em sistema fago.

Para a imunodeteção, 5µL da expressão de cada variante foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose HYBOND™ C EXTRA (AMERSHAM BIOSCIENCES). O bloqueio da membrana foi realizado com incubação em TBS contendo 3% de BSA – Albumina Bovina[®] (SIGMA) durante 2 horas, a temperatura ambiente (TA). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-HA solubilizado em PBS (1:2000) durante 2 horas, a TA. Foram realizadas três lavagens com 10mL de PBS-T antes da incubação com o anticorpo secundário, Anti-mouse IgG conjugado com Fosfatase alcalina (BIO RAD) solubilizado em PBS (1:3000). A membrana foi incubada durante 2 horas, a TA, seguida de três lavagens com 10mL de PBS-T.

Para a revelação da membrana, foi utilizado o Kit AP Conjugate Substrate[®] (BIO-RAD), segundo procedimento descrito pelo fabricante. A reação foi interrompida pela adição de água. Foram utilizados como controles positivo e negativo a proteína hemaglutinina (denominada H-07) e o fago Helper VC5M13, respectivamente, com os quais o sinal detectado das variantes foi comparado.

4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DOS MUTANTES DA PROTEÍNA Cry8Ha1

4.6.1. BIOENSAIOS CONTRA *A. grandis*

Para os bioensaios contra *A. grandis*, foram utilizadas larvas neonatas da colônia mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em condições descritas em Dias *et al.* (2002). Os bioensaios seletivos foram realizados em placas de cultura de células (NUNC™) contendo seis poços, preenchidos com dieta artificial (tabela VI), adicionados de fagos de fusão (fagos com a proteína heteróloga fusionada a proteína III do seu capsídeo) na concentração de 2,5µg por mL de dieta. Após a seleção da variante mais ativa, foram realizados bioensaios utilizando diferentes concentrações de proteína purificada, por mL de dieta.

Após a solidificação da dieta, foram feitos 12 furos por poço e uma larva foi inserida em cada poço. O bioensaio foi mantido a 27 °C (±1), 60% de umidade relativa (UR) e com período de 12 horas de luz. A contagem das larvas sobreviventes foi realizada após sete dias (DIAS *et al.*, 2002). Os bioensaios foram realizados em triplicata, sendo cada unidade experimental composta de 12 larvas e repetidos até sete vezes em datas diferentes. A comparação das médias entre tratamentos foi feita por análise de variância (Holm-Sidak One Way Repeated Measures Analysis of Variance - ANOVA) utilizando o programa SigmaStat, versão 3.0 (RICHMOND, 2004).

TABELA VI. Dieta artificial de *A. grandis*

Parte autoclavada (15 minutos a 120 °C):

Agar	9,044g
Levedo de cerveja	13,6g
Proteína de soja	22,44g
Germe de trigo	13,6g
Pharmamédia	9,044g
H ₂ O	500mL

Parte não autoclavada:

Ácido sórbico	0,544g
Ácido ascórbico	4,522g
Glicose	13,6g
Nipagin	0,442g
Sais Minerais	0,264g
Solução vitamínica	2,266g

Obs.: As duas partes da dieta foram misturadas e vertidas nos poços da placa. Os fagos de fusão foram acrescentados à dieta quando esta se encontrava a uma temperatura de 50 °C e homogeneizados.

4.6.2. BIOENSAIOS CONTRA *S. frugiperda*

Da mesma forma, para a realização dos bioensaios contra *S. frugiperda*, foram utilizadas larvas em primeiro estágio da colônia mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os bioensaios seletivos foram realizados em placas de cultura de células (NUNC™) contendo 24 poços, que foram preenchidos com dieta artificial (tabela VII) e fagos de fusão adicionados na superfície da dieta na concentração de 2,5µg por cm².

Após a solidificação, os fagos de fusão em TBS foram acrescentados à superfície da dieta, sendo posteriormente depositada uma larva por poço. O

bioensaio foi mantido a 27 °C (± 1), 70% de UR, com período de 12 horas de luz. A contagem das larvas sobreviventes foi realizada após sete dias completos. Os bioensaios foram realizados em triplicata, sendo cada unidade experimental composta de 12 larvas e repetidos três vezes em datas diferentes.

TABELA VII. Dieta artificial de *S. frugiperda*

Parte autoclavada (15 minutos a 120 °C):

Agar	4g
Levedo de cerveja	10,74g
Feijão	35,10g
Germe de trigo	16,85g
H ₂ O	500mL

Parte não autoclavada:

Ácido sórbico	0,41g
Ácido ascórbico	1,08g
Nipagin	0,67g
Formol 10%	2,65mL

Obs.: As duas partes da dieta foram misturadas e vertidas nos poços da placa. Os fagos de fusão foram acrescentados à superfície da dieta de forma homogênea.

4.7. SEQÜENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS

A seqüência nucleotídica das moléculas variantes que apresentaram atividade tóxica sobre os insetos-alvo foi determinada pelo seqüenciador automático 3130xL Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS), utilizando-se 400-800ng de DNA plasmidial, 4pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores específicos 3 e 4 para seqüenciar as extremidades das variantes e os iniciadores 5, 6, 7, e 8 para seqüenciar a porção intermediária das variantes (tabela III). Para cada oligonucleotídeo foi montada uma reação de sequenciamento e as seqüências resultantes analisadas pelos programas “BLASTn” e “BLASTp” disponível no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

A seqüência consenso foi obtida pela análise dos alinhamentos múltiplos das seqüências dos fragmentos gênicos, utilizando-se o programa “Staden Package”, disponível no endereço eletrônico (<http://staden.sourceforge.net/>). As seqüências também foram alinhadas pelo “CLUSTALW” (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) {Thompson, 1994 #17}.

Todos os oligonucleotídeos desenhados e utilizados neste trabalho foram previamente analisados pelo programa “OligoTech” disponível no endereço eletrônico (<http://www.oligotech.com/analysis.php>).

4.8. SUBCLONAGEM DA VARIANTE Cry/BI-25 E DO GENE *cry8Ha1* NO VETOR DE EXPRESSÃO EM SISTEMA HETERÓLOGO

A variante Cry/BI-25, que apresenta atividade melhorada contra o inseto-alvo *A. grandis*, e o gene original *cry8Ha1* foram subclonados no vetor pET101/D TOPO (INVITROGEN), sendo a construção utilizada para transformar bactérias e expressar proteínas em quantidade necessária para realização dos bioensaios e determinação da CL₅₀.

Para a adição do sítio de recombinação nos genes, foi realizada a PCR-1 (tabela I), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos 09 e 10 (tabela III), sendo a seqüência CACC inserida na região 5' em orientação "sense", segundo instruções do fabricante do sistema pET101 Directional TOPO. O oligonucleotídeo iniciador específico "antisense" não possui o códon de terminação, pois se encontra logo após a cauda de poli-histidina (figura 11), presente no vetor.

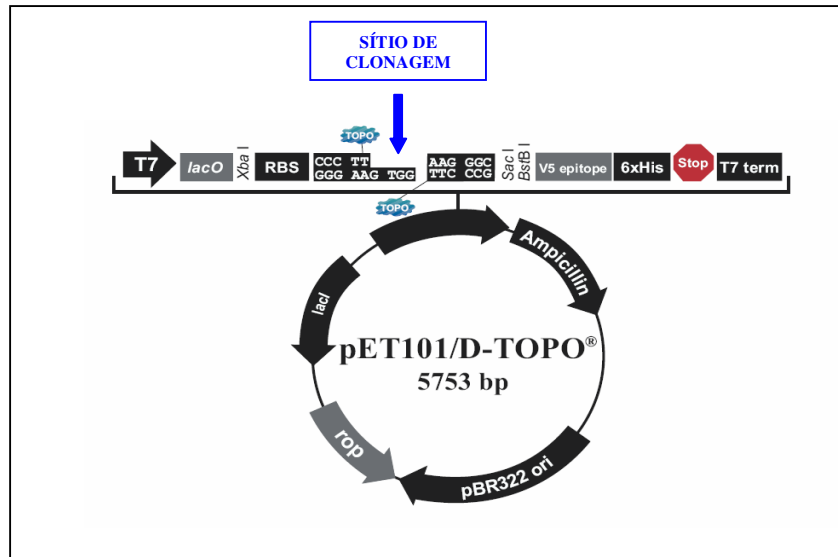


Figura 11: Mapa do vetor comercial pET101/D-TOPO para expressão heteróloga em *E. coli*. Representação esquemática do vetor, incluindo o promotor T7. Figura disponível no endereço eletrônico (http://eric-and-liz.com/vectors/pET/pet101dtopo_map.pdf).

Promotor T7: Induzido por IPTG permite a expressão em larga escala em algumas linhagens de *E. coli*.

Operon *lac* (*lacO*): Sítio de ligação do repressor *lac*, importante para a redução da expressão basal das proteínas recombinantes. Sua função pode ser regulada pela presença ou ausência de glicose no meio de cultura.

Sítio de clonagem TOPO: Região que compreende a localização exata de onde o inserto será clonado.

6His C-terminal: Importante para a purificação de proteínas utilizando-se resina de níquel acoplado. Também utilizado para a imunodeteção de proteínas recombinantes por western blot utilizando-se anticorpos Anti-His.

Terminador T7: Seqüência do bacteriófago T7, que permite a finalização da transcrição dos genes.

Gene de resistência a ampicilina (β -lactamase): Seleciona os plasmídeos resistentes em *E. coli*.

Origem de replicação pBR322 (*ori*): Elemento de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Neste sistema, o produto da PCR é diretamente clonado pela adição dos quatro pares de bases do oligonucleotídeo de orientação “sense”. A extremidade coesiva do vetor de clonagem (GTGG) interage com a extremidade 5’ do produto de PCR, anelando-se com as quatro bases adicionadas (CACC) e estabilizando o produto de PCR na orientação correta. A topoisomerase então cliva a porção sobressalente do produto de PCR para que a ligação seja efetiva (figura 12-B). Desta forma, a clonagem pode atingir 90% de eficiência. As condições da reação utilizada neste trabalho foram descritas na tabela V.

