

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Aplicação de estratégias moleculares visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) (Lepidoptera: *Castiniidae*)

Fernando Campos de Assis Fonseca

Brasília

2013

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Aplicação de estratégias moleculares visando o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Drury 1770) (Lepidoptera: *Castiniidae*)

Fernando Campos de Assis Fonseca

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de doutor em Biologia Molecular.

Brasília

2013

Banca Examinadora

Dr^a. Helaine Carrer

Departamento de Ciências Biológicas

Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz – Esalq

Dr^a. Maria Cristina Mattar da Silva

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr^a. Marlene Teixeira De-Souza

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

Dr^a. Vera Tavares de Campos Carneiro (membro interno)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Alexandre Augusto Pereira Firmino (suplente)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília

2013

Dedico este trabalho a minha família, em especial, minha mãe Vanessa M. Brasil e meu pai Sérgio Barroso de Assis Fonseca (*in memoriam*) a quem devo toda a gratidão pela minha formação pessoal e profissional.

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe Vanessa por todo o amor, confiança e incentivos para vencer mais esta etapa.

Agradeço a meu pai Sérgio por acreditar na minha capacidade e pelas palavras de apoio. Apesar da saudade tenho certeza que acompanha de perto todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Isabel e Leonardo por tudo o que passamos juntos.

À minha namorada Mariana por todo o carinho e suporte nos momentos mais doces e também nos mais difíceis.

Um grande agradecimento ao Leonardo Macedo, pela amizade e por toda a ajuda prestada com os trabalhos com os insetos, sem a qual este estudo não seria alcançado.

Ao Alexandre Firmino, Roberta Coelho e Dijair Jr., por todas as trocas de idéias e experiências que nos permitiram viver um momento único de aprendizado.

Ao Felipe Redorat, uma pessoa que me acompanhou em praticamente todos os trabalhos e a quem devo toda a gratidão pela ajuda, companheirismo e amizade.

Ao Dr. Wagner Lucena, por me apresentar o mundo da dinâmica molecular e pelas discussões sobre as análises dos dados.

Ao Dr. Hugo Molinari por se disponibilizar gentilmente para me ensinar as técnicas de transformação de cana-de-açúcar.

À Bárbara Dias, pela amizade e ajuda com a cultura de tecidos.

Ao Sr. Luiz Avelar Brandão de Góis, responsável pela captura dos insetos no campo, coleta dos ovos e envio para a Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia.

À Lecir Nascimento, Angélica Bússolo, Sineide Rangel e Sheiska Silva, pessoas que realizaram um trabalho especial e que propiciaram a todos o melhor ambiente de trabalho.

A todos do laboratório de interação molecular planta praga I: Isabela Lourenço, Janaína de Paula, Itamara Mezzalira, André Júlio, Vívian Miranda, Uriele Almeida, Antônio Américo, Rodrigo Fragoso, Aulus Barbosa, Flávia Mulinari, Eduardo Mulinari, Magda Beneventi, Carlos Pessoa (Cadu), Angelina Basso, Tiago Siqueira, Osmundo Neto, Cristina Mattar, Thiago Golçalves, Anne Winnie, Luís Prestes, Bruna Araújo, Rafael Del Sarto, Ariane

Lacerda, Stephan Dohms, Philippe Lins, Naíra Schwarzstein, Diogo Sá, Hudson Ramos, Gustavo Oliveira, Thales Rocha, Érico Vasconcelos, Caroline Bezerra, Vanessa Olinto, Raquel Sampaio e Jorge Arboleda.

Ao pessoal da vibe 4, Erick Nakasu, Mariana Lira, Larissa Tancredi e Natália Lamas, pelos momentos divertidos e sempre bem vindos.

À Dra. Fátima Grossi, pela oportunidade e orientação. Graças ao período que passei no laboratório me tornei uma pessoa com uma visão melhor sobre a ciência e com isso cresci profissionalmente e pessoalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo fornecimento de toda a estrutura e pelos recursos disponibilizados.

À Universidade de Brasília, literalmente minha casa, onde vivi toda a minha vida e pude conhecer o mundo acadêmico. Nunca esquecerei toda a história compartilhada e terei sempre um carinho especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular por todo o conhecimento transmitido também à Ana Hilda Tibet, por toda a atenção e ajuda.

Sumário

Lista de Figuras	5
Lista de Tabelas	8
Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução Geral	13
1.1 Cana-de-açúcar: Características gerais e agronegócio.....	13
1.2 Insetos-praga da cultura canavieira e alternativas de controle.....	16
1.3 Broca-gigante da cana-de-açúcar.....	18
2. Justificativa	22
3. Hipótese	23
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo geral	23
4.2 Objetivos específicos	23
Capítulo I – Obtenção e análise do transcrito da broca-gigante da cana-de-açúcar (<i>Telchin licus</i> <i>licus</i>)	24
1. Introdução	25
1.1 Sequenciamento de DNA.....	25
1.2 Sequenciamento de segunda geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)	27
1.3 Pirosequenciamento	28
1.4 Tratamento dos dados obtidos por pirosequenciamento	31
1.5 Transcritoma de insetos	32
1.6 Potenciais alvos para o controle de insetos-praga.....	34
1.6.1 Aminopeptidases N.....	34
2. Material e Métodos	36
2.1 Obtenção dos insetos e extração de RNA	36
2.2 Obtenção da biblioteca de cDNA e pirosequenciamento	37
2.3 Pré-processamento das sequências	37
2.4 Montagem, anotação e ontologia gênica (GO)	38
2.5 Comparação da biblioteca de <i>Telchin licus licus</i> contra sequências de <i>Manduca sexta</i>	38
2.6 Sequenciamento do gene da aminopeptidase N1	39
2.7 Análise das sequências de aminopeptidases	40
3. Resultados e Discussão	41

3.1 Extração de RNA total.....	41
3.2 Pirosequenciamento e pré-processamento.....	42
3.3 Montagem e anotação do transcrito.....	42
3.4 Ontologia gênica e classificação por domínios protéicos.....	46
3.5 Análise de sequências possivelmente expressas no intestino de <i>T. licus licus</i>	49
3.6 Aminopeptidases N.....	52
4. Conclusão.....	55
Capítulo II – Estudo da atividade de toxinas Cry contra larvas neonatas de <i>Telchin licus licus</i>.....	56
1. Introdução.....	57
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner, 1911).....	57
1.2 Toxinas Cry.....	59
1.3 Receptores de toxinas Cry.....	62
1.4 Mecanismo de ação das toxinas Cry.....	63
1.5 Atividade de toxinas Cry contra <i>Telchin licus licus</i>	65
1.6 Transferência de domínios entre toxinas Cry e alteração da atividade.....	66
1.7 Modelagem molecular e dinâmica de proteínas.....	67
2. Material e Métodos.....	69
2.1 Obtenção de larvas de <i>Telchin licus licus</i>	69
2.2 Obtenção de toxinas Cry.....	69
2.3 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	69
2.4 Bioensaio de toxicidade e determinação da concentração letal LC ₅₀	69
2.5 Modelagem de proteínas.....	70
2.6 Sistemas simulados.....	71
2.7 Dinâmica molecular.....	71
2.8 Simulação de ligação por <i>docking</i> molecular.....	72
3. Resultados e Discussão.....	73
3.1 Análise do perfil protéico dos cristais.....	73
3.2 Ensaio de toxicidade.....	73
3.3 Modelagem das aminopeptidases e da toxina Cry1Ab.....	75
3.3.1 Descrição da estrutura das proteínas modeladas.....	75
3.3.2 Validação dos modelos.....	77
3.4 Dinâmica molecular das toxinas Cry e das aminopeptidases.....	80
3.5 <i>Docking</i> molecular.....	87
3.5.1 <i>Docking</i> das toxinas Cry1A contra APN1 de <i>Manduca sexta</i>	89
3.5.2 <i>Docking</i> das toxinas Cry1A contra APN1 de <i>Telchin licus licus</i>	91

3.5.3 <i>Docking</i> das toxinas Cry1A contra APN3 de <i>Telchin licus licus</i>	92
3.5.4 <i>Docking</i> das toxinas Cry1A contra APN4 de <i>Telchin licus licus</i>	93
4. Conclusões	100
Capítulo III – Silenciamento de genes de <i>Telchin licus licus</i>	101
1. Introdução	102
1.1 RNA interferente e silenciamento gênico	102
1.1.1 Uso do silenciamento gênico para o controle de insetos-praga	105
1.2 Potenciais alvos para o silenciamento	106
1.2.1 Sistema digestório de insetos	106
1.2.2 Membrana Peritrófica	107
1.2.3 Quitina sintase	109
1.2.4 V-ATPase	109
2. Material e Métodos	112
2.1 Insetos	112
2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	112
2.3 Análise de estabilidade de genes de referência	112
2.4 Obtenção e clonagem das sequências dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A	114
2.5 Expressão de dsRNA para os genes selecionados	115
2.6 Bioensaios com a broca-gigante	117
2.7 Teste de inibição da degradação de dsRNAs	118
2.8 Análise do silenciamento gênico	118
3. Resultados e Discussão	120
3.1 Seleção das sequências para validação de genes de referência	120
3.2 Validação dos genes de referência pelo programa Bestkeeper	122
3.3 Validação dos genes de referência pelo programa geNorm	125
3.4 Validação dos genes de referência pelo programa NormFinder	127
3.5 Análise geral dos resultados de validação	130
3.6 Análise da expressão dos genes da quitina sintase II e V-ATPase	131
3.7 Clonagem dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A	133
3.8 Avaliação do silenciamento dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A	134
4. Conclusões	147
Capítulo IV – Transformação genética de cana-de-açúcar	148
1. Introdução	149
1.1 Melhoramento genético e Transformação de cana-de-açúcar	149

2. Material e Métodos	152
2.1 Material vegetal	152
2.2 Fonte de explantes e cultura de tecidos	152
2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar	152
2.4 Vetores para transformação	153
2.5 Ensaios histoquímicos	156
2.6 Teste de resistência das plantas ao herbicida Finale®	156
2.7 Análisa da presença do transgene no genoma da planta	156
3. Resultados e Discussão	157
3.1 Obtenção dos calos embriogênicos	157
3.2 Teste do protocolo de precipitação e de transformação	158
3.3 Construção dos vetores	158
3.4 Transformação de calos e regeneração de plantas	160
3.5 Teste de resistência à aplicação de herbicida	161
3.6 Análise dos transformantes por PCR	161
4. Conclusões	164
Conclusões gerais	165
Referências bibliográficas	166
Apêndices	194
Anexos	197

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração representativa do ciclo biológico de <i>T. licus licus</i>	19
Figura 2. Efeito do ataque de <i>T. licus licus</i> sobre plantas de cana-de-açúcar.....	19
Figura 3. Ilustração das etapas do preparo do DNA e PCR em emulsão realizadas no pirosequenciamento.....	29
Figura 4. Ilustração das etapas de emissão e detecção do sinal fluorescente durante o pirosequenciamento.....	30
Figura 5. Análise da extração de RNA total de cada fase do ciclo de vida de <i>T. licus licus</i>	41
Figura 6. Valores de <i>e-value</i> para os principais <i>hits</i> de BLASTx para cada <i>contig</i>	45
Figura 7. Comparação do transcrito de <i>T. licus licus</i> com sequências de proteínas presentes no banco de dados não redundante.....	45
Figura 8. Comparação dos principais BLAST <i>hits</i> dos <i>contigs</i> do transcrito de <i>T. licus licus</i> com sequências de proteínas presentes no banco de dados nr.....	46
Figura 9. Classificação de ontologia gênica (GO) para os <i>contigs</i> do transcrito de <i>T. licus licus</i> ..	48
Figura 10. Alinhamento de APNs de <i>T. licus licus</i> identificadas no transcrito.....	52
Figura 11. Análise filogenética de APNs representativas de lepidópteros.....	54
Figura 12. Micrografia eletrônica de transmissão de células de <i>Bacillus thuringiensis</i> na fase de esporulação.....	57
Figura 13. Estrutura primária de toxinas Cry indicando o tamanho relativo das proteínas e a posição dos blocos conservados.....	59
Figura 14. Estrutura tridimensional de toxinas Cry obtidas por cristalografia.....	61
Figura 15. Mecanismo de ação de toxinas Cry1A em células epiteliais do intestino médio de <i>M.</i> <i>sexta</i>	65
Figura 16. Perfil protéico dos cristais solubilizados contendo as toxinas Cry após eletroforese em gel de acrilamida 12%.....	73
Figura 17. Taxa de mortalidade de larvas neonatas de <i>T. licus licus</i> em bioensaios com toxinas Cry em diferentes concentrações.....	74
Figura 18. Estrutura tridimensional da toxina Cry1Ab obtida após modelagem por homologia.....	76
Figura 19. Estrutura tridimensional da APN1TI obtida após modelagem por homologia.....	77
Figura 20. Gráfico de Ramachandran das proteínas modeladas.....	79
Figura 21. Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos sistemas simulados para APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul).....	80
Figura 22. Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos sistemas simulados para Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul).....	81
Figura 23. Raio de giro (Rg) das estruturas dos sistemas simulados para APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul).....	82
Figura 24. Raio de giro (Rg) das estruturas dos sistemas simulados para Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul).....	82
Figura 25. Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul). O quadro cinza indica a região de ligação das toxinas Cry1A aos receptores APN.....	83
Figura 26. Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. Toxina Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul). L-2 indica os resíduos que formam a alça 2 (<i>loop 2</i>). L-3 indica os resíduos que formam a alça 3 (<i>loop 3</i>).....	84
Figura 27. Superfície de acesso ao solvente (SAS) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul). O quadro cinza indica a região de ligação às toxinas Cry1A.....	85