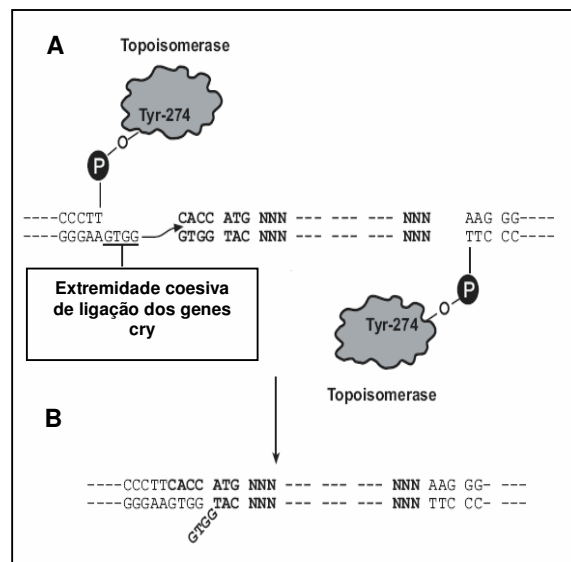


Figura 12: Esquema ilustrativo do sistema de ligação do produto de PCR no vetor de pEt101/D-TOPO. (A) A extremidade coesiva do vetor onde o produto de PCR foi clonado é demonstrada juntamente com a presença da enzima topoisomerase. B) O produto de PCR é diretamente clonado pela adição dos quatro pares de bases do oligonucleotídeo de orientação direta. A extremidade coesiva do vetor de clonagem (GTGG) invade a extremidade 5’ do produto de PCR, anelando-se com as quatro bases adicionadas (CACC) e estabilizando o produto de PCR na orientação correta. A topoisomerase então cliva o pedaço sobressalente do produto de PCR para que a ligação seja efetiva. Figura disponível no endereço eletrônico (http://bioinfo.wisc.edu/bxaf4/bm/bm_cg5.php).

O vetor de expressão pET101/D-TOPO foi adquirido na forma linearizada com uma extremidade abrupta e outra coesiva, complementar à extremidade do inserto amplificado (figura 12-A). Os vetores construídos foram denominados: cry8Ha1PET101, que possui o gene codificador da proteína original, e cry8BI25PET101, que possui o gene codificador para a toxina variante selecionada (figura 13). A reação de ligação inserto-vetor está descrita na tabela V.

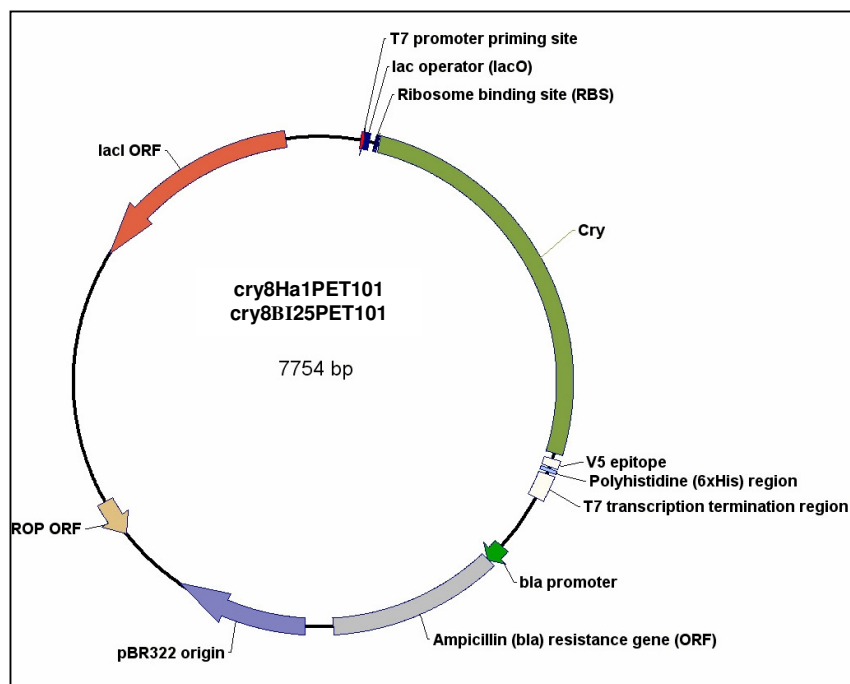


Figura 13. Mapa dos vetores cry8Ha1PET101 e cry8BI25PET101 utilizados para expressão heteróloga em *E. coli*, incluindo o gene *cry* (*cry8Ha1* ou a variante BI-25). O gene *cry* foi inserido pela enzima Topoisomerase no sítio de recombinação GTGG.

As construções cry8Ha1PET101 e cry8BI25PET101 foram utilizadas para transformar células de *E. coli* linhagem TOP10[®] (INVITROGEN), via choque térmico. Para a transformação 10ng das construções, foram adicionados em 40µL de células quimiocompetentes, seguido de incubação durante 30 minutos em gelo e 30 segundos a 42 °C. Logo após o choque térmico, foram adicionados 250µL de

meio SOC (2% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,05% NaCl; 2,5mM KCl; 20mM MgCl₂) e incubou-se a 37 °C durante 60 minutos, sob agitação. Após o período de incubação, as células foram inoculadas em 10mL de meio de cultura LB agar contendo 100µM de Ampicilina/mL e crescidas durante 16 horas, a 37 °C.

Para confirmar a presença do inserto, as colônias foram analisadas quanto ao tamanho do fragmento de DNA pela PCR-1 (tabela I e II), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos 09 e 10 (tabela III). Para isto, foi utilizado gel de agarose 1%, e eletroforese a 100 Volts durante 90 minutos. As colônias que apresentaram o fragmento de DNA no tamanho esperado (2005pb) foram inoculadas individualmente, em meio de cultura LB contendo 100µM de Ampicilina/mL e crescidas durante 16 horas, a 37 °C, sob agitação. Uma alíquota das células transformadas foi armazenada a -80 °C, conforme instruções do fabricante.

Após a confirmação da transformação, os plasmídeos cry8Ha1PET101 e cry8BI25PET101 foram utilizados para transformar células de *E. coli* linhagem BL21 DE3[®] (INVITROGEN), possibilitando alto nível de expressão.

4.9. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Cry EM *E. coli*

As construções cry8Ha1PET101 e cry8BI25PET101 foram utilizadas para expressão na célula BL21 DE3. Para se determinar as condições apresentando o maior rendimento da expressão, foi construída uma curva experimental de crescimento das células. O indutor (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside - IPTG 0,5, 1 e 2mM) foi adicionado à cultura de células, nas temperaturas 15 °, 28 ° e 37 °C. Alíquotas foram retiradas nos tempos de incubação 2, 4, 6, 18, 24 e 48 horas.

O precipitado, obtido a partir da centrifugação de 1mL do cultivo da expressão a 10000G (centrífuga JOUAN BR4i, rotor 50.10A) durante 10 minutos, foi ressuspenso com 20 μ L de tampão de amostra (240mM de Tris-HCl; pH 6,8; 0,8% de SDS; 200mM de β -mercaptoetanol; 40% de Glicerol e 0,02% de BFB - Bromophenol blue) e, após 10 minutos em fervura, 10 μ L das amostras foram aplicados em gel 12% SDS-PAGE (item 4.10). Para a visualização das proteínas, foi utilizado o corante Comassie Brilliant Blue 1% (p/v), durante 4 horas. Como controle da expressão foi utilizada uma alíquota retirada do cultivo antes do início da indução.

Uma vez determinada a condição de maior rendimento da expressão das proteínas em bactéria, as colônias com genes selecionados foram inoculadas em 10mL de meio de cultura contendo Ampicilina 100 μ g/mL e incubadas durante 18 horas, a 37 °C, sob agitação. Posteriormente, este inóculo foi adicionado a 1000mL de meio de cultura LB, contendo Ampicilina 100 μ g/mL e, após OD₆₀₀ atingir 0,8, a expressão foi induzida pela adição de 0,5mM de IPTG, durante 6 horas, a 37 °C, sob agitação. Este cultivo foi centrifugado a 10000G (centrífuga JUAN BR4i, rotor 50.10A) durante 10 minutos, sendo o precipitado de células

solubilizado em 25mL de tampão de lise (50mM de Tampão Fosfato pH 7,8; 300mM NaCl, 10% Glicerol, 0,5% Triton X-100 contendo 10mg/mL de Lisozima) e incubado a 4 °C, durante 16 horas. Após a incubação, as células foram lisadas por ultra-som (3 pulsos de 1 minuto/cada). O produto da lise das células foi centrifugado durante 15 minutos a 12500G (centrífuga JUAN BR4i, rotor 50.10A) e o sobrenadante coletado foi analisado em gel 12% SDS-PAGE.

4.10. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para a análise da expressão das proteínas, foi utilizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por {Laemmli, 1970 #65}.

As amostras da expressão e purificação da proteína foram quantificadas pelo método de Bradford, (1976). Dez microgramas de cada amostra (proteína total, lavada e eluída), foram solubilizadas em 15 μ L de tampão de amostra, aquecidas a 100 °C durante 10 minutos, e aplicadas em gel 12% SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada no sistema Mini Protean II[®] Electroforesis Cell (BIO-RAD), contendo 800mL de tampão de corrida 1X (0,19M Glicina; 0,025M Tris-Base; 0,1% SDS) aplicando-se uma corrente de 20mA, durante 90 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi corado em solução corante de Coomassie Brilliant Blue 1% (p/v) durante 4 horas, sendo as bandas visualizadas após a descoloração durante 2 horas em solução descorante contendo 40% de metanol e 12% de ácido acético glacial.

4.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para purificar as proteínas expressas em bactéria BL21 DE3, o produto da expressão (item 4.9) contendo as proteínas recombinantes foi submetido à cromatografia de afinidade, utilizando-se 5mL da resina Ni-NTA (Ácido Nitrilotriacético-Níquel – QUIAGEN).

Para equilibrar a resina Ni-NTA, foram utilizados 200mL de solução de equilíbrio (Tampão Fosfato 50mM; NaCl 300mM; Imidazol 10mM; pH 7,8). O produto da expressão foi incubado na coluna, usando-se cromatografia em “batch”, em fluxo de 1mL/minuto, durante 18 horas, a 4 °C, segundo orientações do fabricante.

Em seguida, foram adicionados à resina Ni-NTA 200mL de solução de lavagem (50mM de Tampão Fosfato; pH 7,8; 300mM de NaCl; 20mM de Imidazol) em fluxo de 1mL/minuto, para a retirada das proteínas inespecíficas. Após a lavagem da resina, a proteína recombinante foi eluída com a adição de 100mL de solução de eluição (50mM de Tampão Fosfato; pH 7,8; 300mM de NaCl; 250mM de Imidazol) em fluxo de 1mL/minuto.

A proteína eluída foi dialisada com o uso da membrana Spectrapor[®] Membrane Tubing (THOMAS SCIENTIFIC) com poros de exclusão de 6-8kDa, contra 60L de água destilada, durante 16 horas, a 4 °C. As proteínas foram quantificadas e analisadas em gel 12% SDS-PAGE. Posteriormente, o material purificado foi utilizado em bioensaios seletivos para determinação da atividade biológica.

4.12. IMUNODETECÇÃO - WESTERN BLOT

Foram realizados WESTERN BLOTS utilizando o anticorpo monoclonal Anti-HIS[®] Histidina (INVITROGEN) para a detecção das proteínas expressas em bactérias (item 4.9).