Figura 28. Superfície de acesso ao solvente (SAS) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. Toxina Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul). L-2 indica os resíduos que formam a alça 2 (<i>loop</i> 2). L-3 indica os resíduos que formam a alça 3 (<i>loop</i> 3).	86
Figura 29. Representação esquemática da região de ligação das toxinas Cry1A na APN1 de <i>M. sexta</i>	88
Figura 30. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Aa à APN1Ms.	89
Figura 31. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN1Ms.	90
Figura 32. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN1Ms.	91
Figura 33. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Aa à APN4Tl.	93
Figura 34. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN4Tl.	94
Figura 35. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN4Tl.	95
Figura 36. Resumo das vias de silenciamento gênico por siRNA e miRNA.	104
Figura 37. A estrutura do complexo da V-ATPase de <i>M. sexta</i>	111
Figura 38. Valores de M após análise de estabilidade pelo geNorm.	126
Figura 39. Valores de V após análise de estabilidade pelo geNorm.	127
Figura 40. Valores de M após análise de estabilidade pelo NormFinder.	129
Figura 41. Valores de M após análise de estabilidade geral pelo NormFinder.	130
Figura 42. Expressão relativa dos genes de quitina sintase II e V-ATPase A nas diferentes fases do ciclo de vida do inseto.	132
Figura 43. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação dos fragmentos dos genes utilizados nos experimentos de silenciamento gênico.	133
Figura 44. Gel de agarose 1% mostrando a qualidade da síntese <i>in vitro</i> de dsRNA.	134
Figura 45. Detalhe do procedimento de microinjeção na região ventral anterior em larvas de 20-30 dias após eclosão.	136
Figura 46. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB).	137
Figura 47. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB).	137
Figura 48. Comparação da quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB).	138
Figura 49. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de V-ATPase A.	138
Figura 50. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de V-ATPase A.	139
Figura 51. Análise da quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB).	140
Figura 52. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA por RNAaseA	141
Figura 53. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA pela hemolinfa.	142
Figura 54. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA pelo homogenato intestinal de larvas alimentadas e não alimentadas.	142
Figura 55. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB).	143
Figura 56. Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de RNA total extraídas de células bacterianas HT115 após a indução da expressão de dsRNA.	144
Figura 57. Determinação da quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II realizada por qRT-PCR após administração de células HT115	144
Figura 58. Determinação da quantidade relativa de transcritos de V-ATPase realizada por qRT-PCR após administração de células HT115.	145
Figura 59. Cassetes de expressão para transformação de cana-de-açúcar.	155
Figura 60. Mapa do vetor p7iU utilizado para transformação de cana-de-açúcar.	155
Figura 61. Cultura de tecidos de cana-de-açúcar.	157
Figura 62. Ensaio histoquímico da atividade da enzima β -glucuronidase.	158

Figura 63. Alíquota de PCR submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da presença dos genes nos vetores de transformação de cana	159
Figura 64. Alíquota da digestão dos vetores com <i>Sfi</i> I submetida a eletroforese em gel de agarose..	159
Figura 65. Esquema da seleção dos calos resistentes ao herbicida glufosinato de amônio e regeneração das plantas.	160
Figura 66. Efeito da pulverização do herbicida sobre plantas transformadas.....	162
Figura 67. Gel de agarose 1% contendo uma alíquota do produto de PCR submetido à eletroforese para análise da presença do transgene no genoma das plantas de cana-de-açúcar transformadas por biobalística.....	163

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sumário da análise do transcriptoma de <i>T. licus licus</i>	43
Tabela 2. Sumário dos 25 principais domínios de proteínas encontrados no transcriptoma de <i>T. licus licus</i>	49
Tabela 3. Sumário dos principais domínios de proteínas encontrados após BLASTx contra proteínas de <i>M. sexta</i>	51
Tabela 4. Sumário das principais proteínas digestivas do transcriptoma de <i>T. licus licus</i> encontradas no transcriptoma e sua correspondência com enzimas de <i>M. sexta</i>	51
Tabela 5. Toxina Cry e aminopeptidases (APNs) que foram modeladas por homologia.	70
Tabela 6. Determinação da LC ₅₀ para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa em bioensaios contra larvas neonatas de <i>T. licus licus</i>	75
Tabela 7. Aminoácidos das APNs que interagem por meio de pontes de hidrogênio com as toxinas Cry1A.	96
Tabela 8. Resíduos de aminoácidos das toxinas Cry1A que interagem por meio de pontes de hidrogênio com as APNs de <i>M. sexta</i> e <i>T. licus licus</i>	97
Tabela 9. Iniciadores utilizados neste trabalho para validação de genes de referência.	114
Tabela 10. Iniciadores utilizados para clonagem e qRT-PCR dos genes da quitina sintase II e V-ATPase.....	115
Tabela 11. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para validação de genes de referência em diferentes fases do ciclo de vida de <i>T. licus licus</i> . O Coeficiente de Determinação (CD) indica maior estabilidade quanto mais perto de 1.....	124
Tabela 12. Análise geral da validação dos genes de referência. Para cada programa três genes, quando possível, foram organizados em ordem de estabilidade. A frequência geral apenas indica os genes mais frequentes sem nenhuma relação com estabilidade. Larvas neonatas (LP), larvas de último ínstar (LG).	131
Tabela 13. Iniciadores utilizados para a confirmação da presença dos genes nos cassetes de expressão.....	154

Abreviaturas

2,4D – Ácido Diclorofenoxiacético
Å – Angstrom
ALP – Fosfatase alcalina
ANA – Ácido Naftaleno acético
APN – Aminopeptidase N
ATP – Trifosfato de adenosina
 α -TUB – Alfa tubulina
BACs – *Bacterial Artificial Chromosome*
 β -ACT – Beta actina
BAP – *6-Benzylaminopurine*
Bt – *Bacillus thuringiensis*
 β -TUB – Beta tubulina
CAD – Caderina
CCD – *Charge-coupled device*
CD – Coeficiente de determinação
CHSB – Quitina sintase II
Contigs – Sequências contíguas
Cp – *Crossing point*
Cq – *Quantification cycle*
Ct – *Cycle threshold*
DEPC – Dietilpirocarbonato
DM – Dinâmica molecular
dsRNA – RNA dupla fita
E.C. – *Enzyme commission number*
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF1- α – Fator de alongação 1- α
fs – Femtossegundo
Gal-Nac – N-acetilgalactosamina
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM – Geneticamente modificado
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
GUS – β -glucuronidase
Hg – Elemento químico Mercúrio
IPTG – *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
K – Kelvin
 K_d – Constante de dissociação
kDa – Kilodalton
LC₅₀ – Concentração letal média
M – Molar

MG – Média geométrica
mM – Milimolar
 μmol – Micromolar
MRP – Meio de Regeneração de Plantas
NGS – *Next Generation Sequencing*
nm – Nanometro
nr – Não redundante
ns – Nanossegundo
OGM – Organismo Geneticamente Modificado
OsAct-1 – Promotor de actina de arroz (*Oryza sativa*)
pat/bat – Fosfinotricina acetiltransferase
PRPP – Fosforribosil Pirofosfato Sintetase
ps – Picossegundo
psi – Libra por polegada quadrada
qRT-PCR – PCR em tempo real
RACE – *Rapid Amplification of cDNA Ends*
Rg – Raio de giro
RMSD – Desvio quadrático médio
RMSF – Flutuação quadrática média
RNAi – RNA interferente
RPM – Rotações por minuto
SAS – *Solvent Accessible área*
SD – Desvio padrão
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
siRNA – *Small Interfering RNA*
SRA – *Sequence Read Archive*
T35S – Terminador 35S de *Cauliflower Mosaic Virus*
U – Unidade
Ubi1 – Promotor de ubiquitina de milho (*Zea mays*)
UBQ - Ubiquiina
X-GLUC - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt*

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas do Brasil e apresenta importância comercial significativa em todo o mundo. As lavouras são alvo constante de ataque de insetos-praga e patógenos, além de sofrerem também com estresses abióticos. Dentre os principais insetos-praga responsáveis por grandes impactos econômicos na produção de cana nas regiões Norte e Nordeste encontra-se a broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*). Existe pouca informação acerca da fisiologia ou biologia molecular dessa praga, o que torna seu controle muito difícil. Entre as estratégias que vêm sendo desenvolvidas para o controle de insetos-praga encontram-se, o uso de toxinas Cry com atividade melhorada especificamente contra o inseto alvo e a utilização do silenciamento gênico por meio da técnica de RNA interferente. O presente trabalho gerou uma biblioteca de genes expressos de *T. licus licus*, por meio de sequenciamento de cDNAs obtidos de diferentes estágios do ciclo de vida do organismo. O pirosequenciamento do transcrito de *T. licus licus* gerou mais de 600.000 *reads* que foram anotados em 23.942 *contigs* de alta qualidade. Após a obtenção da biblioteca, foram selecionados três genes que codificam aminopeptidases N (APNs), que além de atuarem como enzimas digestivas, podem participar como receptores de toxinas Cry. Essas APNs foram caracterizadas quanto a sua capacidade de interação em ensaios de dinâmica molecular e *docking* molecular com quatro toxinas Cry: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa. A atividade dessas toxinas foi analisada em bioensaios contra larvas neonatas de *T. licus licus* e mostrou que as toxinas da classe 1A foram as que apresentaram maior mortalidade. Ao comparar os dados dos bioensaios com os resultados da dinâmica molecular e *docking*, foi observado que a APN4TI apresentou as características mais próximas a receptores de toxinas Cry já descritos. Além disso, a busca por genes essenciais do inseto permitiu identificar os genes para quitina sintase II e V-ATPase A, os quais foram avaliados em ensaios de silenciamento gênico com larvas neonatas da broca-gigante. A análise de expressão de genes resultou em um extenso trabalho de validação de genes de referência a serem utilizados em experimentos de qRT-PCR. Paralelamente aos estudos do transcrito e avaliação de toxinas Cry, foram iniciados experimentos de transformação genética de plantas de cana-de-açúcar visando avaliar o efeito de moléculas entomotóxicas sobre larvas neonatas de *T. licus licus* em bioensaios. Os resultados aqui apresentados são os primeiros estudos da fisiologia e biologia molecular do inseto e permitiram o desenvolvimento de um método de criação de larvas em laboratório (Patente em preparação). As informações aqui disponibilizadas contribuirão em aplicações futuras visando o desenvolvimento de técnicas aplicadas ao controle biotecnológico da broca-gigante da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Broca-gigante, cana-de-açúcar, toxinas Cry, aminopeptidase, RNA interferente, dinâmica molecular, *docking* molecular, biobalística.

Abstract

Sugarcane is one of the main crops in Brazil and presents significant commercial importance worldwide. The crop is a constant target of attack of insects and pathogens, besides suffering with abiotic stresses. Among the insect pests responsible for major economic impact in sugarcane production in North and Northeast regions is the sugarcane giant-borer (*Telchin licus licus*). Despite its importance, there is little information about its physiology and molecular biology, which makes their control difficult. The use of Cry toxins with specifically improved activity against the target insect and the use of gene silencing by RNA interference technique are among the strategies that are being developed for insect control. By using Next Generation Sequencing, a library of expressed genes of several life stages of *T. licus licus* was obtained. The pyrosequencing generated over 600,000 reads which were assembled into 23,942 high quality contigs. After sequence annotation, the library was screened and three genes encoding aminopeptidases N (APNs) enzymes were selected. Although participating in the degradation of proteins during digestion, these enzymes may act as Cry toxins receptors. The APN proteins were characterized for their ability to interact with toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2Aa) in molecular dynamics and molecular docking experiments. The activity of the toxins was analyzed in bioassays with neonate larvae of *T. licus licus* and showed that Cry1A Class presented better efficiency of mortality. After comparison of the bioassay data with the docking and molecular dynamics results it was observed that APN4Tl presented similar characteristics of known Cry toxin receptors. Furthermore, the search for essential genes of the insect identified the chitin synthase II and V-ATPase A genes, which were evaluated in gene silencing experiments with neonate larvae of the giant-borer. Gene expression analysis resulted in an extensive validation work of references genes to be used in qRT-PCR experiments. In addition, sugarcane transformation experiments were initiated to evaluate the action of entomopathogenic molecules on neonate larvae in bioassays. The data presented here are the first studies of physiology and molecular biology of the insect and allowed to develop a protocol for insect rearing in laboratory (Patent pending). The information available here will contribute significantly in subsequent work aimed at developing techniques for the sugarcane giant-borer control.

Keywords: Giant-borer, sugarcane, Cry toxins, aminopeptidase, RNA interference, molecular dynamics, molecular docking, biolistics.

1. Introdução Geral

1.1 Cana-de-açúcar: Características gerais e agronegócio

A cana-de-açúcar, descrita por Linneu em 1753, é uma monocotiledônea pertencente à família *Gramineae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. Nativa de regiões tropicais e subtropicais, sua origem geográfica é atribuída ao sudoeste asiático, principalmente à região central da Nova Guiné, Indonésia e Índia (DANIELS e ROACH, 1987). Inicialmente, seu consumo se dava por meio da produção de xaropes que eram utilizados principalmente como medicamentos. A produção do açúcar, a partir do caldo da cana foi uma tecnologia desenvolvida na Índia por volta de 3.000 a.C. Esse conhecimento foi mantido em segredo durante muito tempo, principalmente pelo povo persa que o comercializava com os romanos, por volta de 500 a.C. A propagação do cultivo de cana pelo mundo iniciou-se por meio das invasões árabes ao continente europeu, que introduziram a cultura na região do Mar Mediterrâneo, porém o clima da região não permitiu o seu cultivo com eficiência (CESNIK e MIOCQUE, 2004). Trazida para o continente americano por espanhóis e portugueses na época das grandes navegações, rapidamente se adaptou às condições climáticas e aos solos férteis da região. Hoje, a cana-de-açúcar é cultivada em mais de 90 países e constitui uma das principais culturas do planeta (GRIVET e ARRUDA, 2002).

O gênero *Saccharum* é constituído por diferentes espécies, dentre elas: *Saccharum officinarum*, espécie alopoliplóide ($2n=80$) conhecida como cana-nobre por apresentar elevado teor de açúcar e considerada como uma das espécies que mais contribuíram para a composição do genoma das cultivares atuais (MING *et al.*, 1998); *S. spontaneum*, autopoliplóide ($2n=40$ a 128) é pouco cultivada mas contribuiu significativamente com características como vigor, perfilhamento, capacidade de rebrota da soqueira, tolerâncias a estresses, doenças e pragas. *S. robustum* ($2n=60$) é uma espécie similar a *S. officinarum*, mas que pode atingir até 10 metros de altura. *Saccharum sinensis* ($2n=111$ a 120) e *S. barberi* ($2n=81$ a 124) são espécies aneuplóides e que também contribuíram em parte para a formação do genoma das cultivares atuais (SEGATO *et al.*, 2006).

De uma forma geral, a cana-de-açúcar cultivada comercialmente é um híbrido multiespecífico, proveniente do cruzamento de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. barberi*; além de hibridação intergenérica entre os gêneros *Saccharum*, *Ripidium* e *Sclerostachya* (CESNIK e MIOCQUE, 2004), recebendo assim a denominação de *Saccharum* spp (DANIELS e ROACH, 1987).

A produção de cana-de-açúcar é de grande importância comercial em todo o mundo. Estima-se que a cultura contribua com até 78% de todo o açúcar produzido, sendo o restante oriundo da beterraba açucareira. Além da produção de açúcar por decantação e cristalização do caldo de cana, a fermentação do mesmo permite a produção de etanol. Este produto é utilizado principalmente como combustível automotivo em substituição aos combustíveis fósseis e sua produção tem despertado um interesse cada vez maior, já que representa uma fonte de energia renovável (BNDES e CGEE, 2008).

O crescimento do mercado de consumo de açúcar e etanol, aliado à preocupação com a preservação do meio ambiente, tem gerado a necessidade de buscar maneiras de aumentar a produção e ao mesmo tempo reduzir custos, sem agredir o meio ambiente. Uma das maneiras utilizadas pela indústria para melhorar a cadeia produtiva de maneira sustentável é a reutilização dos subprodutos gerados. O processamento das plantas de cana-de-açúcar nas usinas gera três produtos principais: o caldo, o bagaço e as palhas. O caldo é a fração da planta que corresponde a um terço da reserva energética e dele são obtidos o açúcar e o etanol. O bagaço corresponde a outro terço da reserva energética da planta, este é queimado em caldeiras e o vapor produzido utilizado, principalmente, para a geração de energia elétrica e mecânica, que geralmente suprem toda a demanda energética da usina (MACEDO, 2005). As palhas são utilizadas principalmente como adubos naturais, protegem o solo contra a perda excessiva de água e também são utilizadas em uma escala menor para a geração de energia elétrica. Durante o processo de produção de açúcar são obtidos como co-produtos, a torta de filtro e o melaço. Quando misturado ao caldo em concentrações adequadas, o melaço pode ser fermentado novamente pela ação de leveduras, produzindo álcool hidratado e vinhaça. A vinhaça e a torta de filtro são reutilizadas como fertilizantes (MACEDO, 2005).

Segundo a FAO (2011), o Brasil possui papel de destaque no setor sucroalcooleiro, contribuindo com cerca de 40% da produção mundial de cana, seguido de Índia, com 19%; China, com 6% e Tailândia, com 5%. A produção no país está concentrada principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste e ocupa uma área de aproximadamente 8,5 milhões de hectares. A estimativa de produção para a safra 2012/13 é de cerca de 600 milhões de toneladas, das quais 50,42% (300,82 milhões de toneladas) serão destinados à fabricação de açúcar e 49,58% (295,81 milhões de toneladas) para a produção de álcool. São Paulo é o estado com maior participação na produção, representando aproximadamente 54% (323,124 milhões de toneladas) da produção nacional (CONAB, 2012).

As lavouras de cana-de-açúcar têm se expandido anualmente em todo o país. O maior percentual de aumento está na região Sudeste. Outra região que apresentou crescimento significativo na expansão da área de cultivo foi a Centro-Oeste. No geral, as regiões mais produtivas do país foram a Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Além disso, o índice de produtividade também tem sido outro fator que vem impulsionando a indústria canavieira. No período entre as safras 2011/2012 e 2012/2013 houve aumento de 4,3%, chegando a 69.963 kg/ha (CONAB, 2012). De acordo com Neves e Conejero (2007), o agronegócio chega a ser responsável por 28% do Produto Interno Bruto (PIB). O setor sucroalcooleiro é responsável por 7,5% do PIB do país, gerando até quatro milhões de empregos.

Assim como a maioria das gramíneas, a cana-de-açúcar é uma planta que apresenta metabolismo C4, classificação que indica a capacidade da planta de formar compostos orgânicos com quatro carbonos (BUCHELI; DRY; ROBINSON, 1996). É considerada altamente eficiente na conversão de energia luminosa em energia química. Além disso, apresenta altas taxas fotossintéticas e de eficiência na utilização e resgate de CO₂ da atmosfera (SEGATO *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar é adaptada às condições de elevadas temperaturas, alta intensidade luminosa e requer grandes quantidades de água para suprir suas necessidades hídricas, já que 30% de seu peso é composto de matéria seca e 70% de água. A absorção de água é realizada em grande parte pelas raízes, porém a cana-de-açúcar é conhecida por sua alta capacidade de absorção pelas folhas, o que facilita o aproveitamento da água acumulada na forma de orvalho e chuviscos (SEGATO *et al.*, 2006).

A multiplicação comercial da cana-de-açúcar é feita, principalmente, de maneira vegetativa (ou assexuada), ou seja, por meio de utilização de gemas dos colmos e de mudas. Outro fator importante é que o florescimento da cana ocorre somente sob condições climáticas específicas tais como: baixo fotoperíodo (a cana-de-açúcar caracteriza-se por ser uma planta de dia curto), temperatura (principalmente temperatura noturna de 18 °C por 10 dias ou mais) e latitude (encontrada no litoral Sul da Bahia e Alagoas). Dessa forma, a ocorrência de polinização natural é um evento bastante dificultado, o que contribui positivamente para o plantio desta cultura uma vez que a chance de cruzamento indesejado entre variedades ou entre espécies praticamente não ocorre no campo (ROMANO *et al.*, 2009).

Apesar de ser uma planta perene na sua forma natural, o cultivo de cana-de-açúcar é realizado de maneira semiperene. A cada cinco ou sete colheitas torna-se necessário um novo plantio. Isso ocorre porque o pisoteio por máquinas e veículos no cultivo e, principalmente, na colheita, não apenas prejudica diretamente a planta, como também compacta o solo. Além disso, há um progressivo aumento de doenças no canavial. Dessa forma, ocorre uma diminuição do número de plantas e o desenvolvimento reduzido das remanescentes (ROMANO *et al.*, 2009).

1.2 Insetos-praga da cultura canavieira e alternativas de controle

A indústria canavieira passa atualmente por um processo de incrível crescimento. Para atender essa demanda acelerada e cada vez maior, exige-se um aperfeiçoamento de práticas, tanto fitotécnicas de manejo da cultura, como industriais.

Com a expansão do plantio de cana-de-açúcar por quase todo o território nacional, há um aumento de biomassa, que poderá ser utilizada para a produção de açúcar e etanol. Dessa forma, aumenta, também, a disponibilidade de alimento para insetos e outros organismos. Conseqüentemente há o aumento da incidência de pragas nos canaviais que podem causar graves prejuízos. Dentre os insetos-praga mais danosos pode-se citar a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* Fabr. 1794; (*Lepidoptera: Crambidae*) e a cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854; (*Homoptera: Cercopidae*). Outros insetos considerados pragas importantes, mas que ocorrem de forma regionalizada ou esporadicamente são: os gorgulhos da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Varrie 1978; (*Coleoptera: Curculionidae*) e *Metamasius hemipterus* Linnaeus, 1765; (*Coleoptera: Curculionidae*) os cupins *Heterotermes tenuis* Hagen, 1858; (*Isoptera; Rhinotermitidae*), as formigas cortadeiras saúvas (*Atta spp.*), quenquéns (*Acromyrmex spp.*), o migdolo *Migdolus fryanus* Westwood, 1863; (*Coleoptera: Cerambycidae*) a cigarrinha-das-folhas *Mahanarva posticata* Stal, 1855; (*Hemiptera: Cercopidae*) e a broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus* Drury, 1770; (*Lepidoptera: Castniidae*) (PINTO; GARCIA; OLIVEIRA, 2006).

Visando diminuir as perdas causadas por insetos-praga, os agricultores passaram a investir no controle, principalmente por meio do uso de pesticidas químicos e no desenvolvimento de híbridos resistentes. O uso de pesticidas nem sempre é eficaz, uma vez que alguns insetos apresentam hábitos endofíticos e não entram em contato com o agente químico. Além disso, além de onerosa, essa estratégia pode ser prejudicial ao meio ambiente, pois pode contaminar o solo e os lençóis freáticos, emitir gases tóxicos para a atmosfera e

contribuir de maneira negativa para a seleção de organismos resistentes aos agentes químicos (GALLO *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de novas cultivares por meio de intercruzamentos vem ajudando a conseguir maiores índices de produção e reduzir os danos causados à natureza, além de aumentar a resistência contra doenças e insetos-praga. Porém, nem sempre essa é a melhor estratégia para adquirir características de interesse agrônomo, principalmente porque as espécies do gênero *Saccharum* possuem diferentes números de cromossomos (variando entre 80 e 120). Isto pode tornar o cruzamento praticamente inviável gerando indivíduos triplóides e/ou aneuplóides, retardando a obtenção de uma cultivar de cana-de-açúcar com características agrônomicas desejáveis em até 15 anos (LAKSHMANAN *et al.*, 2005).

O controle biológico é uma ferramenta que visa utilizar organismos biológicos que são inimigos naturais, parasitas, ou que possuam atividade entomotóxica. Na cultura canavieira, existem muitos exemplos de organismos que podem ser utilizados para o controle de diversas pragas, dentre eles: os parasitóides de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988; (*Hymenoptera: Trichogrammatidae*) *Anagrus urichi* Pickles, 1932; (*Hymenoptera: Mymaridae*) e *Acmopolymena hervali* Gomes, 1948; (*Hymenoptera: Mymaridae*), a vespinha *Cotesia flavipes* Cameron, 1891; (*Hymenoptera: Braconidae*), a mosca predadora de ninfas *Salpingogaster nigra* Schiner, 1868; (*Diptera: Syrphidae*), os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Batkoa apiculata*, e a bactéria *Bacillus thuringiensis* (PINTO, 2006).

O melhoramento genético convencional de plantas de cana vem sendo o principal meio de obtenção de novas variedades, porém é um processo longo. O uso da biotecnologia vem se tornando cada vez mais usual e, muitas vezes, uma necessidade. A identificação e seleção de genes de interesse por meio do uso de marcadores moleculares aceleraram os processos convencionais de obtenção de indivíduos recombinantes. Os avanços na área de cultura de tecidos, Biologia Molecular e Engenharia Genética permitiram o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs), dando origem a plantas resistentes a herbicidas, insetos e doenças, que acumulam sacarose e plantas adaptadas a ambientes adversos (NÓBREGA e DORNELAS, 2006). Espera-se que muito em breve os primeiros eventos de cana-de-açúcar transgênica sejam liberados para o cultivo comercial, no Brasil e em outros países que permitem o cultivo de plantas geneticamente modificadas.

1.3 Broca-gigante da cana-de-açúcar

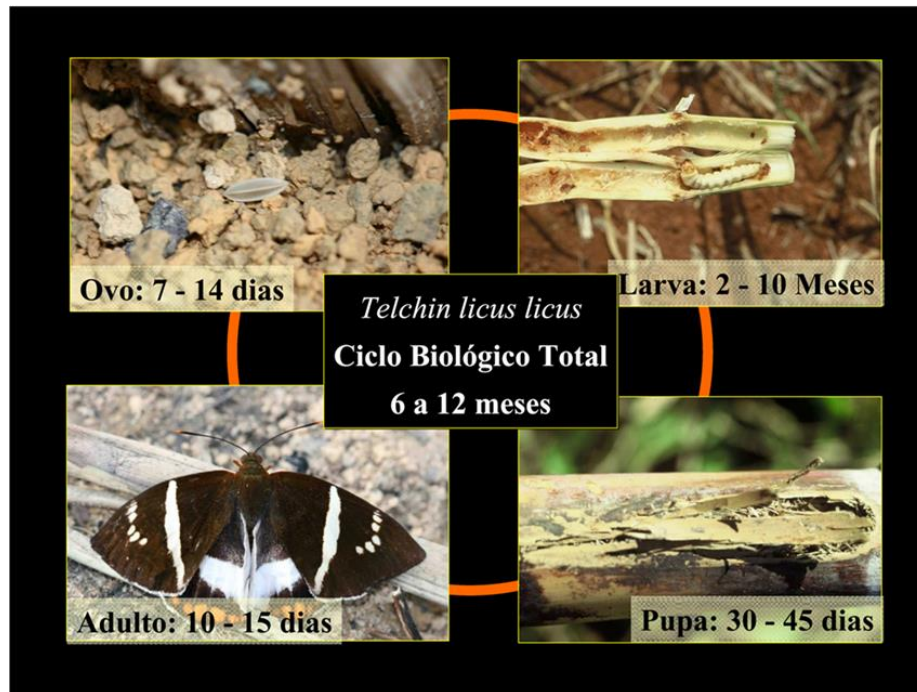
A broca-gigante da cana-de-açúcar, *T. licus licus* é um inseto encontrado em vários países da América Latina. No Brasil, é encontrada principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará e Amapá. Originalmente as lagartas desse inseto eram pragas naturais de abacaxis, gramíneas silvestres e orquídeas. Após a introdução de espécies exógenas como bananeiras e cana-de-açúcar, o inseto adaptou-se rapidamente a essas novas culturas (MENDONÇA, 1996). Em cerca de 500 anos de cultivo de cana no Brasil, a broca-gigante tornou-se a praga mais importante das lavouras das regiões Norte e Nordeste, causando prejuízos de até 60% na produção (BRISCENO, 2008; GALLO *et al.*, 2002). Já foram encontradas áreas isoladas infestadas com essa lagarta nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, indicando que esse inseto se disseminou para regiões onde, anteriormente, não era encontrado, mas ainda sem representar uma ameaça importante (MENDONÇA, 1996). Porém, devido às dificuldades encontradas para o controle desse inseto-praga, há uma grande preocupação por parte dos produtores quanto à destruição que pode ser causada na principal região produtora de cana do país.