Para a imunodeteção, 5µg de proteínas de cada passo da expressão foram aplicados em gel 12% SDS-PAGE. Após a eletroforese (item 4.10), foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose HYBOND[™]-C EXTRA. Para tanto, foi utilizado o equipamento TRANS-BLOT[®] SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) e o tampão de transferência (192mM de Glicina; 25mM de Tris-Base; 20% de Metanol). A transferência ocorreu a 100mA, com duração de 30 minutos.

A membrana com as amostras de proteína foi bloqueada em PBS contendo 3% de BSA, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi rapidamente lavada com PBS-T e incubada com o anticorpo Anti-HIS conjugado com a Fosfatase alcalina (1:2000 em PBS) durante 2 horas, a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com 10mL de PBS-T e revelada com o uso do Kit “AP Conjugate Substrate[®]” (BIO RAD), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. A reação foi interrompida com a adição de água.

4.13. IMUNODETECÇÃO – ELISA

Para determinar a concentração das proteínas recombinantes utilizadas nos bioensaios foi empregada a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando o anticorpo policlonal anti-Cry8, produzido em coelho pelo nosso grupo.

Para a realização do ELISA, as proteínas foram previamente quantificadas pelo método de Bradford, (1976). Poços da placa de ELISA foram sensibilizados com diferentes concentrações de proteínas (4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015; 0,007; 0,0039 e 0,0019ng) e incubadas por 24hs a 4 °C. Para o bloqueio foi utilizado 3% de BSA diluído em TBS-T (TBS contendo 0,05% de TWEEN 20) por 4hs a temperatura ambiente (TA). Os poços da placa foram lavados três vezes após o bloqueio, com TBS-T e incubado com o anticorpo anti-Cry8 diluído 1:10000 com 1% de BSA em TBS-T por 4hs a 4 °C. Após o reconhecimento das proteínas Cry pelo anti-Cry8, lavou-se três vezes com TBS-T e incubou com o anti-IgG anti-rabbit conjugado a peroxidase, diluído 1:1000 em TBS-T contendo 1% de BSA, por 2hs a TA. Após três lavagens com TBS-T adicionou-se a solução reveladora, seguindo orientações do fabricante (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit[®], BIO RAD). A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ (1N). A leitura da reação substrato/peroxidase foi realizada em 450nm no leitor de ELISA Benchmark Plus[®], BIO RAD.

5. RESULTADOS

5.1. BIBLIOTECA COMBINATÓRIA DE VARIANTES DO GENE *cry8Ha1*

Os resultados obtidos com a aplicação da técnica de DNA *shuffling* utilizando o gene *cry8Ha1* estão apresentados na figura 14. A digestão do gene *cry8Ha1* com a enzima *DNaseI* gerou fragmentos de 30-50pb (figura 14, coluna 3). Estes fragmentos foram utilizados na primeira etapa de recombinação, gerando fragmentos de tamanhos variados, denominados “duplexes” (figura 14, coluna 4). Os “duplexes” foram utilizados nos experimentos de PCR, contendo oligonucleotídeos iniciadores específicos, resultando em uma população de variantes do gene *cry8Ha1*, representada por uma banda de aproximadamente 2000pb (figura 14, coluna 5). Este “pool” de fragmentos de DNA foi clonado no fagomídeo e utilizado na transformação de bactérias, obtendo-se uma biblioteca de 10^7 variantes.

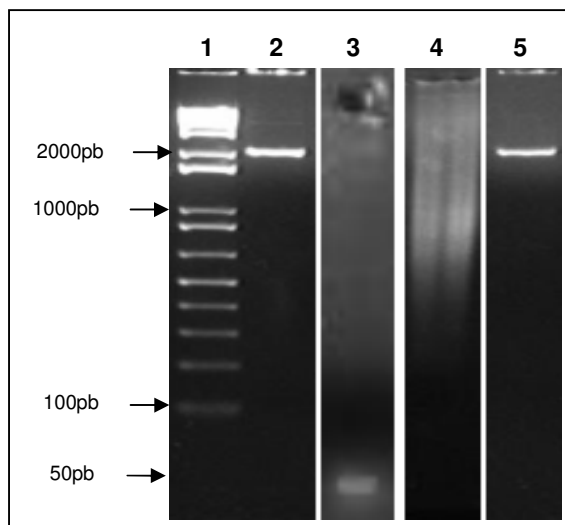


Figura 14. Etapas da técnica de DNA *shuffling* utilizando como substrato o gene *cry8Ha1* de 2-Kb. **1** - Marcador 1 Kb plus® (INVITROGEN). **2** - Gene selvagem amplificado com oligonucleotídeo iniciadores específicos 1 e 2 da tabela III para inserção do sítio de restrição *SfiI*. **3** - Fragmentos de 30-50pb obtidos por meio de digestão do gene *cry8Ha1* utilizando a enzima *DNaseI*. **4** - Produto da PCR sem oligonucleotídeos iniciadores. **5** - Produto da PCR contendo oligonucleotídeos iniciadores específicos, resultando em um “pool” de variantes.

5.2. SELEÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *cry8Ha1* POR *Phage display*

A biblioteca de genes recombinantes foi utilizada para selecionar variantes específicas para os insetos *A. grandis* e *S. frugiperda* pela técnica de *Phage display*. De acordo com Barbas III *et al.* (2000), de três a seis ciclos de seleção são suficientes para enriquecimento de fagos específicos. Para a seleção de genes variantes, codificadores de toxinas Cry, foram realizados seis ciclos de seleção (R-1 ao R-6) com 5, 10, 15, 20, 25 e 25 números de lavagens, respectivamente (figuras 15 e 16). As etapas de lavagens possibilitam um aumento na estringência da seleção, permitindo eliminar os fagos que não se ligaram e os que se ligaram fracamente, fazendo com que a cada ciclo haja um aumento na população de fagos específicos, até que seja observada a saturação do sistema.

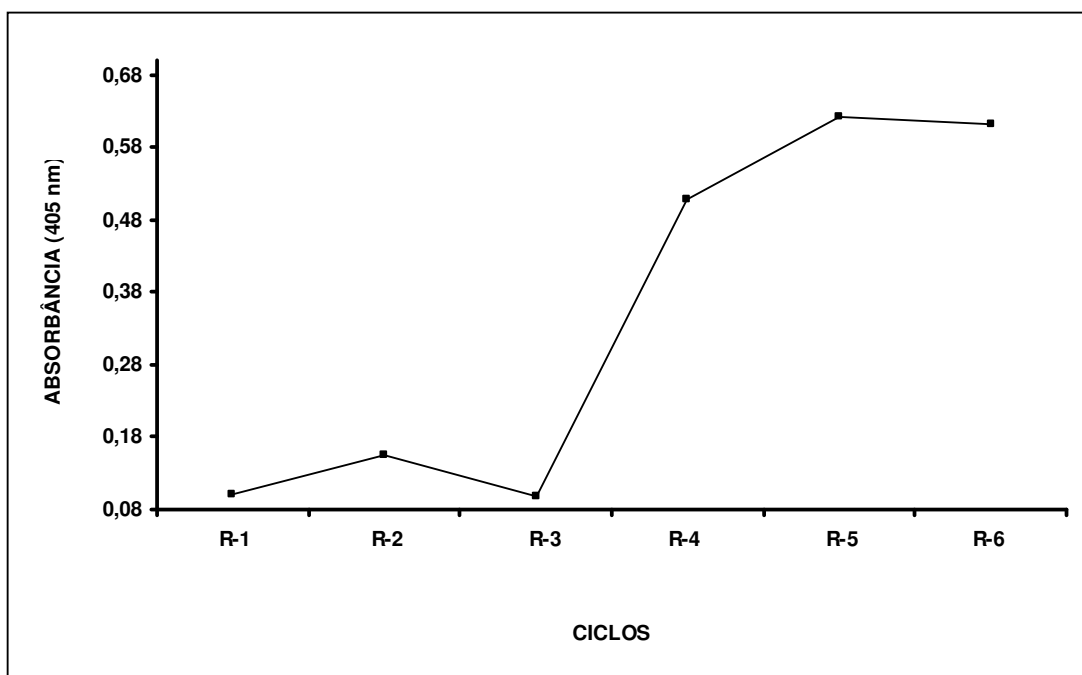


Figura 15. Interação entre BBMV de *A. grandis* e fagos de fusão. Para a leitura da absorvância foi utilizado o comprimento de onda de 405nm. **R-1 a R-6** - Ciclos de seleção e o número de lavagens por ciclo. A maior absorvância, ou seja, maior número de fagos de fusão com especificidade a BBMV do inseto *A. grandis*, ocorreu a partir do 5º ciclo da seleção.

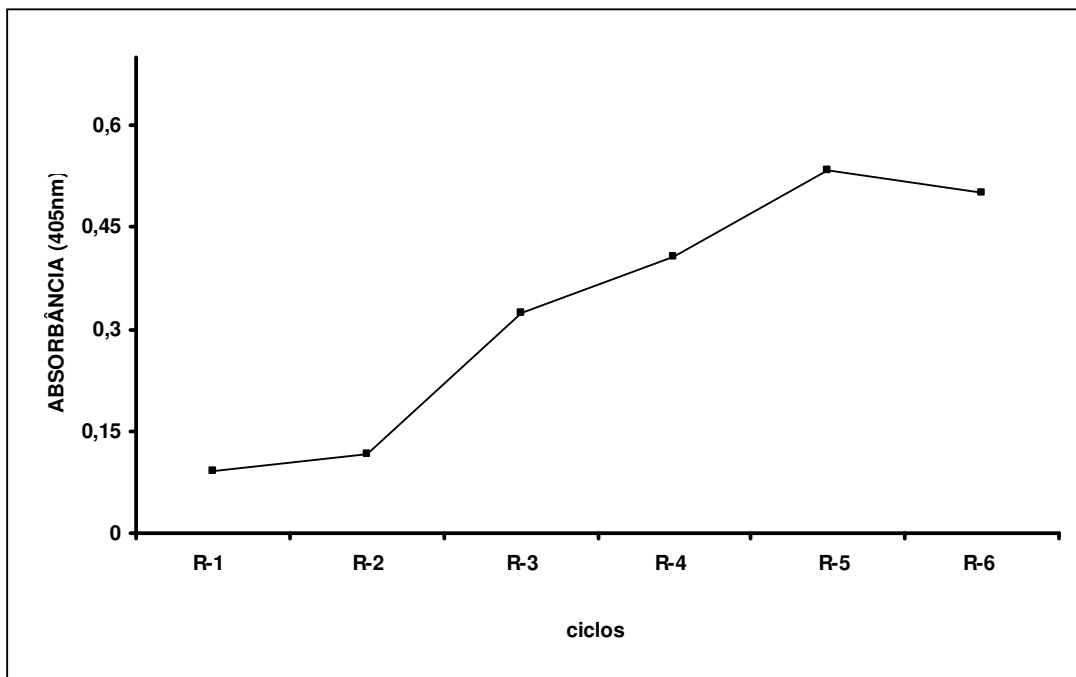


Figura 16. Interação entre BBMV's de *S. frugiperda* e fagos de fusão. Para a leitura da absorvância foi utilizado o comprimento de onda de 405nm. **R-1** a **R-6** - Ciclos de seleção. A maior absorvância, ou seja, maior número de fagos de fusão com especificidade a BBMV's do inseto *S. frugiperda*, ocorreu a partir do 5º ciclo da seleção.