O ciclo de vida do inseto pode durar de seis a 12 meses e é dividido em quatro estágios de desenvolvimento principais: ovo, larva, pupa e adulto. A fase de ovo ou incubação pode durar de sete a 14 dias. O período de desenvolvimento larval dura entre dois e dez meses, passando por cinco ínstaes. A transformação em pupa dura entre 30 e 45 dias e, após a metamorfose, os adultos emergem, vivendo em média 15 dias (BOTELHO; GARCIA; MACEDO, 2006; GALLO *et al.*, 2002) (Figura 1).

Os ovos da broca-gigante apresentam inicialmente coloração rosada e, posteriormente, tornam-se de coloração verde-azeitona. Esses ovos podem chegar a 4 mm de comprimento com cinco arestas longitudinais. Normalmente são depositados em touceiras velhas, de preferência, no meio de detritos e de caules cortados que estejam próximos à base do colmo.

As larvas neonatas medem cerca de 5 mm e podem chegar a até 80 mm de comprimento e 12 mm de largura, apresentando coloração branco marfim, com algumas manchas no pronoto. Logo que eclodem, as larvas imediatamente começam a perfurar as regiões macias da planta, principalmente na base, chegando até o interior do rizoma. Após a sua instalação, as lagartas começam a se alimentar de todo o interior da cana (MENDONÇA, 1996). Isso pode causar o mau desenvolvimento, tombamento ou a morte das plantas além de permitir a infecção por organismos oportunistas responsáveis pela inversão e perda de

sacarose do colmo, como os fungos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, causadores da podridão-de-fusarium e da podridão-vermelha, respectivamente (IAA/PLANALSUCAR, 1977) (Figura 2).



Fonte: Leonardo Macedo

Figura 1. Ilustração representativa do ciclo biológico de *T. licus licus* mostrando os quatro estágios de desenvolvimento principais.



Fonte: Leonardo Macedo

Figura 2. Efeito do ataque de *T. licus licus* sobre plantas de cana-de-açúcar. A) Imagem aproximada mostrando a lagarta de *T. licus licus* e as manchas vermelhas causadas por infecção por organismos oportunistas. B) Destruição do interior da planta. C) Soqueira infestada por broca-gigante. D) Devastação da lavoura causada pelo inseto.

As pupas apresentam coloração castanho escura e medem aproximadamente 40 mm de comprimento. Ficam escondidas no interior de um casulo feito de fibras de cana até o momento do surgimento dos adultos (MENDONÇA, 1996).

Os adultos são mariposas que apresentam 35 mm de comprimento e 90 mm de envergadura alar, apresentando coloração escura com manchas brancas na região apical e uma faixa transversal branca nas asas anteriores. As asas posteriores apresentam uma faixa curva e transversal de coloração branca e sete manchas vermelhas na margem externa. Nos canaviais, os adultos aparecem no período de verão com um vôo diurno e rápido. A corte nupcial ocorre no primeiro período do dia, onde os machos atraídos pelo feromônio da fêmea iniciam a cópula. Após a fecundação, cada fêmea pode botar de 50 a 100 ovos (GALLO *et al.*, 2002).

Segundo BRISCENO (2008), o aumento na incidência da broca-gigante nos canaviais está relacionado principalmente aos métodos rudimentares de controle do inseto-praga, mas outros fatores como a prática da irrigação por aspersão, gotejamento ou pivô central também contribuem para criar as condições ideais de umidade e temperatura necessárias para a sobrevivência do inseto. A utilização de produtos químicos é ineficaz, principalmente, porque a fase larval, a mais importante a ser controlada, se encontra protegida no interior da cana. Além disso, o custo é muito alto já que a broca-gigante possui um ciclo de vida longo, o que faz necessárias várias aplicações do pesticida durante o ano. Para controlar a infestação, diversos métodos foram testados, métodos químicos, controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos, métodos mecânicos e de resistência de plantas, porém sem grandes êxitos. O melhor método de controle é a catação manual de larvas, pupas e a captura de adultos com redes entomológicas. Entretanto, essa técnica tem apresentado baixa eficiência, pois se leva muito tempo para percorrer toda a extensão de um canavial e depende, principalmente, de um grande número de pessoas (PINTO; GARCIA; OLIVEIRA, 2006). Colaborando com esses fatos, a diminuição ou a quase extinção do processo de queima dos canaviais antes das colheitas, muito utilizada na região Nordeste, também tem permitido a proliferação de diversas doenças e pragas da cultura.

Devido aos riscos potenciais que este inseto-praga representa para a produção de cana-de-açúcar e aos métodos rústicos de manejo desse organismo há necessidade de desenvolvimento de estratégias alternativas para o seu controle. Tais estratégias podem incluir, principalmente, a utilização de microrganismos como, a bactéria *B. thuringiensis*, o

silenciamento de genes essenciais para o inseto, por meio de RNA interferente, e o desenvolvimento de plantas transgênicas superexpressando moléculas tóxicas contra insetos.

2. Justificativa

Todos os anos, a produtividade da cana-de-açúcar é drasticamente reduzida devido ao ataque de insetos-praga, dentre eles a broca-gigante da cana-de-açúcar (*T. licus licus*). Os métodos de controle químico utilizados atualmente, além de serem muito onerosos, também se mostram ineficazes para o controle do inseto-praga. Pouco se conhece acerca de sua fisiologia e biologia molecular e assim, a maneira mais eficiente para manejo da broca-gigante ainda tem sido a utilização de métodos rudimentares, como catação manual das lagartas.

Até o momento não foram descritas cultivares de cana-de-açúcar resistentes a insetos, obtidas por meio de melhoramento genético convencional, o que torna necessária a busca de métodos alternativos de controle para o combate ao inseto-praga.

As toxinas Cry de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas com sucesso há muito tempo no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças humanas tais como *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Entretanto, pouco se sabe sobre o espectro de ação dessas toxinas sobre a broca-gigante, tampouco sobre o mecanismo de ação dessas proteínas em seu organismo.

Apesar de existirem eventos de cana-de-açúcar geneticamente modificada (GM) visando à expressão de algumas toxinas Cry, não há relato existente de plantas resistentes à broca-gigante (ARENCEBIA *et al.*, 1997; BRAGA *et al.*, 2003; WENG *et al.*, 2011).

A validação funcional de moléculas essenciais para a sobrevivência da broca-gigante por meio de silenciamento pode ser uma alternativa promissora para o controle. A utilização desta estratégia exige, entretanto, a escolha de alvos que sejam eficazes contra o organismo alvo e, ao mesmo tempo, não apresente toxicidade e/ou alergenicidade em mamíferos, além de efeitos contra insetos não alvos. Dessa forma, criar um banco de dados de sequências de DNA permite conhecer a composição gênica dos insetos, ajuda a identificar sequências expressas especificamente nos organismos alvos e a escolher a melhor região do gene a ser utilizada para o silenciamento, visando desenvolver um método de controle biotecnológico alternativo.

3. Hipótese

Ao utilizar ferramentas de biologia molecular, tais como o silenciamento de genes essenciais para a sobrevivência do inseto por meio de RNA interferente ou o uso de toxinas Cry, é possível gerar conhecimento necessário para desenvolver estratégias alternativas para o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar o transcrito da broca-gigante e gerar conhecimento sobre a sua biologia. Identificar possíveis receptores de toxinas Cry e validar estratégias de controle do inseto-praga utilizando ferramentas biotecnológicas tais como toxinas Cry e RNA interferente. Aperfeiçoar experimentos de transformação de plantas de cana-de-açúcar visando, futuramente, o desenvolvimento de eventos resistentes ao ataque do inseto.

4.2 Objetivos específicos

- Obter diferentes fases do ciclo de vida da broca-gigante para a extração de mRNA e produção de cDNAs enriquecidos e normalizados;
- Gerar uma biblioteca de ESTs (*Expressed Sequence Tags*);
- Identificar possíveis receptores de toxinas Cry;
- Determinar a toxicidade de diferentes toxinas Cry contra larvas neonatas de *T. licus licus*;
- Realizar estudos de modelagem molecular dos receptores identificados e estudar sua interação com diferentes toxinas Cry;
- Identificar e isolar genes essenciais ao desenvolvimento da broca-gigante;
- Determinar o perfil de expressão desses genes ao longo do ciclo de vida da broca-gigante;
- Avaliar o potencial uso do silenciamento de genes essenciais *via* RNA interferente;
- Realizar experimentos de transformação de plantas de cana-de-açúcar.

Capítulo I – Obtenção e análise do transcrito da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*)

1. Introdução

1.1 Sequenciamento de DNA

Embora a estrutura de dupla hélice do DNA tenha sido estabelecida em 1953 (WATSON e CRICK, 1953), várias décadas seriam necessárias antes que fragmentos de DNA pudessem ser analisados de acordo com sua sequência de bases nucleotídicas. No início da década de 1970, pesquisadores desenvolveram uma metodologia para o sequenciamento de RNA para determinar a composição de nucleotídeos de um ácido nucléico. O marco principal desta tecnologia foi o primeiro sequenciamento completo do gene do capsídeo do bacteriófago MS2 e, alguns anos mais tarde, do genoma completo desse mesmo vírus (FIERS *et al.*, 1976; MIN JOU *et al.*, 1972). Esses trabalhos incentivaram, ainda, o aperfeiçoamento desta técnica alguns anos mais tarde (MAZO *et al.*, 1979).

Os esforços iniciais de tentativa de sequenciamento de genes tinham que ser muito meticulosos além de demandar muito tempo e trabalho. A maioria das técnicas envolvia métodos que dependiam de hidrólise parcial das moléculas de DNA. Gilbert e Maxam (1973) relataram o sequenciamento de 24 pares de bases de uma cadeia de DNA utilizando uma metodologia conhecida como *wandering-spot analysis* (GILBERT e MAXAM, 1973). A tecnologia de sequenciamento começou a mudar quando Sanger e colaboradores (1977) desenvolveram uma nova metodologia, muito mais rápida e eficiente. Os avanços no sequenciamento aconteceram, principalmente, devido ao auxílio da tecnologia do DNA recombinante, que permitiu o isolamento de fragmentos de DNA de diversos organismos e sua clonagem em vetores como fagos, plasmídeos, BACs, entre outros.

A técnica desenvolvida por Sanger baseou-se em uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional, na qual eram adicionados o DNA, iniciadores (*primers*), DNA polimerase, deoxinucleotídeos (dNTPs) e dideoxinucleotídeos (ddNTPs). A incorporação de ddNTP à cadeia de DNA interrompe o processo de alongação pela polimerase. Em uma reação de sequenciamento comum, a amostra de DNA era dividida em 4 reações separadas, cada uma contendo todos os quatro nucleotídeos padrão (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), a polimerase, os iniciadores e um dos ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP ou ddTTP). Após várias rodadas de extensão, os fragmentos de DNA resultantes eram aquecidos e separados por eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida, resultando em fragmentos de DNA de diversos tamanhos. Cada uma das quatro reações era aplicada separadamente nos poços do gel e, após a separação por eletroforese, os fragmentos de DNA podiam ser visualizados por

autorradiografia ou sob luz UV. A sequência de DNA podia então ser lida diretamente do filme radiográfico ou na imagem do gel.

Ao longo dos anos, várias inovações tecnológicas permitiram a automatização do sequenciamento. Os ddNTPs utilizados foram ligados a fluoróforos, cada um emitindo um comprimento de onda específico, possibilitando a utilização dos quatro nucleotídeos em uma mesma reação e eliminando o uso de material radioativo. O processo de leitura da sequência nucleotídica foi automatizado a partir do surgimento de analisadores que emitem um feixe de laser sobre o gel, causando a excitação dos nucleotídeos marcados. A cor emitida por cada nucleotídeo é detectada eletronicamente e convertida digitalmente para um arquivo de sequências. Uma nova adaptação da metodologia substituiu a necessidade de separar os fragmentos de DNA em gel de poli-acrilamida, aumentando a capacidade de sequenciamento de 500 para aproximadamente 1000-1200 pares de bases (ZHANG *et al.*, 2011). O sistema de capilares utiliza uma quantidade ínfima de DNA e outros reagentes para separar os fragmentos de DNA em uma matriz líquida. Com isso o tempo necessário para separar todos os fragmentos foi reduzido consideravelmente (ALMIRA; PANAYOTOVA; FARMERIE, 2003). Apesar da ampla capacidade e grande aplicação, várias técnicas de pré-sequenciamento precisaram ser desenvolvidas, quando o objetivo do sequenciamento era obter um gene completo, ou uma região maior de uma sequência de DNA.