O resultado da análise por espectrofotometria mostrou enriquecimento de fagos específicos no quinto ciclo da seleção, o qual apresentou maior número de variantes com afinidade às BBMV's dos insetos-alvo.

Variantes deste ciclo foram utilizadas em PCR, a fim de se determinar a integridade do gene. Após análise, foram selecionadas 100 variantes específicas para *A. grandis* e 100 variantes específicas para *S. frugiperda*, com o DNA amplificado de aproximadamente 2000pb (figura 17). As variantes selecionadas pela afinidade às BBMV's do bicudo-do-algodoeiro e da lagarta-do-cartucho foram nomeadas BI e SI, respectivamente.

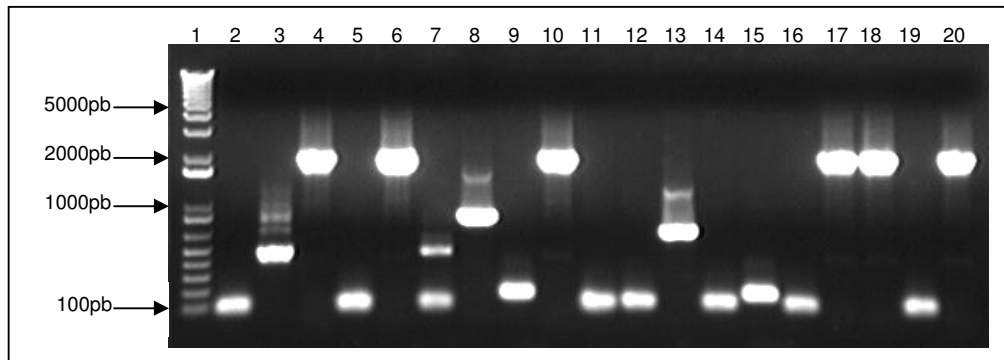


Figura 17. PCR de colônia de variantes BI utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Foto de gel de agarose 1% exibindo DNA amplificado no tamanho esperado de aproximadamente 2000pb. Neste gel cinco colônias, além do controle positivo, apresentaram o tamanho esperado (4, 6, 10, 17 e 18). **1** - Marcador 1 Kb plus® (INVITROGEN). **2 a 18** – Variantes do gene *cry8Ha1*. **19** - Controle negativo (PCR sem DNA). **20** - Controle positivo, gene *cry8Ha1* com oligonucleotídeos iniciadores específicos.

As 200 variantes selecionadas por PCR foram analisadas em ensaios de imunodeteção do tipo DOT BLOT, que consiste na aplicação direta do produto de expressão sobre a membrana, permitindo a análise simultânea de um grande número de variantes.

5.3. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CRY EM FAGO HELPER VCSM13 E IMUNODETECÇÃO (DOT BLOT)

A análise da expressão em sistema fago das 200 variantes, seleccionadas no quinto ciclo de seleção, foi feita por imunodeteccção. As 30 variantes do grupo BI e 30 do grupo SI que apresentaram um sinal de expressão mais forte, detectado no ensaio de DOT BLOT, foram seleccionadas. O sinal detectado em cada variante foi comparado com o sinal dos controles positivo (proteína hemaglutinina) e negativo (fago HELPER) (figuras 18 e 19).

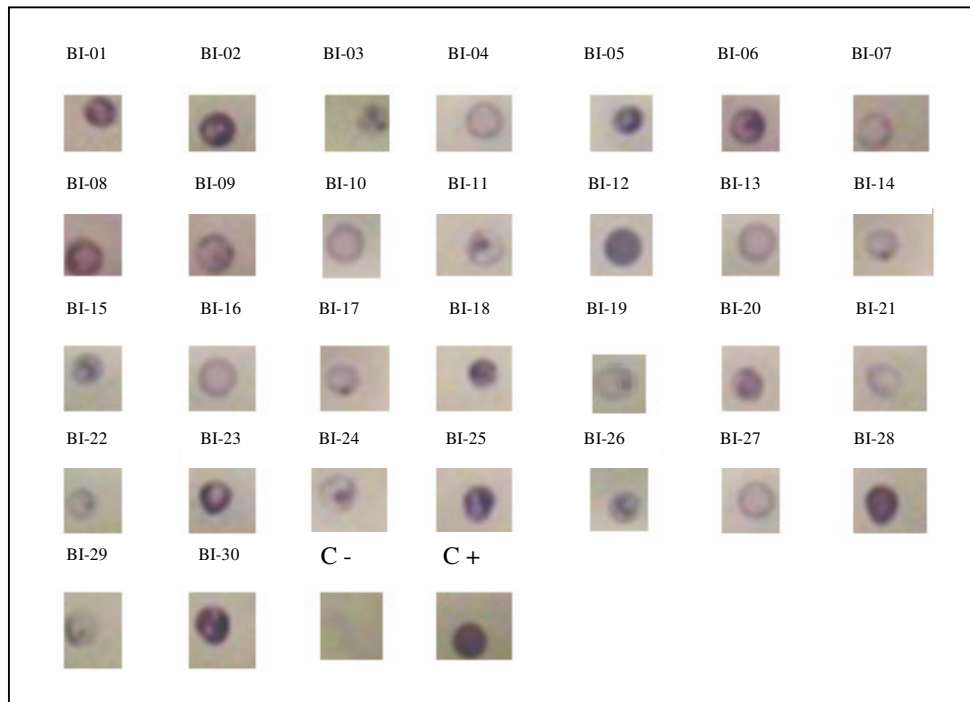


Figura 18. Dot Blot de variantes seleccionadas contra *A. grandis*, detectadas pelo anticorpo primário Anti-HA[®] Hemaglutinina. **BI-01** a **BI-30** - Variantes específicas para *A. grandis*. **C-** Controle negativo, fago HELPER. **C+** Controle positivo, proteína H-07.

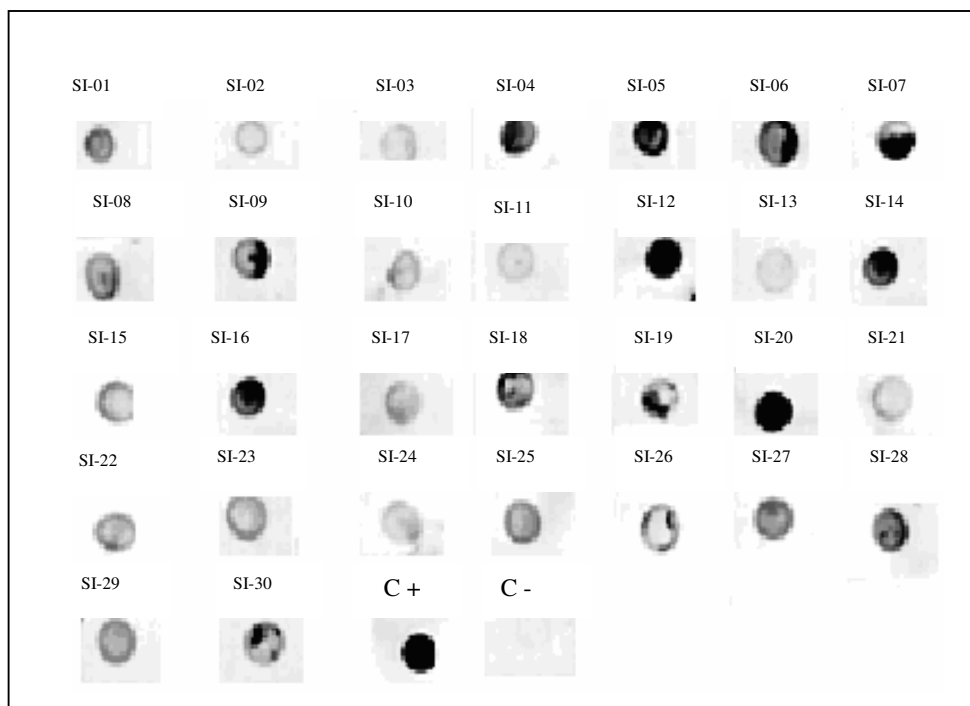


Figura 19. Dot Blot de variantes selecionadas contra *S. frugiperda*, detectadas pelo anticorpo primário Anti-HA[®] Hemaglutinina. **SI-01** a **SI-30** - Variantes específicas para *S. frugiperda*. **C-** Controle negativo, fago HELPER. **C+** Controle positivo, proteína H-07.

As 60 variantes que apresentavam um forte sinal detectado no DOT BLOT foram utilizadas em bioensaios com o intuito de se determinar a atividade entomotóxica sobre os insetos *A. grandis* e *S. frugiperda*.

5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DAS VARIANTES EXPRESSAS EM SISTEMA FAGO

Para a determinação da atividade tóxica das 30 variantes (BI) da toxina Cry8 selecionadas pela afinidade a BBMV's de *A. grandis* e expressas em sistema fago, foram realizados bioensaios contra larvas neonatas do inseto alvo. A proteína expressa foi quantificada por ELISA e adicionada ao bioensaio na concentração de 4µg/mL de dieta. De acordo com os resultados apresentados na tabela VIII, nove variantes apresentaram maior atividade inseticida quando comparada com a proteína original (Cry8).

Os resultados mostraram que nove variantes (BI-05, BI-08, BI-11, BI-16, BI-18, BI-20, BI-25, BI-26 e BI-28) exibiram níveis de atividade entomotóxica aumentada, quando comparadas com a proteína original, Cry8. A molécula Cry/BI-25 foi selecionada por mostrar boa atividade entomotóxica contra lavas de *A. grandis*. Embora os dados do bioensaio utilizando larvas de *A. grandis* tenham exibido diferenças na atividade entomotóxica das variantes, as análises estatísticas mostraram diferenças significativas apenas dos mutantes Cry/BI-25 e Cry/BI-26 em relação aos controles (tabela IX).

TABELA VIII - Atividade de variantes da toxina Cry8 contra *A. grandis*. Bioensaio realizado com fagos de fusão. **Cont. Neg.** - Controle negativo utilizando fagos HELPER. **Cry8** - Proteína original expressa no sistema fago. **Dieta** – Dieta artificial sem adição de proteínas heterólogas. **BI-01 a BI-30** - Variantes da toxina Cry8 expressas no sistema fago. O sinal (-) indica ausência de toxicidade (até 10% de mortalidade); (-+) baixa toxicidade (de 10 a 30% de mortalidade); (+) moderada toxicidade (de 30 a 50% de mortalidade) e (++) alta toxicidade (acima de 50% de mortalidade).

TRATAMENTOS	ATIVIDADE
CONT. NEG.	-
Cry8	- +
DIETA	-
BI-01	-
BI-02	-
BI-03	-
BI-04	-
BI-05	+
BI-06	- +
BI-07	- +
BI-08	+
BI-09	- +
BI-10	-
BI-11	+
BI-12	- +
BI-13	-
BI-14	-
BI-15	- +
BI-16	++
BI-17	-
BI-18	++
BI-19	-
BI-20	+
BI-21	-
BI-22	-
BI-23	- +
BI-24	-
BI-25	++
BI-26	++
BI-27	- +
BI-28	+
BI-29	-
BI-30	- +

TABELA IX - Atividade das toxinas Cry8 original e das variantes contra larvas neonatas de *A. grandis*. O tratamento “Fago Helper” foi utilizado como controle negativo. As mesmas letras, após o desvio padrão, indicam que não há diferença estatística entre as médias. **N** - Representa o número de ensaios, com 36 indivíduos por ensaio. **SEM** - Representa o erro padrão médio. (P - Probabilidade do resultado ter sido ao acaso = 0,006; G.L. - Grau de Liberdade = 8).

Tratamento	N	Mortalidade / Média ± Desv. Pad.	SEM
BI-25	4	50,00 ± 11,54 a	5,77
BI-26	5	49,33 ± 6,30 a	2,81
BI-18	5	45,99 ± 17,50 ab	7,82
BI-11	6	44,44 ± 19,16 ab	7,82
BI-16	5	36,66 ± 5,77 ab	2,58
BI-05	6	33,88 ± 11,95 ab	4,88
BI-08	6	32,77 ± 15,22 ab	6,21
Cry8 Original	5	29,33 ± 5,47 ab	2,44
Fago Helper	6	20,55 ± 2,50 b	1,02

Da mesma forma, 30 variantes específicas contra *S. frugiperda*, expressas no sistema fago, foram utilizadas em bioensaios para determinar atividade das mesmas sobre larvas de primeiro instar de *S. frugiperda*. Foram identificadas 15 novas moléculas, SI-03, SI-04, SI-06, SI-07, SI-08, SI-09, SI-11, SI-13, SI-14, SI-15, SI-16, SI-17, SI-21, SI-24 e SI-26 com atividade sobre *S. frugiperda* (tabela X).

TABELA X - Atividade das toxinas Cry8 original e das variantes contra larvas de *S. frugiperda*. Bioensaio realizado com fagos de fusão. **Cont. Neg.** - Controle negativo utilizando fagos HELPER. **Cry8** - Proteína original expressa no sistema fago. **Dieta** - Dieta artificial sem adição de proteínas heterólogas. **SI-01 a SI-30** - Variantes da toxina Cry8 expressas no sistema fago. O sinal (-) indica ausência de toxicidade (até 10% de mortalidade); (-+) baixa toxicidade (de 10 a 30% de mortalidade) e (+) moderada toxicidade (de 30 a 50% de mortalidade).

TRATAMENTOS	ATIVIDADE
CONT. NEG.	-
DIETA	-
Cry8	-
SI-01	-
SI-02	-
SI-03	+
SI-04	+
SI-05	-
SI-06	+
SI-07	+
SI-08	+
SI-09	+
SI-10	-
SI-11	- +
SI-12	-
SI-13	- +
SI-14	+
SI-15	- +
SI-16	+
SI-17	+
SI-18	-
SI-19	-
SI-20	-
SI-21	- +
SI-22	-
SI-23	-
SI-24	- +
SI-25	-
SI-26	- +
SI-27	-
SI-28	-
SI-29	-
SI-30	-

O número de bioensaios utilizando larvas *S. frugiperda* não foi suficiente para uma análise estatística dos resultados mostrados na tabela X. As variantes (SI) selecionadas contra *S. frugiperda* estão sendo utilizadas em novos bioensaios, a fim de se determinar a molécula mais ativa sobre o inseto-alvo.

5.5. SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS

As variantes do grupo BI (selecionadas contra BBNVs de *A. grandis*), utilizadas nos bioensaios, foram analisadas e mostraram várias mutações nas suas seqüências nucleotídicas (figura 20).

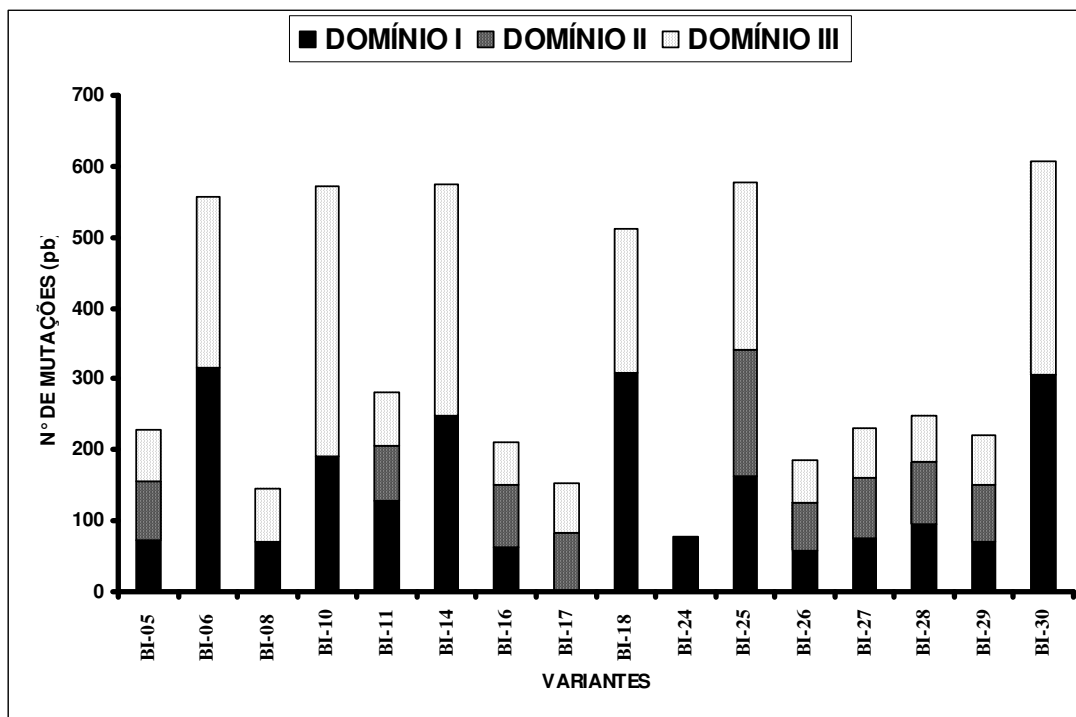


Figura 20. Gráfico exibindo número de modificações nucleotídicas nos domínios I, II e III de variantes do gene *cry8Ha1* gerados por DNA *shuffling* e selecionadas contra *A. grandis* pela técnica de *Phage display*. Em preto, mutações no Domínio I. Em rachurado, mutações no Domínio II. E em branco pontilhado mutações no domínio III. O mutante Cry/BI-25 apresentou 578 mutações nucleotídicas.

A variante Cry/BI-25, que se mostrou mais ativa contra o inseto *A. grandis*, teve um elevado número de mutações em “loops” dos domínios I, II e III da molécula, e a deleção de 16 resíduos de aminoácidos gerando uma proteína menor que a molécula original (Cry8).

5.6. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS Cry EM BACTÉRIA E PURIFICAÇÃO

As proteínas Cry8 e a Cry/BI-25 foram expressas em bactéria *E. coli*. As proteínas foram purificadas, quantificadas e posteriormente analisada em gel SDS-PAGE 12% (figura 21 - A). Da purificação do produto da expressão, foram obtidas proteínas de aproximadamente 70kDa (figura 21, colunas 4 e 5), as quais posteriormente foram detectadas por WESTERN BLOT (figura 21 - B).

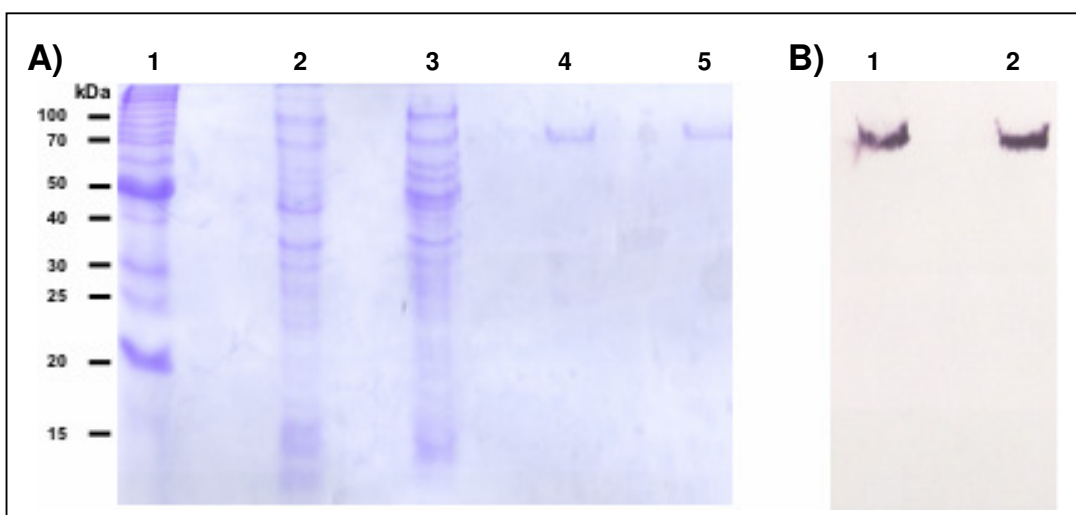


Figura 21 - A) Gel SDS-PAGE 12%. Expressão e purificação das proteínas Cry, original (Cry8) e mutante Cry/BI-25. 1 - Marcador BenchMark™ Protein Ladder (INVITROGEN). 2 - Proteínas de células não induzidas. 3 - Proteína total de célula induzida a 0,5mM de IPTG. 4 - Proteína Cry/BI-25 purificada. 5 - Proteína Cry8 purificada. B) Western Blot usando o anticorpo monoclonal Anti-HIS® (INVITROGEN) AP conjugado. 1 - 5µg da proteína Cry/BI-25 purificada. 2 - 5µg da proteína Cry8 purificada e utilizada como controle positivo.

As proteínas recombinantes (Cry8 original e Cry/BI-25) expressas em *E. coli* e purificadas foram utilizadas em bioensaios contra larvas neonatas de *A. grandis*, a fim de se determinar a LC₅₀.