Em 1990, geneticistas americanos iniciaram uma busca ambiciosa: obter a sequência completa do genoma humano. O plano original dos pesquisadores do *Human Genome Project* era bem elaborado. Primeiramente seriam criados mapas genéticos e mapas físicos de cada cromossomo. Esses mapas iriam conter marcadores genéticos que seriam utilizados como guia para a montagem de um quebra-cabeças gigante. O sequenciamento propriamente dito, só seria realizado quando todos os mapas estivessem prontos. A expectativa do grupo era de que seriam necessários 15 anos para completar o projeto (LANDER *et al.*, 2001; YAMEY, 2000). Então em 1998, Craig Venter, responsável pelo sequenciamento do genoma humano financiado pela iniciativa privada, declarou que seria capaz de obter o genoma em apenas dois anos. Isso seria conseguido a partir do uso de uma técnica denominada por ele de sequenciamento *shotgun*, onde o genoma humano seria fragmentado, clonado em vetores e em seguida sequenciado aleatoriamente. Finalmente, as sequências seriam reunidas em supercomputadores que fariam o alinhamento a partir de sobreposições encontradas em cada uma (VENTER *et al.*, 2001; VENTER; SMITH; HOOD, 1996). O resultado final do

sequenciamento do genoma humano foi publicado em 2003, marcando o aniversário de 50 anos da descoberta da estrutura da dupla hélice (COLLINS *et al.*, 2003).

1.2 Sequenciamento de segunda geração (*Next Generation Sequencing*)

A necessidade de sequenciamento vem aumentando significativamente ao longo dos anos, com aplicações em diversos setores incluindo, genômica comparativa e evolução, genética forense, epidemiologia e medicina aplicada para a diagnose e terapêutica. A tecnologia que utilizava o método de Sanger no começo da década de 2000 para suprir a demanda de informação genética era muito cara, trabalhosa e consumia muito tempo. O desenvolvimento de novas técnicas de detecção, miniaturização dos instrumentos, tecnologias de separação em microfluidos e um incremento do número de ensaios por corrida têm sido muito impactantes para a redução de custos. Entretanto novas tecnologias de sequenciamento vêm surgindo como uma maneira de gerar grandes quantidades de dados em um tempo relativamente curto (METZKER, 2005). Dentre elas podemos citar: sequenciamento por hibridização (SBH – *Sequencing-by-hybridization*), sequenciamento em nanoporos (*Nanopore sequencing*) e sequenciamento por síntese ou sequenciamento por adição de nucleotídeo (SBS – *Sequencing-by-synthesis*), como por exemplo, o sequenciamento de segunda geração (NGS).

O núcleo central da tecnologia de sequenciamento massivo, utilizado no sequenciamento de segunda geração, é uma adaptação do sequenciamento *shotgun* (VENTER *et al.*, 2003). O sequenciamento NGS lê a amostra de DNA aleatoriamente ao longo do genoma. Isso é conseguido a partir da quebra de todo o genoma em fragmentos menores que são, em seguida, ligados a adaptadores para a leitura durante a síntese.

Uma limitação desta técnica diz respeito ao comprimento dos *reads* gerados pelo NGS. Enquanto o sequenciamento *shotgun* pode gerar sequências de até 1.200 pares de bases, o NGS fornece *reads* com tamanhos variando entre 50-500 pares de bases. Uma maneira de contornar essa limitação é aumentar a cobertura do sequenciamento. A cobertura é definida como o número de *reads* que se sobrepõem dentro de uma região específica do genoma. Assim quando se diz que a cobertura de um determinado gene é de 40 vezes, isso significa que cada nucleotídeo dentro deste gene é representado por pelo menos 40 *reads* sobrepostos uns aos outros (ZHANG *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, o NGS se tornou uma ferramenta genômica revolucionária. Logo após o primeiro genoma humano ser obtido pelo método de sequenciamento de Sanger, outro

genoma humano individual (James D. Watson) foi obtido pela tecnologia de NGS em pouco tempo (WHEELER *et al.*, 2008) e desde então vários outros genomas foram sequenciados (AHN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; LEY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

Várias tecnologias de NGS vêm sendo desenvolvidas, permitindo o sequenciamento de DNA em larga escala. Atualmente existem cinco plataformas de NGS disponíveis que prestam serviço de sequenciamento, incluindo o GS-FLX 454 Genome Sequencer (Roche), o Genome Analyser (Illumina), o ABI SOLiD analyser, Polonator G.007 e a plataforma Helios HeliScope. Cada uma dessas plataformas tem aplicações diferentes e, portanto, apresentam alguns resultados distintos, como o tamanho do *read* obtido, diferentes taxas de erro e diferentes perfis de erro.

1.3 Pirosequenciamento

O pirosequenciamento é uma técnica de sequenciamento não fluorescente que mede a liberação de pirofosfato inorgânico (PPi), o qual é proporcionalmente convertido em luz visível por meio de uma série de reações enzimáticas (RONAGHI *et al.*, 1996; RONAGHI; UHLEN; NYREN, 1998).

Antes de iniciar o pirosequenciamento, a amostra de DNA deve passar por uma preparação específica. Primeiramente, o DNA é fragmentado em pedaços menores, tem as suas fitas desnaturadas e, em seguida, são adicionados adaptadores específicos em cada uma das extremidades. Na plataforma GS-FLX 454 (Roche), a biblioteca de DNA é misturada a uma solução contendo nanoesferas de agarose às quais carregam na sua superfície oligonucleotídeos complementares à sequência de um dos adaptadores adicionados anteriormente. A preparação é feita de maneira que apenas uma molécula de DNA se liga por nanoesfera. Cada complexo fragmento/nanoesfera é isolado em micelas individuais de óleo/água, que contém todos os reagentes de uma PCR comum. A PCR em emulsão das micelas produz milhões de cópias de um mesmo fragmento na superfície de cada nanoesfera (Figura 3).

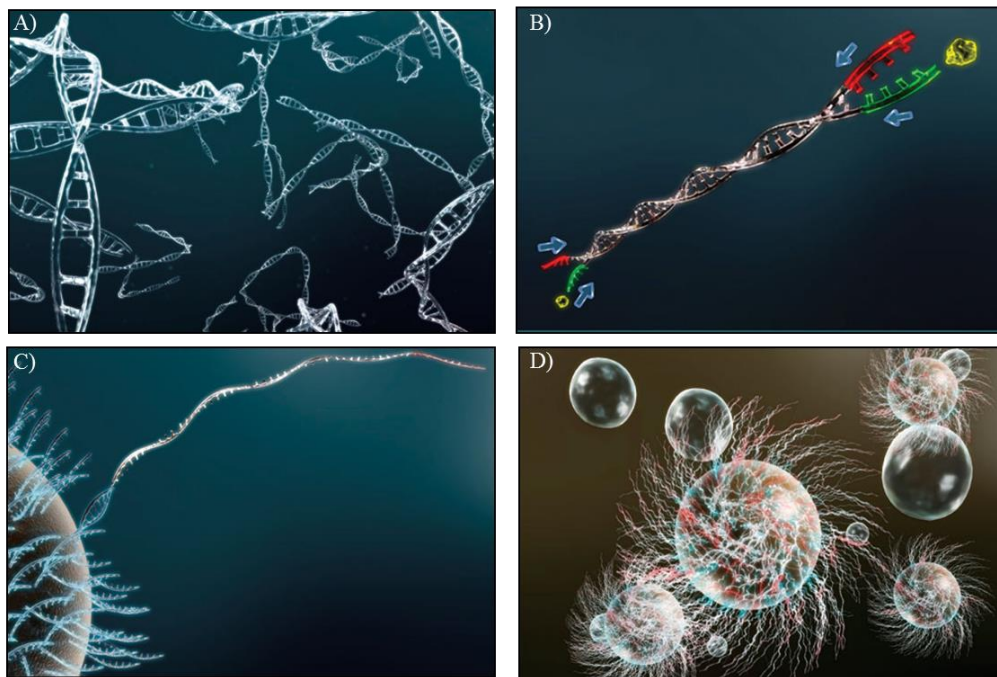


Figura 3. Ilustração das etapas do preparo do DNA e PCR em emulsão realizadas no pirosequenciamento. A) Fragmentação do DNA, B) Ligação de adaptadores e separação da dupla fita, C) Ligação da fita de DNA no oligonucleotídeos das nanoesferas, D) Amplificação das fitas de DNA por PCR em emulsão. Fonte: www.454.com.

As nanoesferas são arranjadas individualmente em cada um dos milhares de poços de uma placa de picotitulação (PTP), fornecendo um local fixo onde a reação de sequenciamento pode ser monitorada. Nanoesferas contendo enzimas que catalisam os passos subsequentes do pirosequenciamento são adicionadas à PTP. A mistura é então centrifugada para que as nanoesferas contendo os fragmentos de DNA se aproximem das nanoesferas contendo as enzimas. A PTP é então levada ao sequenciador onde passa a funcionar como uma célula de fluxo na qual cada dNTP é adicionado por ciclo. O sequenciamento começa a partir da hibridização de um iniciador à fita de DNA. A enzima DNA polimerase inicia a polimerização do ácido nucléico, onde um pirofosfato inorgânico é liberado após a incorporação de cada nucleotídeo. Esse pirofosfato é então convertido a ATP por uma enzima conhecida como ATP sulforilase (APS) e vai fornecer a energia necessária para a enzima luciferase oxidar o substrato luciferina, dando origem à oxiluciferina e um fóton de luz. O fóton de luz é capturado por uma câmera CCD acoplada ao computador do sequenciador. Os primeiros quatro nucleotídeos dos adaptadores ligados aos iniciadores de sequenciamento são sempre TCGA. Isso permite que o programa do computador calibre a luz emitida durante a incorporação de cada um dos nucleotídeos. Da mesma forma, a adição de dNTPs nos ciclos segue a mesma ordem, um dNTP por vez, o que facilita a análise dos dados pelo instrumento

e a atribuição do nome da base em cada posição, gerando um picograma, o qual permite visualizar o sinal emitido em cada ciclo (HENSON; TISCHLER; NING, 2012; MARDIS, 2008; ZHANG *et al.*, 2011) (Figura 4).

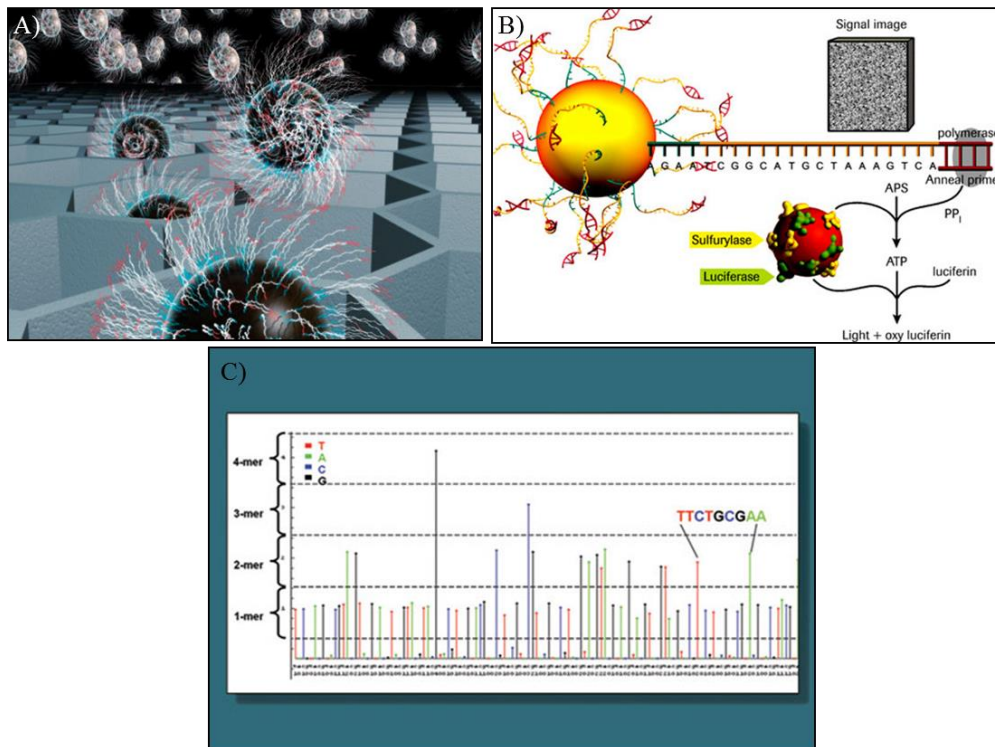


Figura 4. Ilustração das etapas de emissão e detecção do sinal fluorescente durante o pirosequenciamento. A) Distribuição das nanoesferas em PTP, B) Reação de polimerização e emissão de fóton de luz, C) Exemplo de um pirograma. Fonte: www.454.com.

As outras plataformas, incluindo Solexa (Illumina), ABI Solid, Polonator G.007 e Helicos HeliScope, diferentemente do pirosequenciamento, não utilizam a captura de fótons de luz para a determinação da sequência de DNA. Essas técnicas baseiam-se no uso de PCR em emulsão e adição de nucleotídeos marcados com fluoróforos. Também são muito eficientes e geram milhares de *reads*, porém com tamanhos inferiores ao obtido por pirosequenciamento. Dessa forma, o uso dessas técnicas tem sido concentrado, preferencialmente para metodologias de RNAseq. Para o sequenciamento de transcritomas, esta tecnologia é utilizada principalmente quando existe uma biblioteca de referência disponível, que servirá como guia durante a montagem dos *contigs*.

1.4 Tratamento dos dados obtidos por pirosequenciamento

O desenvolvimento da tecnologia de pirosequenciamento permitiu a redução de custos, rapidez e praticidade para sequenciar o genoma de diferentes espécies. Com isso, cada vez mais os grupos de pesquisa optam por utilizar essa metodologia, tanto para o sequenciamento de genomas, quanto para estudo de genômica funcional comparativa (POP e SALZBERG, 2008). Dessa forma uma quantidade muito grande de informação está sendo gerada, exigindo cada vez mais espaço para o armazenamento de dados e o desenvolvimento de processadores que possam analisar os dados com eficiência e rapidez (ZHANG *et al.*, 2011).