5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENTOMOTÓXICA DA PROTEÍNA MUTANTE Cry/BI-25 SOBRE LARVAS DE *A. grandis*

Os resultados dos ensaios de atividade, utilizando-se proteína purificada mostraram expressivo aumento na mortalidade de larvas neonatas de *A. grandis*, pela proteína mutante Cry/BI-25 em relação à proteína Cry8. A mortalidade de 46,66% foi obtida com a concentração de 3µg/mL de dieta, utilizando-se a proteína Cry/BI-25 (tabela XI) e de 10µg/mL de dieta, com a proteína Cry8. Os resultados indicaram aumento de 3.15 vezes da atividade entomotóxica da proteína mutante (Cry/BI-25) em relação à proteína original (Cry8Ha1).

TABELA XI - Bioensaio com as proteínas Cry8 e Cry/BI-25 purificadas contra larvas neonatas de *A. grandis*. Foram utilizadas diferentes concentrações das proteínas purificadas a fim de se determinar a concentração letal ao inseto-alvo.

TRATAMENTO Cry8 (Dieta + µg/mL Cry8)	TAXA DE MORTALIDADE (%)	TRATAMENTO Cry/BI-25 (Dieta + µg/mL Cry/BI-25)	TAXA DE MORTALIDADE (%)
0	13	0	13
0,75	15	0,75	30
1,5	16	1,5	33
3	35	3	46
6	39	6	77
9	45	9	81
12	61	12	88

Conforme apresentado na figura 22, observou-se a relação direta entre o aumento da concentração da proteína Cry/BI-25 e o aumento da mortalidade das larvas de *A. grandis*. A LC_{50} foi calculada em $2,83\mu\text{g/mL}$ da proteína Cry/BI-25 e $8,93\mu\text{g/mL}$ da proteína Cry8.

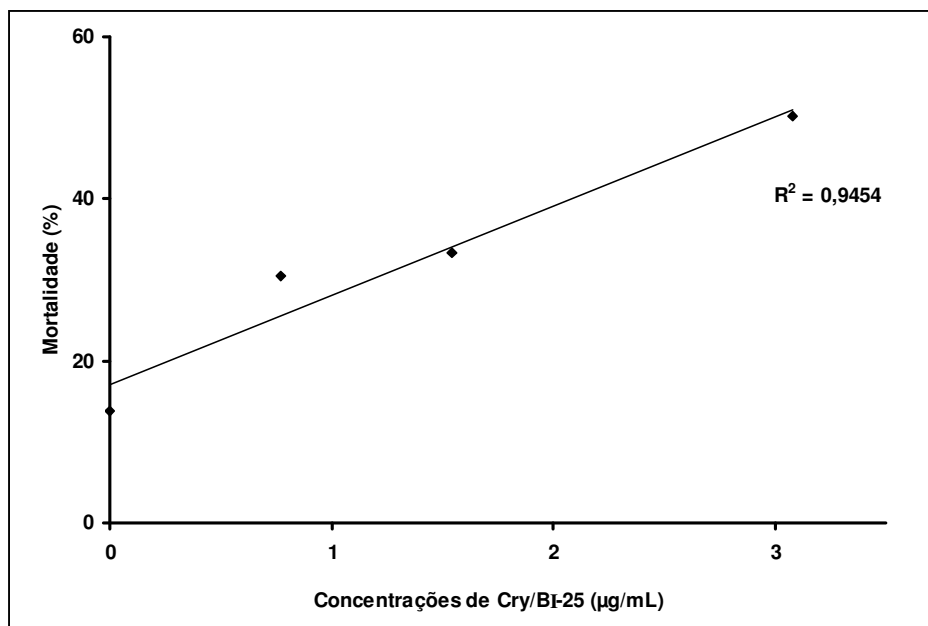


Figura 22: Relação entre concentração da proteína Cry/BI-25 por mL de dieta de *A. grandis* e mortalidade em porcentagem. R^2 representa a dispersão dos pontos em relação à linha de regressão, quanto mais próximo de 1 mais confiável.

DISCUSSÃO

A biotecnologia de plantas tem se tornado uma importante fonte de inovações, fornecendo novas soluções para problemas, como os originados por insetos-praga causadores das maiores perdas de culturas comercialmente importantes (ESTRUCH *et al.*, 1996 b; KNIGHT *et al.*, 2004; ROMEIS *et al.*, 2006). Para o controle das populações de insetos, utilizam-se defensivos agrícolas, com princípios ativos químicos. Este sistema traz conseqüências colaterais negativas em termos de toxicidade ao homem, animais e ao meio-ambiente (ESTRUCH *et al.*, 1996 b; CASTALDINI *et al.*, 2005). Neste contexto, o uso do controle biológico no manejo de pragas surgiu como alternativa para minimizar os efeitos negativos da aplicação de inseticidas químicos sintéticos, preservando o ambiente natural e os ganhos do produto.

Estratégias de evolução molecular dirigida, bem como suas aplicações, apresentam um aumento significativo na pesquisa acadêmica e industrial, principalmente para a geração de novas moléculas, com características potenciais desejadas, incluindo o aumento da atividade alvo-específica (YUAN *et al.*, 2005; SHU *et al.*, 2007). No trabalho de Shu *et al.* (2007), o gene que codifica a proteína Cry8Ca foi utilizado como substrato para a geração de novas moléculas geradas por PCR tendente ao erro. Os resultados mostraram atividade aumentada entre quatro a cinco vezes para as larvas de *Anomala corpulenta*, quando comparada com a proteína original. Em outro trabalho, quitinases produzidas pela técnica de DNA *shuffling* tiveram aumento de atividade de 36 a 56% em relação a proteína original (FAN *et al.*, 2007). Lassner & Bedbrook (2001) relataram o êxito da aplicação da técnica de DNA *shuffling* na geração de novos genes conferindo

resistência a insetos como os codificadores para as proteínas Cry. O uso de DNA *shuffling* com o gene *cry* originou variantes do gene *cry1Ca*, cujas toxinas mutantes mostraram atividade aumentada de quatro a oito vezes em relação à proteína original sobre larvas de *Spodoptera exigua* (STEMMER *et al.*, 2002). Knight *et al.* (2004) geraram, pela técnica de DNA *shuffling*, variantes da proteína Cry1Ba com atividade melhorada para larvas de *Lucilia cuprina*. Este aumento da atividade de proteínas inseticidas contra larvas de insetos ocorreu pela geração de mutações na seqüência de resíduos de aminoácidos destas proteínas, obtidas por técnicas de evolução molecular *in vitro*.

Segundo Stemmer (2002), bibliotecas de variantes geradas por DNA *shuffling*, a partir de uma única seqüência gênica, geralmente, apresentam apenas mutações pontuais, enquanto que bibliotecas com variantes que apresentam mais de três mutações de aminoácidos podem apresentar altos níveis de clones inativados. No presente trabalho, a evolução molecular dirigida de um novo gene *cry8*, utilizando a técnica de DNA *shuffling* (STEMMER, 1994; ZHAO & ARNOLD, 1997), gerou uma biblioteca de variantes potencialmente mais ativas para uso na seleção de toxinas para o bicudo-do-algodoeiro. A fragmentação do gene em segmentos de até 50pb foi importante para garantir a recombinação homóloga entre os fragmentos gerados, assim como a ocorrência de mutações pontuais (STEMMER, 1994).

As análises das seqüências de variantes BI (novas moléculas selecionadas contra *A. grandis*) mostraram um alto número de modificações nucleotídicas (100 a 600pb), correspondendo de 5 a 40% de bases modificadas. Das seqüências analisadas, dezesseis variantes mostraram apenas mutações pontuais. A variante

Cry/BI-25 apresentou, além das mutações pontuais, a deleção de 16 resíduos de aminoácidos na região 5'. Esta região da toxina, domínio I, está diretamente relacionada à formação do poro na membrana de células intestinais do inseto-alvo. Esta variante apresentou atividade melhorada em 3.15 vezes contra larvas de *A. grandis*, quando comparada à proteína original (Cry8). As modificações apresentadas pela nova molécula estão sendo analisadas em estudos de estrutura. Porém, para a determinação completa dos resíduos de aminoácidos responsáveis pelo aumento da atividade entomotóxica, experimentos adicionais são necessários.

Encontra-se em andamento no laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a confecção de bibliotecas de cDNA dos intestinos dos insetos-alvo. Essas bibliotecas serão utilizadas para a identificação de receptores da toxina mutante Cry/BI-25 selecionada. A caracterização destes receptores é de fundamental importância para a determinação dos sítios de interação Cry/BI-25 /receptor e elucidação de resíduos envolvidos com o aumento da toxicidade.

Em acréscimo, enfatiza-se que o sucesso obtido neste trabalho pela aplicação da técnica de DNA *shuffling* pode ser justificado pelo delicado arranjo entre o tamanho da biblioteca, a diversidade biológica originada e um processo de seleção das variantes com a característica desejada, como discutido previamente em Roberts & Szostak, 1997 e Yuan *et al.*, 2005. Embora técnicas de evolução molecular dirigida para a seleção de proteínas com características desejadas estejam sendo amplamente adotadas, existem poucos relatos sobre proteínas Cry melhoradas pela aplicação da técnica de DNA *shuffling* (STEMMER *et al.*, 2002;

KNIGHT *et al.*, 2004), o que demonstra a relevância deste trabalho como modelo para a obtenção de moléculas com atividade melhorada.

Vários trabalhos vêm utilizando a técnica de *Phage display* (BARBAS III *et al.*, 1992) como ferramenta de evolução dirigida de enzimas (FRENANDEZ-GACIO, 2003) e de proteínas (ISHIKAWA *et al.*, 2007), como apresentadora de bibliotecas de anticorpos (BARBAS III *et al.*, 1992; SHEEDY *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007), e sistema de expressão de peptídeos e proteínas (KAY & HOESS, 1996; VÍLCHEZ *et al.*, 2004), possibilitando a apresentação funcional destas moléculas e suas variantes (STOOP *et al.*, 2000).

Pacheco *et al.* (2006), relataram em seus estudos que a toxina Cry1Aa não foi devidamente apresentada por fagos M13, resultando em deleções da proteína fusionada. Em contraste, a toxina Cry1Ac apresentada pelo fago M13 conservou a toxicidade contra larvas de *Manduca sexta*, mas testes *in vitro* mostraram que a toxina não se ligava funcionalmente a receptores, sugerindo modificações estruturais da toxina apresentada. Estes fatos foram atribuídos a problemas intrínsecos do sistema de apresentação M13, em apresentar proteínas de grande peso molecular. Neste trabalho, especificamente, a utilização do sistema de apresentação em fago M13 foi motivada pelo sucesso obtido previamente na seleção de outras proteínas inseticidas, como variantes de inibidores de α -amilase com 750pb (SILVA *et al.*, 2005; 2007), que também mostraram atividade nova sobre *A. grandis*. A estrutura-função da molécula Cry/BI-25 apresentada na superfície de fago M13 foi confirmada após a expressão em sistema de bactéria e sua utilização em bioensaios.

A estratégia adotada no presente trabalho foi eficiente para atingir o objetivo proposto, que foi gerar e selecionar, de maneira rápida, toxinas variantes com atividade melhorada. Da biblioteca combinatorial do gene *cry8Ha1*, dois grupos (BI e SI) de variantes foram selecionados com 10^5 novas moléculas no quinto ciclo de seleção. A seleção estendida até o sexto ciclo foi importante para a identificação do ciclo contendo enriquecimento de fagos específicos, apresentando moléculas afins às proteínas BBMVs dos insetos-alvo. O resultado da seleção coincide com o modelo proposto no processo de maturação da afinidade (AZZAZY & EDWARD HIGHSMITH, 2002; BRIGIDO & MARANHÃO, 2002), no qual o maior número de variantes com maior especificidade foi obtido nos últimos ciclos de seleção. De acordo com Ishikawa *et al.* (2007), aumentando-se a afinidade do domínio responsável pela ligação ao receptor, a atividade da toxina pode ser também aumentada, justificando a importância do processo de maturação da afinidade.

Conclui-se dos resultados obtidos neste estudo que a aplicação combinada das técnicas de DNA *shuffling* e *Phage display*, para a geração de moléculas novas mais efetivas no controle de insetos-alvo, constitui uma excelente estratégia biotecnológica. A variante Cry/BI-25 apresentou alta atividade entomotóxica sobre larvas de *A. grandis*, quando comparada à proteína Cr8Ha1. Esta nova toxina já está sendo utilizada em programas de melhoramento para a geração de eventos de algodão GM, visando maior toxicidade ao inseto-praga *A. grandis*, visto que, até o momento, o controle biológico não foi determinante para impedir, com eficiência, o desenvolvimento do inseto. O aumento na atividade desta nova molécula foi de fundamental importância, já que possibilita a utilização

em doses menores da toxina identificada para uso no controle do bicudo-do-
algodoeiro. Este fator é ainda mais valorizado ao se considerar o baixo nível de
expressão de proteínas heterólogas, geralmente obtido em plantas geneticamente
modificadas, o que representa, algumas vezes, um gargalo na obtenção de
variedades resistentes a insetos-praga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÉCASSIS, V.; POMPON, D. & TRUAN, G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and *in vivo* DNA recombination in yeast: statistical analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research*, 28 (20): 88, 2000.

ABRAPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO, (http://www.abrapa.com.br/multissitios_abrapa/), acessado em dezembro de 2007.

ALMEIDA, R. P. & SILVA, C. A. D. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: Beltrão, N.E. de M. (ed.) O Agronegócio do Algodão no Brasil. Comunicação para Transferência de Tecnologia Embrapa, Brasília, 2: 753-820, 1999.

ANDOW, D. A.; LÖVEI, G. L. & ARPAIA, S. Ecological risk assessment for *Bt* crops. *Nature Biotechnology*, 24 (7): 749-751, 2006.

ANDREWS, K. L. The Whorlworm, *Spodoptera frugiperda*, in Central America and neighboring areas. *Florida Entomologist*, 63: 456-467, 1980.

ANDRIS-WIDHOPF, J.; RADER, C.; STEINBERGER, P.; FULLER, R. & BARBAS III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *Journal of Immunological Methods*, 242: 159-181, 2000.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECA, L. & BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of INVertebrate Pathology*, 68: 203–212, 1996.

ARONSON, A. Sporulation and δ -endotoxins synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 417-425, 2002.

ASHLEY, T. R.; WISEMAN, B. R.; DAVIS, F. M. & ANDREWS, K. L. The fall armyworm: a bibliography. *Florida Entomologist*. 72: 152-202, 1989.

AZZAZY, H. M. E. & EDWARD HIGHSMITH, W. Jra. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*. 35: 425–445, 2002.

BARBAS III, C. F.; BAIN, J. D.; HOEKSTRA, D. M. & LERNER, R. A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 89: 4457–4461, 1992.

BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K. & SILVERMAN, G. J. PHAGE DISPLAY A LABORATORY MANUAL, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1: 10.1-10.20, 2000.

BELTRÃO, N. E. M. Algodão brasileiro em relação ao mundo: situação e perspectivas. In: BELTRÃO, N. E. M. (Org). *O Agronegócio do Algodão*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1: 17-27, 1999.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J. & LI, J. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *J. Mol. Biol.*, 348: 363–382, 2005.

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

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

BRAVO, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Family proteins and Their Functional Domains. *Journal of Bacteriology*, 179 (9): 2793-2801, 1997.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M. & QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol*, 64 (12): 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GÓMEZ, I. & SOBERÓN, M. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1562 (1): 63–69, 2002.

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

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

BRIGIDO, M. M. & MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 26: 44-51, 2002.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; ZOTTI, M. J. & BANDEIRA, J. M. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações dos biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40: 329-335, 2005.

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N. & GIOVANNETTI, M. Impact of Bt Corn on Rhizospheric and Soil Eubacterial Communities and on Beneficial Mycorrhizal Symbiosis in Experimental Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 6719–6729, 2005.

CHILCOTT, C. N. & WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 244-247, 1993.

CHRISTIANS, F.C.; SCAPOZZA, L.; CRAMERI, A.; FOLKERS, G. & STEMMER, W.P.C. Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family Shuffling. *Nature Biotechnology*, 17: 259–264, 1999.

CHOPRA, S. & RANGANATHAN, A. Protein Evolution by “Codon Shuffling”: A Novel Method for Generating Highly Variant Mutant Libraries by Assembly of Hexamer DNA Duplexes. *Chemistry & Biology*, 10: 917–926, 2003.

CRAMERI, A.; DAWES, G.; RODRIGUEZ, E.; JR. SILVER, S. & STEMMER, W. P. Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA Shuffling. *Nature Biotechnology*, 15: 436-438, 1997.

CRAMERI, A.; RAILLARD, S. A.; BERMUDEZ, E. & STEMMER, W. P. DNA Shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 391: p288-291, 1998.

CRICKMORE, N. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 616–619, 2006.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C. & MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Circular Técnica, 30, Embrapa-CNPMS, Sete Lagoas, MG: 40p, 1999.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Holanda: *Kluwer Academic Publishers*, 23-40, 2000.

DEQUECH, S. T. B.; DA SILVA, R. F. P. & FIUZA, L. M. Interaction between *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Bacillus thuringiensis aizawai*, in Laboratory. *Neotropical Entomology*, 34 (6): 937-944, 2005.

DIAS, S. C. ; Monnerat, R. G.; Nobre, S. D. N.; Oliveira-Neto, O. B.; Schmidt, F. G. V.; Lauman, R. & Grossi de Sá, M. F. Edison Ryoiti Sujii. Parâmetros Bionômicos do Bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 29, ISSN 1676–1340, Novembro, 2002.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A. & KOZIEL M. G. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of National Academy of Science, USA*. 93: 5389-5394, 1996 a.

ESTRUCH, J. J *et al.* Vip Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*. 15: 137-141, 1996 b.

FAN, Y.; FANG, W.; XIAO, Y.; YANG, X.; AHANG, Y.; MIDOCHKA, M. J. & PEI, Y. Directed evolution for increased chitinase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 135-139, 2007.

FARINAS, E. T.; BULTER, T. & ARNOLD, F. H. Directed enzyme evolution. *Corr. Opin. Biotechnol.* 12: 545-551, 2001.

FERNANDEZ-GACIO, A.; UGUEN M. & Fastrez, J. *Phage Display* as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends in Biotechnology*, 21 (9): 408-414, 2003.

FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M. H.; GILL, S. G.; BRAVO, A. & SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop-8 of domain II. *Febs Letters*, 579: 3508–3514, 2005.

FERNÁNDEZ, L. E.; GÓMEZ, I.; PACHECO, S.; ARENAS, I.; GILLA, S. S.; BRAVO, A. & SOBERÓN, M. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides*, 29: 324 – 329, 2008.

FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MAGALHÃES, C. P.; MONTEIRO, A. C. S.; BLOCH JR, C.; MELO, F. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MONNERAT, R. G. & GROSSI de SÁ, M. F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry*, 65: 81–89, 2004.

FREIRE, E. C. *et al.* Cultura do algodoeiro no estado do Mato Grosso. *Circular Técnica* 23, EMBRAPA-CNPA, Campina Grande, PB: p. 65, 1997.

FRISVOLD, G. B.; TRONSTAD, R. & REEVES, J. M. International Impacts of Bt Cotton Adoption. In: EVENSON, R. E. & SANTANIELLO, V. (Eds.), *International Trade and Policies for Genetically Modified Products*. Publishing, Wallingsford, Oxfordshire, 191–200, 2006.

FRISVOLD, G. B. & REEVES, J. M. The costs and benefits of refuge requirements: The case of Bt cotton. *Ecological Economics*, 65: 87-97, 2008.

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

GALLO, D. (*in memoriam*) et al. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, SP: FEALQ: p. 920, 2002.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A. & SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix K-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Febs Letters*, 513: 242-246, 2002.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J. L.; BROUSSEAU, R. & CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254: 447-464, 1995.

GROSSI de SÁ, M. F.; MAGALHÃES, M. Q.; SILVA, M. S.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y.; BRUNETTA, P. S.; OLIVEIRA, G. R.; NETO, O. B.; OLIVEIRA, R. S.; SOARES, L. H.; AYUB, M. A.; SIQUEIRA, H. A. & FIGUEIRA, E. L. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 30 (40): 773-82, 2007.

HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*, Piracicaba, FEALQ: 383-446, 1998.

HANES, J. & PLUCKTHUN, A. In vitro selection of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 4937-4942, 1997.

HAYNES, J. W. & SMITH, J. W. Longevity of Laboratory-Reared Boll-Weevils (Coleoptera, Curculionidae) Offered Honey Bee-Collected Pollen and Plants Unrelated to Cotton. *Journal of Entomological Science*, 27 (4): 366-374, 1992.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 53, (2): 242-255, 1989.

HU, X.; HANSEN, B. M.; YUAN, Z.; JOHANSEN, J. E.; EILENBERG, J.; HENDRIKSEN, N. B.; SMIDT, L. & JENSEN, G.B. Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid pBtoxis in *Bacillus cereus* group strains. *Fems Microbiology Letters*, 245: 239-247, 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível no endereço eletrônico (www.ibge.gov.br), acessado em 2007.

ICAC - International Cotton Advisory Committee. Cotton: Review of the world situation. *International Cotton Advisory Committee*, 60 (2), 2006.