Em alguns casos, a obtenção dos dados oriundos do pirosequenciamento é dificultada devido a alguns fatores inerentes a esta tecnologia, como por exemplo, o tamanho dos *reads* obtidos e a dificuldades de sequenciamento de regiões de alta complexidade, frequentemente encontradas no DNA cromossômico. O genoma é composto tanto de genes como de regiões não gênicas, que muitas vezes são ricas em sequências repetitivas, elementos de transposição e pseudogenes, que geralmente são mal resolvidas durante a polimerização ou durante a detecção do sinal luminoso emitido (WICKER *et al.*, 2006). Uma maneira utilizada para evitar os problemas inerentes à composição do genoma é o sequenciamento de sequências expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tags*). Essas sequências são caracterizadas por serem bem menores quando comparadas à sequência completa dos genes, por fazerem parte de uma região que codifica uma proteína e também por serem constituídas apenas por éxons. Uma dificuldade que pode ser imposta pelo uso de ESTs, diz respeito ao momento fisiológico o qual o organismo se encontra. Dependendo das condições do ambiente, dos estímulos feitos e do tecido a ser investigado, pode haver um aumento da expressão de determinados genes, em detrimento da expressão de outros. Isso só será uma dificuldade, se o objetivo do investigador for a identificação de novos genes, o que pode ser contornado a partir da normalização da biblioteca de cDNAs.

Como o pirosequenciamento é uma tecnologia recente, vários programas de computador para análise dos dados estão em processo de desenvolvimento, alguns deles já estão disponíveis na rede mundial. Esses programas terão que encontrar soluções para problemas de diversas categorias: alinhamento dos *reads* utilizando um genoma de referência, montagem *de novo* dos *reads*, testes de qualidade, anotação de sequências, entre outras (ZHANG *et al.*, 2011). Na plataforma GS-FLX 454, as ferramentas mais utilizadas para montagem de novo são CAP3 (HUANG e MADAN, 1999), MIRA (CHEVREUX *et al.*,

2004), Newbler (Roche), Seqman NGen (DNASStar), CLC bio, e a aplicação web Egassembler (MASOUDI-NEJAD *et al.*, 2006).

1.5 Transcritoma de insetos

Os insetos são animais conhecidos pela sua capacidade de adaptação a diversos ambientes e constituem um dos grupos mais diversos em número de espécies, podendo chegar a 75% de todos os metazoários do planeta (GRIMMELIKHUIJZEN *et al.*, 2007). Os insetos são econômica e ecologicamente importantes, pois nesse grupo podem ser encontrados indivíduos tanto prejudiciais quanto benéficos aos seres humanos. Os organismos prejudiciais são aqueles que atuam como pragas da agricultura, causando destruições de até 30% nas lavouras em todo o mundo e os que atuam como vetores de doenças vegetais e animais (RESH e CARDÉ, 2003). Os organismos benéficos são aqueles que ajudam na polinização e proteção das lavouras como, por exemplo, insetos predadores de ovos e larvas, assim como aqueles que proveem materiais de consumo como a seda e o mel (RESH e CARDÉ, 2003).

O sequenciamento do genoma de insetos é algo de grande valor para a comunidade científica, permitindo estudos de genômica funcional, análise comparativa do conteúdo dos genomas e sua organização e também análise de parâmetros como, capacidade de transmitir doenças, comportamento, estudos de evolução, desenvolvimento, entre outros.

O primeiro genoma de inseto a ser publicado foi o de *Drosophila melanogaster*, considerado o inseto modelo mais estudado e o que mais contribuiu para estudos genéticos e de biologia molecular (ADAMS *et al.*, 2000). A abordagem utilizada consistiu no sequenciamento de Sanger e serviu de referência para outros projetos que visaram o sequenciamento do genoma de várias outras espécies. Ao todo, 15 espécies de *Drosophila* já tiveram seus genomas sequenciados. Após esses resultados, os trabalhos focaram em três categorias de insetos: pragas da agricultura tais como, *Tribolium castaneum* (RICHARDS *et al.*, 2008) e *Acyrtosiphon pisum* (RICHARDS; GIBBS; GERARDO, 2010), insetos benéficos tais como, *Apis mellifera* (WEINSTOCK; ROBINSON; GIBBS, 2006), *Nasonia spp.* (WERREN *et al.*, 2010) e *B. mori* (CONSORTIUM, 2008) e vetores de doenças tais como, *Anopheles gambiae* (HOLT *et al.*, 2002), *Aedes aegypti* (NENE *et al.*, 2007), *Culex quinquefasciatus* (ARENSBURGER *et al.*, 2010), *Pediculus humanus* (PITTENDRIGH *et al.*, 2006) e *Rhodnius prolixus*. Com o advento da tecnologia NGS o processo de

sequenciamento foi acelerado e hoje, existem mais de 40 genomas disponíveis em bancos de dados (CHILANA; SHARMA; RAI, 2012).

Com os avanços da aplicação da biologia molecular e de tecnologia genômica na área entomológica na última década, gerou-se muita informação que necessitou de um grande espaço para o armazenamento de dados. Com isso, foram criados diversos bancos de dados de insetos que contém informações de proteínas, processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nesses organismos (CHILANA; SHARMA; RAI, 2012). Recentemente, esforços estão sendo concentrados no desenvolvimento de um banco de dados conhecido como Agripestbase (<http://agripestbase.org/>), que pretende guardar toda a informação genômica de vários insetos-praga. Espera-se que essa ferramenta seja muito útil para o desenvolvimento de novos métodos de manejo de pragas.

O sequenciamento de ESTs representa uma alternativa eficiente ao sequenciamento do genoma completo, provendo informações de expressão de genes em determinadas condições, além de apresentar custos muito menores. Com o uso da tecnologia NGS o número de sequências de DNA de insetos aumentou significativamente. Atualmente existem várias bibliotecas de ESTs de insetos disponíveis no GenBank, totalizando mais de cinco milhões de sequências (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/ - acessado em 08/04/2013).

O uso do pirosequenciamento tem sido utilizado em estudos entomológicos para a identificação de novos genes (HAHN *et al.*, 2009), análise de expressão de genes em tecidos específicos e sob condições fisiológicas específicas (MITTAPALLI *et al.*, 2010), análises de mutação e polimorfismos de sequência (VERA *et al.*, 2008), desenvolvimento de resistência a inseticidas (PENG *et al.*, 2011) e para melhor compreender a interação patógeno-hospedeiro (BAI *et al.*, 2010). Com o aumento da informação disponível, várias oportunidades de análise e aplicação estão surgindo, PAUCHET e colaboradores sequenciaram o transcrito do intestino médio da larva da folha do álamo (*Chrysomela tremulae*) (PAUCHET *et al.*, 2009) e do mandarová-do-fumo (*Manduca sexta*) (PAUCHET *et al.*, 2010) e identificaram genes relacionados a defesa, desenvolvimento e envolvidos na digestão. Alguns desses genes como, por exemplo, para digestão da celulase, encontrado em *Chrysomela*, são de grande interesse para a indústria, pois podem vir a ser utilizados em processos como a produção de etanol de segunda geração.

1.6 Potenciais alvos para o controle de insetos-praga

Dentre os possíveis alvos a serem utilizados para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos-pragas, o intestino médio é um dos alvos mais importantes, uma vez que está envolvido em diversas funções no organismo como, digestão, proteção mecânica e defesa imunológica (PAUCHET *et al.*, 2010). O conhecimento da sua composição gênica pode facilitar a identificação das enzimas que participam do processo de digestão, entender a participação de receptores protéicos no desenvolvimento da resistência de alguns insetos a inseticidas (PIGOTT e ELLAR, 2007), vias de detoxificação (KARATOLOS *et al.*, 2011; MITTAPALLI *et al.*, 2010), interações com microorganismos (BOISSIERE *et al.*, 2012), entre outros. Vários trabalhos sugerem o sistema digestório como um alvo potencial a ser utilizado em programas de manejo de pragas (CHRISTOU *et al.*, 2006; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010; RODRIGUEZ-CABRERA *et al.*, 2010; WHYARD; SINGH; WONG, 2009; ZHU *et al.*, 2011), já que as alterações na atividade e composição enzimática do homogenato intestinal (suco gástrico) e o uso de inibidores de proteases podem modificar o metabolismo do inseto, levando-o a reduzir sua alimentação e causando problemas de desenvolvimento.

1.6.1 Aminopeptidases N

As aminopeptidases N (APNs – EC 3.4.11.2) são enzimas que participam da digestão de proteínas, por meio de clivagem de aminoácidos neutros da região N-terminal de cadeias polipeptídicas (TERRA e FERREIRA, 1994). APNs são classificadas como pertencendo à família de peptidases M1 e possuem um motivo de ligação a zinco HEXXH (onde X representa qualquer aminoácido possível, de acordo com sua carga e tamanho), seguido de um ácido glutâmico conservado 24 aminoácidos após a primeira histidina do sítio HEXXH. Enquanto as histidinas e o último ácido glutâmico constituem a região de ligação ao zinco, o primeiro ácido glutâmico participa no processo de catálise (HOOPER, 1994). Um domínio GAMEN, altamente conservado é encontrado antes do domínio HEXXH e acredita-se que faça parte do sítio catalítico (LAUSTSEN; VANG; KRISTENSEN, 2001). Em humanos, esta enzima é uma proteína integral de membrana e está conectada à superfície externa da célula por meio de uma haste na região N-terminal (SEMENZA, 1986). Em insetos, as APNs apresentam um peptídeo sinal que dirige a molécula para a face externa da membrana celular

onde é conectada através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), localizada na região C-terminal (LU e ADANG, 1996).

Além de sua importância na digestão de proteínas e liberação de aminoácidos para o metabolismo celular, as APNs têm sido estudadas em humanos como possíveis receptores de vírus (LUAN e XU, 2007). Em estudos entomológicos, as aminopeptidases, junto com as caderinas e fosfatases alcalinas, constituem um grupo de proteínas que provavelmente atuam como receptores de toxinas Cry e são de grande interesse para a compreensão do mecanismo de ação dessas toxinas sobre o organismo dos insetos (PIGOTT e ELLAR, 2007). A identificação de receptores de proteínas Cry pode ser uma estratégia que permitirá o desenvolvimento de moléculas com toxicidade maior e específica para o inseto alvo.

No presente trabalho foi realizado o sequenciamento do transcrito da broca-gigante da cana-de-açúcar. Esse estudo permitiu obter uma grande quantidade de sequências de DNA expressas em diferentes fases do ciclo de vida do inseto, assim como identificar genes envolvidos em processos vitais do organismo como, por exemplo, a digestão. Além disso, foi possível isolar e caracterizar genes que codificam a síntese da enzima aminopeptidase, possivelmente relacionada com o mecanismo de ação de toxinas Cry em insetos.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos insetos e extração de RNA

Os insetos utilizados neste trabalho foram gentilmente coletados diretamente de canaviais infestados com broca-gigante pelo Sr. Luiz Avelar Brandão, chefe de equipe de pesquisa da usina Triunfo, localizada em Boca da Mata - Alagoas. As lagartas de último estágio de desenvolvimento, pré-pupas e as pupas foram coletadas manualmente do interior de plantas de cana-de-açúcar. As mariposas foram coletadas com rede entomológica e as fêmeas separadas em gaiolas para a oviposição. Os ovos foram coletados e mantidos a 28 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 : 12 (C : E) até a eclosão. As larvas neonatas foram individualizadas e alimentadas com pedaços de colmo de cana até o momento de sua utilização.

Foram coletadas formas biológicas de cada fase do ciclo de vida: ovos, larvas neonatas, larvas de último ínstar, pré-pupa, pupa e adultos (fêmeas e machos), que foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até o uso.

Para a extração do RNA total, os insetos imersos em nitrogênio líquido foram pulverizados em almofariz com auxílio de pistilo. O RNA total de ovos, larvas e pré-pupas foi extraído diretamente utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Para a extração do RNA total das pupas e dos adultos foi necessária uma adaptação do protocolo onde, após a adição do TRIZOL e de β -mercaptoetanol, as amostras foram purificadas por meio de centrifugação a $4.000 \times g$ por 60 segundos utilizando-se a primeira coluna (RNeasy MinElute spin column) do Kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) para a limpeza dos restos de exoesqueleto e das escamas das asas, que deixam a amostra muito suja, e em seguida continuou-se com a extração do RNA utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Todo o RNA extraído foi tratado com 2 U de DNase I (Ambion, Life Technologies) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com as sugestões do fabricante. Após o tratamento, a qualidade da extração e a integridade do RNA foram conferidas em gel de agarose 1%. O RNA teve a sua concentração determinada pelo fluorômetro Qubit, utilizando o Kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies). Foi preparada uma mistura com quantidade equimolar do RNA total de cada fase do ciclo de vida do inseto e um total de $30 \mu g$ foi enviado para a empresa Eurofins MWG Operon, em Huntsville, AL, USA (<http://www.eurofinsdna.com/>) para realização da síntese de cDNA e do pirosequenciamento.

2.2 Obtenção da biblioteca de cDNA e pirosequenciamento

O RNA total foi analisado em um Agilent 2100 Bioanalyzer antes da purificação de RNA mensageiro (mRNA). Para obtenção da biblioteca, o cDNA foi sintetizado partindo-se de uma mistura de quantidades equimolares de RNA total de cada fase do inseto, em uma reação de transcrição reversa utilizando iniciadores randômicos. A síntese foi seguida da ligação dos adaptadores 454 A e B (Roche 454 Life Technologies) nas extremidades 5' e 3' do cDNA, respectivamente. O cDNA foi amplificado utilizando uma enzima que apresenta mecanismo de verificação (*proof-reading*) e o produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de sequências de nucleotídeos variaram em tamanho, de menos de 100 pb até cerca de 5.000 pb e foram processados por *shotgun*. A biblioteca foi normalizada para reduzir a probabilidade de sequenciar apenas os transcritos mais abundantes (ZHULIDOV *et al.*, 2004). A normalização foi feita por um ciclo de desnaturação e reassociação lenta do cDNA, de acordo com (ZHULIDOV *et al.*, 2004). Moléculas de cDNA fita dupla reassociadas foram separadas das moléculas normalizadas de fita simples utilizando uma coluna de hidroxiapatita (FADROSH; ANDREWS-PFANNKUCH; WILLIAMSON, 2011). A biblioteca de cDNA normalizada foi amplificada por oito ciclos de PCR de acordo com o protocolo utilizado pela empresa. Após purificação e análise em gel de agarose, o cDNA normalizado foi submetido ao pirosequenciamento 454 utilizando tecnologia GS FLX Titanium, de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante (Roche 454 Life Technologies), em uma corrida de meia placa.

2.3 Pré-processamento das sequências

As sequências provenientes do pirosequenciamento (*reads*) foram enviadas pela empresa em formato *standard flow files* (.sff). Antes das etapas de montagem dos *contigs*, foi feito um pré-processamento seguindo o *pipeline* da ferramenta de bioinformática *est2assembly* versão 1.03 (PAPANICOLAOU *et al.*, 2009). Nesta etapa foram removidas as sequências de baixa qualidade, os adaptadores 454 e as extremidades poli-A+. Além disso, sequências contaminantes como, por exemplo, DNA de procariotos, vírus e mitocondrial foram removidas após análise por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências serão depositadas no repositório SRA do National Center for Biotechnology Information (NCBI), assim que o processo de proteção intelectual deste trabalho tenha sido finalizado.

2.4 Montagem, anotação e ontologia gênica (GO)

As sequências contíguas (*contigs*) foram montadas utilizando o software MIRA v3.3.0.1 (CHEVREUX *et al.*, 2004) utilizando os parâmetros sugeridos pelo programa.

As buscas por homologia (BLASTx e BLASTn) de sequências únicas e a anotação funcional por termos de ontologia gênica (GO; www.geneontology.org), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>), códigos de classificação enzimática (EC) e vias metabólicas (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) foram determinadas pela ferramenta Blast2GO *software suite* v2.4.3 (www.blast2go.org). As buscas por homologia foram realizadas de forma remota no servidor NCBI utilizando QBLAST. As sequências foram submetidas a alinhamentos contra o banco de dados não redundante (nr) de proteínas do NCBI via BLASTx, utilizando um limite de *e-value* de 10^{-8} , para garantir a obtenção de uma biblioteca de alta representatividade, e selecionando as proteínas preditas contendo um mínimo de 20 resíduos de aminoácidos. Para o mapeamento da ontologia, o programa busca os termos GO associados com as homologias identificadas com QBLAST e retorna uma lista de anotações de GO representadas como categorias hierárquicas com especificidade crescente. Blast2GO permite uma seleção de nível de significância para uma taxa de falsos positivos (*False Discovery Rate* - FDR) que foi usada com um limite de 0,05% de nível de probabilidade. Os termos de GO foram modulados com a ferramenta de melhoramento de anotação (ANNEX), seguido da ferramenta GOSlim genérico disponível no Blast2GO (*goslim_generic.obo*). GOSlim é um *subset* de vocabulário de ontologia gênica. Gráficos combinados foram construídos no nível 2 das categorias Processo Biológico (*Biological Process*), Componente Celular (*Cellular Component*) e Função Molecular (*Molecular Function*). Os códigos de classificação enzimática e as anotações das vias metabólicas KEGG foram gerados do mapeamento direto dos termos de GO com os seus códigos enzimáticos equivalentes. As buscas por domínios protéicos no banco de dados InterPro foram realizadas remotamente a partir do Blast2GO no servidor web InterProEBI. As configurações padrões do Blast2GO foram utilizadas em todos os passos da anotação.

2.5 Comparação da biblioteca de *Telchin licus licus* contra sequências de *Manduca sexta*

As sequências da biblioteca de cDNA obtida para *T. licus licus* foram comparadas contra sequências de proteínas do intestino médio de *M. sexta*, extraídas do banco de dados

InsectaCentral através de BLASTx (PAPANICOLAOU *et al.*, 2008). Somente as sequências que apresentaram similaridade igual ou acima do limite de *e-value* de 10^{-3} foram utilizadas para as análises. O resultado obtido pelo BLAST foi organizado de acordo com os termos InterPro, e a distribuição dos domínios mais frequentes foi listada.

2.6 Sequenciamento do gene da aminopeptidase N1

Após a busca por sequências de proteínas da classe aminopeptidase N no banco de dados de *T. licus licus*, foram identificados três *contigs* que correspondem a três genes distintos, os quais dois apresentaram a sequência completa e o terceiro não apresentou a região N-terminal.

A sequência completa do gene que codifica a enzima aminopeptidase N1 (APN1) foi obtida por meio de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (FROHMAN, 1990). Larvas neonatas de *T. licus licus* foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas em almofariz com auxílio de pistilo. Foi realizada a extração de RNA total utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de RNA total foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para análise da qualidade e integridade da amostra.

A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Life Sciences). Após tratamento com DNaseI (Ambion Life Technologies), 5 µg de RNA total foram utilizados para síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies) e um iniciador-1 (5'- AACGCGCTGCTTGTAGAAAT - 3'). Em uma reação independente, foi realizada a adição de uma cauda terminal 3' hydroxyl ao cDNA, utilizando a enzima terminal transferase (New England BioLabs). Todos os experimentos acima citados foram realizados de acordo com o protocolo dos fabricantes. A amplificação do fragmento de DNA foi realizada em duas séries de PCR. Na primeira série, a reação foi realizada utilizando 5 µL do cDNA obtido na reação anterior, tampão de PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, iniciador oligo-dT₃₀ 0,2 µM; iniciador-2 (5'- GCCGCCTGTTTCATATTCAT -3') 0,2 µM; 0,1 unidades de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e água bidestilada para um volume final de 20 µL. As condições da reação foram: 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C for 1 minuto, uma etapa final de 72 °C for 5 minutos. Na segunda série, a reação foi realizada utilizando 1 µL (1:20) do produto de DNA da primeira série, tampão de PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTP 0,2 mM, iniciador âncora 0,2 µM, iniciador-3 (5'-

ATGGTGGGACTGAAATCTGC -3') 0,2 µM; 0,1 unidades de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e água bidestilada para um volume final de 20 µL. As condições da reação foram exatamente as mesmas citadas acima, realizadas na primeira série.

Todo o volume da reação foi aplicado em gel de agarose 1% e submetido à eletroforese. Os fragmentos de DNA foram coletados do gel sob luz UV e purificados usando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, os fragmentos de DNA foram clonados no vetor PCR 2.1 (Invitrogen Life Technologies). Após a transformação de células de *E. coli* OMNIMAX termocompetentes (Invitrogen Life Technologies) e a extração do DNA plasmidial por lise alcalina (AHN *et al.*, 2000) foi realizado o sequenciamento dos insertos utilizando os iniciadores M13 senso e M13 antisense em um sequenciador ABI377 (Applied Biosystems, Life Technologies).

2.7 Análise das sequências de aminopeptidases

As sequências de aminoácidos das aminopeptidases foram obtidas por meio de tradução *in silico* utilizando a ferramenta virtual TrEMBL (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) (ARTIMO *et al.*, 2012). A predição de peptídeo sinal, massa molecular e ponto isoelétrico foram obtidos utilizando, respectivamente, SignalP 4.1 and Compute pI/MW, disponíveis no sítio ExPaSy: SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org/tools/>). O sinal de ligação da âncora GPI foi predito usando a ferramenta virtual PredGPI (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/gpipe/index.htm>) (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008).

As sequências foram alinhadas usando ClustalW2 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e editadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). As análises filogenéticas foram realizadas pelo programa MEGA v.5 utilizando-se o método *neighbor-joining*, com análise de *bootstrap* para 10.000 replicatas e distância evolutiva calculada pelo método *p-distance* (TAMURA *et al.*, 2011).

3. Resultados e Discussão

3.1 Extração de RNA total

As amostras de RNA total de todas as fases do ciclo de vida do inseto apresentaram boa qualidade e integridade quando submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 5). A extração de RNA total dos ovos foi realizada à temperatura ambiente devido a presença de gordura nas amostras, que se solidificava quando a extração era realizada a 4 °C, impedindo a separação das fases aquosas. A purificação das amostras de pupa e adultos utilizando a coluna do Kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) foi necessária devido a resquícios de exoesqueleto e escamas das asas das mariposas, que contaminam a amostra e podem prejudicar as reações enzimáticas subsequentes.

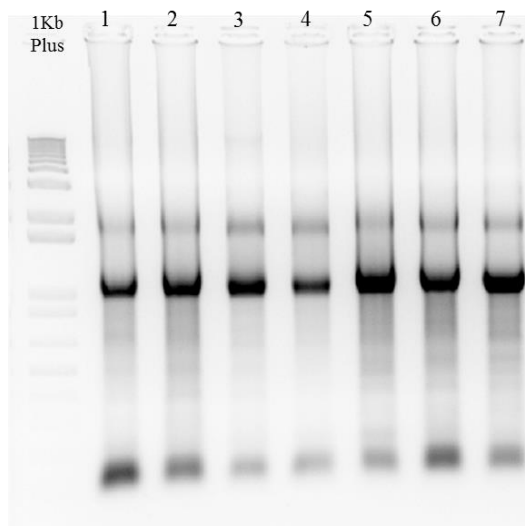


Figura 5. Análise da extração de RNA total de cada fase do ciclo de vida de *T. licus licus* após eletroforese em gel de agarose 1%. 1) ovo, 2) larva neonata, 3) larva de último instar, 4) pré-pupa, 5) pupa, 6) macho, 7) fêmea.

O rastro de RNA total observado no gel de agarose, apresentando bandas bem definidas, representa o perfil padrão de RNA total de insetos. Essas bandas correspondem aos RNAs das subunidades ribossomais e não à degradação do ácido nucléico (WINNEBECK; MILLAR; WARMAN, 2010). Além disso, visando determinar a qualidade e integridade do RNA, foi realizada análise por meio de BioAnalyzer (Agilent). Nos resultados aqui apresentados essa análise foi feita pela empresa Eurofins MWG Operon (www.eurofinsdna.com). O número de integridade do RNA (RIN – *RNA Integrity Number*) para a amostra foi de 8,8. De acordo com o protocolo adotado pela empresa, é aconselhável

para obtenção de bibliotecas de cDNA, que o RIN esteja acima de 8,0. Portanto a amostra enviada apresentou qualidade suficiente para a realização do pirosequenciamento.

3.2 Pirosequenciamento e pré-processamento

Da biblioteca de cDNA submetida ao pirosequenciamento, utilizando uma corrida com meia-placa na plataforma 454 GS FLX Titanium (Roche), foram obtidos 381.273.406 pares de bases, gerando 653.511 *reads* (Tabela 1). Este número pode ser considerado muito bom, uma vez que uma corrida com placa completa tinha capacidade de gerar 1.200.000 *reads*. Após o pré-processamento, 362.412 *reads* de alta qualidade foram utilizados para montagem dos *contigs*. Esse número de *reads* após o pré-processamento é o primeiro indicador de validação da qualidade do RNA e da biblioteca de cDNA. A diferença observada no número de *reads* antes e após o pré-processamento refletiu a alta estringência utilizada no pré-processamento, o que reduziu bastante a quantidade de *reads* utilizados para a montagem dos *contigs*. Os *reads* que não foram utilizados para a montagem dos *contigs* apresentaram má qualidade de sequenciamento ou insuficiência de cobertura.

3.3 Montagem e anotação do transcrito

A partir dos 362.412 *reads* obtidos pelo pirosequenciamento, 23.942 *contigs* foram montados (Tabela 1). O tamanho médio dos *contigs* foi de 633 pb, sendo que a maioria se encontra entre 250 e 750 pb. A média de cobertura de um *read* por *contig* foi de 8,5; considerada eficiente para transcritomas de organismos não modelos e que não possuem um banco de dados de referência para alinhamento das sequências.

A busca por similaridade, utilizando BLASTx e o banco de dados nr indicou que 6.332 *contigs* tiveram pelo menos um *hit*, sendo que o restante representam sequências desconhecidas ou que não possuem anotação no banco de dados (Tabela 1). Os *contigs* da biblioteca apresentaram um resultado de BLASTx significativo com um limite de $e\text{-value} \leq 10^{-8}$ (Figura 6). *Contigs* com $e\text{-value}$ igual 0 foram representados no limite direito do gráfico, para não ficarem de fora da escala. Para determinar a cobertura da biblioteca, os *contigs* foram agrupados de acordo com as similaridades mais frequentes com sequências de diversos organismos do banco de dados não redundante. A maioria das sequências apresentou alta similaridade com sequências de proteínas de insetos, principalmente *Diptera* (39%), *Hymenoptera* (16%), *Coleoptera* (8%) e *Lepidoptera* (8%) (Figura 7). Apesar das diferenças marcantes entre os grupos de espécies, os resultados observados refletem principalmente a influência de uma grande quantidade de sequências depositadas para essas espécies no

GenBank, o que acaba induzindo o agrupamento com as mesmas. Quando realizada a comparação da biblioteca contra sequências que tiveram os *hits* com melhores valores de *e-value*, observou-se uma identidade com maior frequência com sequências de *Bombyx mori*, único lepidóptero que possui o genoma sequenciado sendo, portanto, considerado organismo modelo para os insetos da ordem *Lepidoptera* (Figura 8).