ISHIKAWA, H.; HOSHINO, Y.; MOTOKI, Y.; KAWAHARA, T.; KITAJIMA, M.; KITAMI, M.; WATANABE, A.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; HONDA, A.; KATSURO YAOI, K. & SATO, R. A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biotechnol.*, 36: 90-101, 2007.

JAGER, S. A. W.; JEKEL, P. A. & JANSSEN, D. B. Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β -lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1335-1344, 2007.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. *Isaaa-International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*. Brief 32, 2004.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. *Isaaa-International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*. Brief 35, 2006.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. *Isaaa-International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*. Brief 37, 2007.

KASMAN, L. M.; LUKOWIAK, A. A.; GARCZYNSKI, S. F.; MCNALL, R. J.; YOUNGMAN, P. & MICHAEL J. ADANG, M. J. Phage Display of a Biologically Active *Bacillus thuringiensis* Toxin. *Applied And Environmental Microbiology*, 64 (8): 2995–3003, 1998.

KAY, B.K. & HOESS, R.H. Principles and applications of phage display. *In*: B.K. KAY, J. WINTER & J. MCCAFFERTY (eds.) *Phage Display of peptides and proteins*. *Academic Press.*, p. 21-34, 1996.

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

KENAN, D. J.; TSAI, D. E. & KEENE, J. D. Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 57-63, 1994.

KNIGHT, J. S.; BROADWELL, A. H.; GRANT, W. N. & SHOEMAKER, C. B. A strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains. *J. Econ. Entomol.*, 97: 1805-1813, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685, 1970.

LASSNER, M. & BEDBROOK, J. Directed molecular evolution in plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:152–156, 2001.

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

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

LÜTHY, P. & WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Holanda: *Kluwer Academic Publishers*, p. 167-180, 2000.

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

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

MAKOWSKI, L. Structural constraints of the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, 128: 5-11, 1993.

MARTIN, P.A.W. & TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10): 2437-2442, 1989.

MARZARI, R.; EDOMI, P.; BHATNAGAR, R. K.; AHMAD, S.; SELVAPANDIYAN, A. & BRADBURY, A. Phage display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *FEBS Letters*, 411: 27-31, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. *Indicadores da Agropecuária*. Ano X, No. 4, abril, 2001.

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO ORÇAMENTO E GESTÃO. Estatística da produção agrícola. *Indicadores do IBGE*, No. 1, janeiro, 2007.

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

OSTERMEIER, M.; SHIM, J. H. & BENKOVIC, S. J. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology*, 17: 1205-1209, 1999.

PACHECO, S.; PACHECO, S.; I.; GÓMEZ, I.; SATO, R.; BRAVO, A. & SOBERÓN, M. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 45-49, 2006.

- PANIZZI, A. R. Efeito de inseticidas na população das principais pragas da soja. *An. Soc. Entomol., Brasil*, 6: 264-275, 1977.
- PATNAIK, R.; LOUIE, S.; GAVRILOVIC, V.; PERRY, K.; STEMMER, W.P.C.; RYAN, C.M. & CARDAYRÉ, S. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improve acid tolerance. *Nature Biotechnology*, 20: 707-712, 2002.
- PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, J.; FOLCH, J. L.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. & BRAVO, A. *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Israelensis* Cyt1Aa Synergizes Cry11Aa Toxin By Functioning As A Membrane-Bound Receptor. *PNAS*, 102 (51): 18303-18308, 2005.
- PERLAK, F. J.; DEATON, R. W., ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J. T. & FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. *Nature Biotechnology*, 8 (10): 939-943, 1990.
- PIGOTT, C. R. & ELLAR, D. J. Role Of Receptors In *Bacillus Thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 (2): 255-281, 2007.
- POSNER, B.; SMILEY, J.; LEE, I. & BENKOVIC, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 145-150, 1994.
- POWELL, K. A.; RAMER, S. W.; DEL CARDAYRE, S .B.; STMMER, W. P.; TOBIN, M. B.; LONGCHANP, P. F. & HURSMAN, G. W. Directed evolution and biocatalysis. *Angrew. Chem. Int., Ed. Engl.*, 40: 3948-3959, 2001.
- QAIM, M. & ZILBERMAN, D. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, 299:900–902, 2003.
- RAMALHO, F. S. Utilização do controle biológico como estratégia para o MIP algodão. *In: ANAIS CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO*. Goiânia, 2003.
- REGIS, L.; SILVA, S. B. & MELO-SANTOS, M. A. V. The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programmes in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95 (1): 207-210, 2000.
- RICHETTI, A. & MELLO-FILHO, G.A. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. *In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE; EMBRAPA ALGODÃO*. Algodão: Tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 13-34, 2001.
- RICHMOND, C. A. SigmaStat . Version 3.0. Systat Software Inc., 2004.
- ROBERTS, R. W. & J. W. SZOSTAK. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302, 1997.

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

ROSIC, N. N.; HUANG, W.; JOHNSTON, W. A.; JAMES J.; DEVOSS, J. J. & GILLAM, E. M. J. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling. *Gene*, 395 (1-2): 40-48, 2007.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE; EMBRAPA ALGODÃO. Algodão: Tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 181-226, 2001.

SAYYED, A. H.; CRICKMORE, N. & WRIGHT, D. J. Cyt 1A from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry 1Ac towards a resistant strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5859-5861, 2001.

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

SCHWARTZ, J. L. & LAPRADE, R. Membrane permeabilization by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A. & NIELSEN-LEROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Holanda: *Kluwer Academic Publishers*, p. 199-217, 2000.

SCOTT, J. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 241-245, 1993.

SHEEDY, C.; MACKENZIE, C. R. & CHRISTOPHER HALL, J. Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology Advances*, 25: 333-352, 2007.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z. & ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Reviews of Entomology*, 47: 645-881, 2002.

SHU, C.; LIU, R.; WANG, R.; ZHANG, J.; FENG, S.; HUANG, D. & SONG, F. Improving toxicity of *Bacillus Thuringiensis* strain contains the *cry8Ca* gene specific to *Anomala corpulenta* larvae. *Curr. Microbiol*, 55 (6):492-496, 2007.

SILVA, C. D. A. Efeito da formulação e aplicação de *Beauveria bassiana* no controle do bicudo do algodoeiro. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, 5: 433-437, 2001.

SILVA, M. C. M.; FIGUEIRA, E. L. Z. & GROSSI de SÁ, M. F. A metodologia de DNA *Shuffling* na produção de diversidade gênica. *Circular Técnica Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, 108: 102-110, 2003.

SILVA, M. C. M.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R.; RAMOS, H. B.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SARTO, R. P.; FIGUEIRA, E. L. Z.; PAES, N. S.; COUTINHO, M. V. & GROSSI de SA, M. F. Evolução molecular *in vitro*: seleção de moléculas inseticidas para insetos-praga do algodoeiro. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 99*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: 22 p., 2005.

SILVA, M. C. M.; TEIXEIRA, F. R.; SARTO, R. P. DEL; CRUZ, C. M.; AGASIE, I. C. B.; MARANHÃO, A. Q.; VENTURA, M. C.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MAGALHÃES, J. C. C.; ROCHA, T. L. & GROSSI de SÁ, M. F. Biblioteca combinatória de genes para inibidores de α -amilases: seleção de novos genes com potencial aplicações no controle de insetos-praga de armazenamento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Boletim de Pesquisa, 185, 2007. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp185.pdf>)

SILVIE, P. & LEROY, T. *Manual de Identificação das Pragas e Seus Danos no Algodoeiro*, COODETEC, Cascavel, 100p, 2001.

SOARES, J. J. & VIEIRA, R. M. *Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira. *Comunicado Técnico 96*, EMBRAPA-CNPA. Campina Grande, 5p, 1998.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. E. & BRAVO, A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science*, 318 (5856): 1640-1642, 2007.

STEMMER, W. P. C. Rapid evolution of a protein *in vitro* By DNA *shuffling*. *Nature*, London, 370 (6488): 389-391, 1994.

STEMMER, W. P. C. Molecular breeding of genes, pathways and genomes by DNA *shuffling*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19 (20): 3-12, 2002.

STEMMER, W. P. C.; CASTLE, L. A. & YAMAMOTO, T. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. *US Patent Issued, December, 2002*.

STOOP, A. A.; JESPERS, L.; LASTERS, I.; ELDERING, E. & PANNEKOEK, H. High-density Mutagenesis by Combined DNA *shuffling* and *Phage display* to Assign Essential Amino Acid Residues in Protein-Protein Interactions: Application to Study Structure-Function of Plasminogen Activation Inhibitor 1 (PAI-I). *J. Mol. Biol.*, 301:1135-1147, 2000.

TAO, H. & CORNISH, V. W. Milestones in directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 858-864, 2002.

- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (22): 4673-4680, 1994.
- URIBE, D.; MARTINEZ, W. & CERÓN, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 119-127, 2003.
- VALICENTE, F. H. & BARRETO, M; R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 32 (4): 639-644, 2003.
- VÍLCHEZ, S.; JACOBY, J. & ELLAR, D. J. Display of Biologically Functional Insecticidal Toxin on the Surface of λ Phage. *Applied And Environmental Microbiology*, 70 (11): 6587–6594, 2004.
- VON TERSCH, M. A.; SLATIN, S. L.; KULESZA, C. A. & ENGLISH, L. H. Membrane-permeabilizing of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (10): 3711-3717, 1994.
- WRIGHT, J. E. & CHANDLER, L. D. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against the boll weevil (Curculionidae: Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 58 (3): 448-449, 1991.
- YAMAMOTO, T. & DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. *In*: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. *Kluwer Academic Publishers*, Holanda, p. 80-100, 2000.
- YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. & ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip 3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2): 532-536, 1997.
- YUAN, L.; KUREK, I.; ENGLISH, J. & KEENAN, R. Laboratory-Directed Protein Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (3): 373–392, 2005.
- ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; ROSE-YOUNG, L. & BULLA JR., L. A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death. Differ.* Vol. 12: p. 1407–1416, 2005.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAISSING, R. & BULLA, L. A. JR. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 103: 9897-9902, 2006.

ZHANG, Q.; BAI, G.; CHENG, J.; YU, Y.; TIAN, W. & YANG, W. Use of an Enhanced Green Fluorescence Protein Linked to a Single Chain Fragment Variable Antibody to Localize *Bursaphelenchus xylophilus* cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 71 (6): 1514-1520, 2007.

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

ZHAO, H. & ARNOLD, F. H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, Vol. 94: p. 7997-8000, 1997.

ZHAO, H.; GIVER, L.; SHAO, Z.; AFFHOLTER, J. A. & ARNOLD, F. H. Molecular evolution by staggered extension process (STEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology*, 16: 258-261, 1998.

ANEXO I (CURRICULUM VITAE)

ANEXO II (PRÊMIOS)

ANEXO III (ARTIGOS PUBLICADOS)