Tabela 1. Sumário da análise do transcrito de *T. licus licus*.

Número de <i>reads</i> antes do pré-processamento	653.511
Número de bases antes do pré-processamento	381.273.406
Tamanho médio dos <i>reads</i> antes do pré-processamento	583
Número de <i>reads</i> após pré-processamento	362.412
Número de bases após pré-processamento	140.286.056
Tamanho médio dos <i>reads</i> após pré-processamento	387
Número de <i>contigs</i>	23.942
Número de bases nos <i>contigs</i> (pb)	15.166.298
Tamanho médio dos <i>contigs</i> (pb)	633
Tamanho mínimo dos <i>contigs</i> (pb)	190
Tamanho máximo dos <i>contigs</i> (pb)	5.527
Cobertura dos <i>reads</i> por <i>contig</i>	8,5
% de <i>contigs</i> com pelo menos 1 termo de GO	18
% de <i>contigs</i> com pelo menos 1 termo de IPR	16
Número de <i>contigs</i> com pelo menos 1 BLAST <i>hit</i> contra o banco nr	6.332

Legenda: pb (pares de base), GO (*gene ontology*) IPR (banco de dados InterPro), nr (banco de dados não redundante).

Como a maioria dos estágios do ciclo de vida da broca-gigante foram coletados diretamente do campo e o RNA total extraído de todo o corpo do animal, não foi possível remover o conteúdo presente no intestino médio, deixando a possibilidade da presença de parasitas e microrganismos, assim como tecidos vegetais derivados da dieta do inseto. Na figura 8 foram observados vários agrupamentos de sequências com sequências de proteínas de espécies que não são insetos como: *Branchiostoma floridae*, *Hydra magnipapillata*, *Saccoglossus kowalevskii*, e *Picea sitchensis*. Apesar de não haver nenhuma relação

ecológica conhecida entre as três primeiras espécies e *T. licus licus*, uma análise mais detalhada das sequências indicou que a maioria dos resultados de BLAST apresenta similaridades com sequências de proteínas hipotéticas, não sendo possível a anotação da função das mesmas. Ao buscar na literatura qual a relevância desses organismos de uma forma geral, descobriu-se que todos eles possuem o genoma sequenciado (CHAPMAN *et al.*, 2010; PUTNAM *et al.*, 2008) e que, novamente, o grande número de sequências para essas espécies sobrepõem a identificação de similaridades de sequências contra espécies de insetos pouco representados no GenBank. A falta de anotação do genoma desses organismos dificulta determinar se o agrupamento de sequências de *T. licus licus* contra essas espécies também é observado para as demais espécies apresentadas na figura 8.

As similaridades encontradas entre as sequências da biblioteca de *T. licus licus* e as sequências de *P. sitchensis*, uma árvore da família *Pinaceae*, poderiam sugerir que as amostras de RNA foram contaminadas com RNAs de plantas, porém todos os resultados de BLASTx obtidos classificaram as sequências como desconhecidas (*unknown sequences*). Como isso não exclui a possibilidade de contaminação buscou-se no banco de dados por proteínas de outras espécies vegetais. Foram encontradas algumas sequências com similaridade a proteínas de *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Arabidopsis spp.* e *Vitis vinífera*, porém a maioria delas é de origem de elementos transponíveis ou de sequências altamente conservadas entre organismos eucariotos. Nenhuma similaridade com sequências de ESTs de cana-de-açúcar foi encontrada, o que pode indicar que a biblioteca sofreu efeitos mínimos de contaminação.

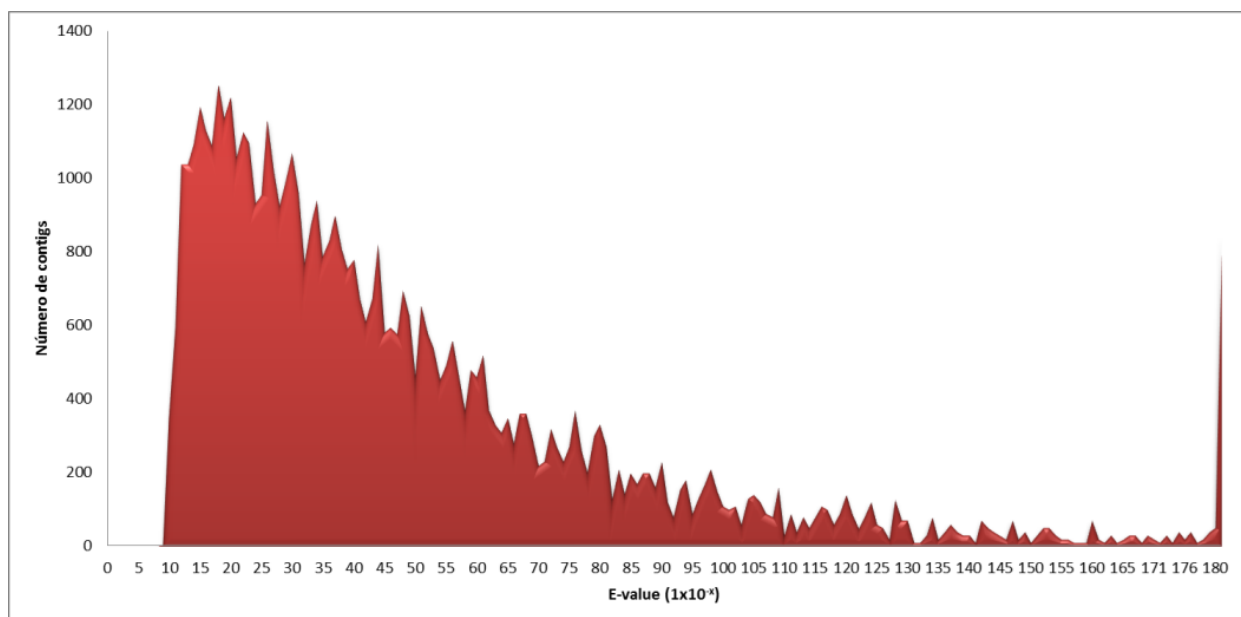


Figura 6. Valores de *e-value* para os principais *hits* de BLASTx para cada *contig* do transcriptoma de *T. licus licus*. *Hits* com *e-value* igual a 0 estão representados em um pico no lado direito do gráfico.

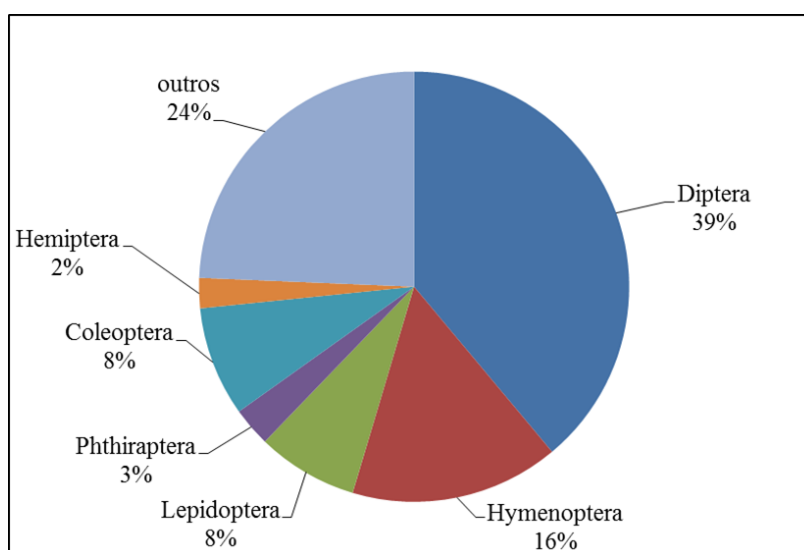


Figura 7. Comparação do transcriptoma de *T. licus licus* com sequências de proteínas presentes no banco de dados não redundante. Os dados mostram que a biblioteca é bem representativa e apresentou frequência de similaridade de 76% com proteínas de insetos.

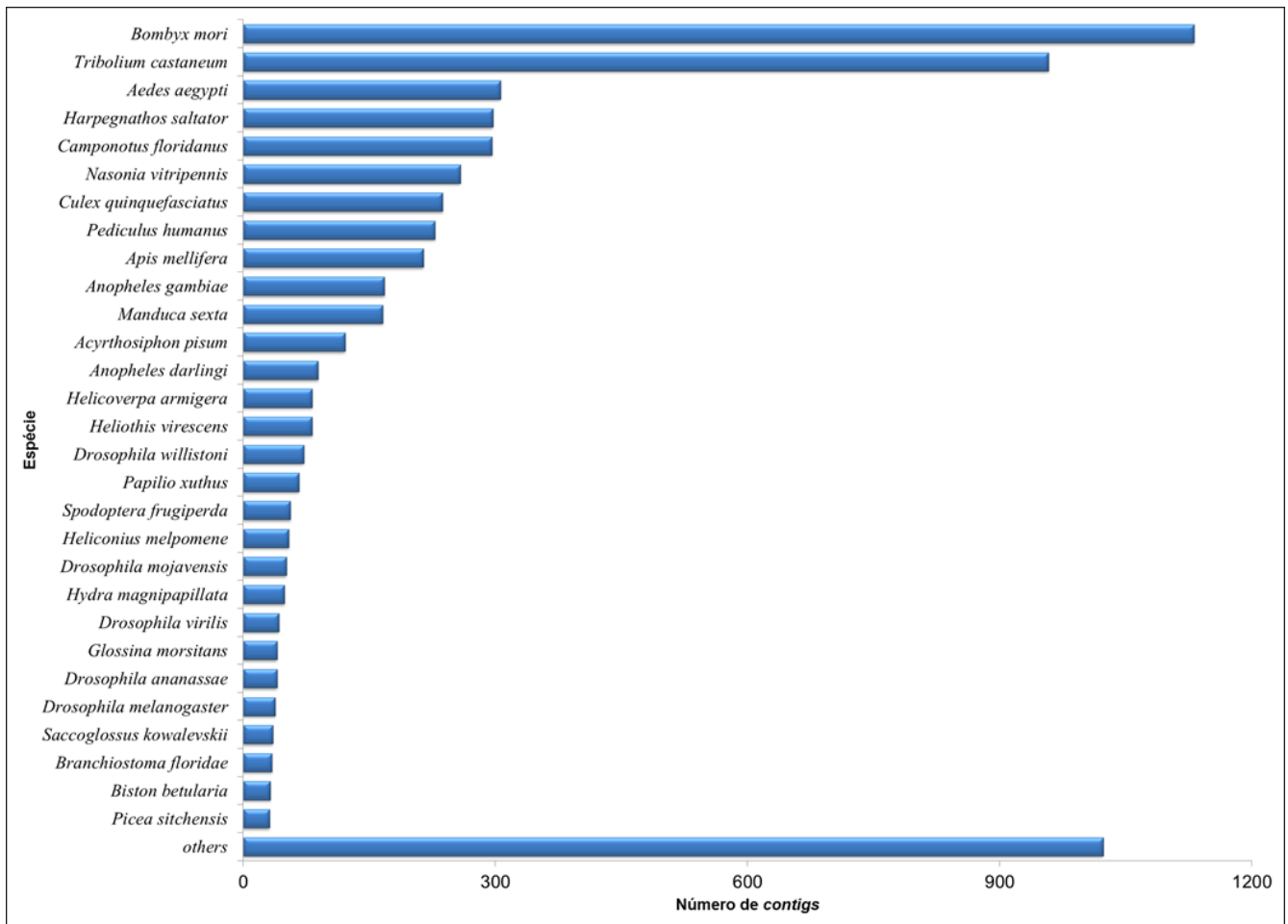


Figura 8. Comparação dos principais BLAST hits dos contigs do transcrito de *T. licus licus* com sequências de proteínas presentes no banco de dados nr. Os contigs com melhor *e-value* apresentaram similaridade maior com proteínas de *B. mori*.

3.4 Ontologia gênica e classificação por domínios protéicos

Para classificar a função dos contigs do transcrito de *T. licus licus* foi realizada uma análise de ontologia gênica associada aos dados de InterPro, utilizando o Blast2GO (CONESA e GOTZ, 2008; CONESA *et al.*, 2005). Os termos hierárquicos foram obtidos para o nível 2, que produziu os gráficos menos carregados, mas ainda assim bastante informativos. Na classificação por processos biológicos houve uma predominância clara para os termos metabolismo (29%) e processos celulares (29%) (Figura 9A). Na classificação por Função Molecular, a maioria dos contigs está envolvida com atividade catalítica (39%) e ligação (*binding*) (38%) (Figura 9B). Para a classificação por Componentes Celulares, houve uma predição maior de contigs envolvidos com estruturas celulares (42%) (Figura 9C). Padrões similares foram obtidos após o pirosequenciamento de transcritomas de outras

espécies de insetos e mostram que a cobertura e a classificação das sequências obtidas para o transcriptoma de *T. licus licus* estão de acordo com a literatura (BAI *et al.*, 2011; BASS; HEBSGAARD; HUGHES, 2012; EWEN-CAMPEN *et al.*, 2011; HAHN *et al.*, 2009; KARATOLOS *et al.*, 2011; MITTAPALLI *et al.*, 2010).

O banco de dados InterPro foi utilizado para uma melhor classificação das funções das proteínas da biblioteca de *T. licus licus*. De um total de 23.942 *contigs*, 16% apresentou classificação por InterPro (Tabela 1). As classificações mais frequentes estão listadas na tabela 2. A partir do sequenciamento de genes de todas as partes do corpo das diferentes fases do ciclo de vida do inseto, as proteínas mais frequentes foram as relacionadas com a formação da cutícula, domínio de ligação a NAD(P) e citocromo P450. Diversas outras proteínas envolvidas com a digestão também foram encontradas, tais como, peptidases, quimotripsinas, tripsinas, carboxipeptidases e lipases.

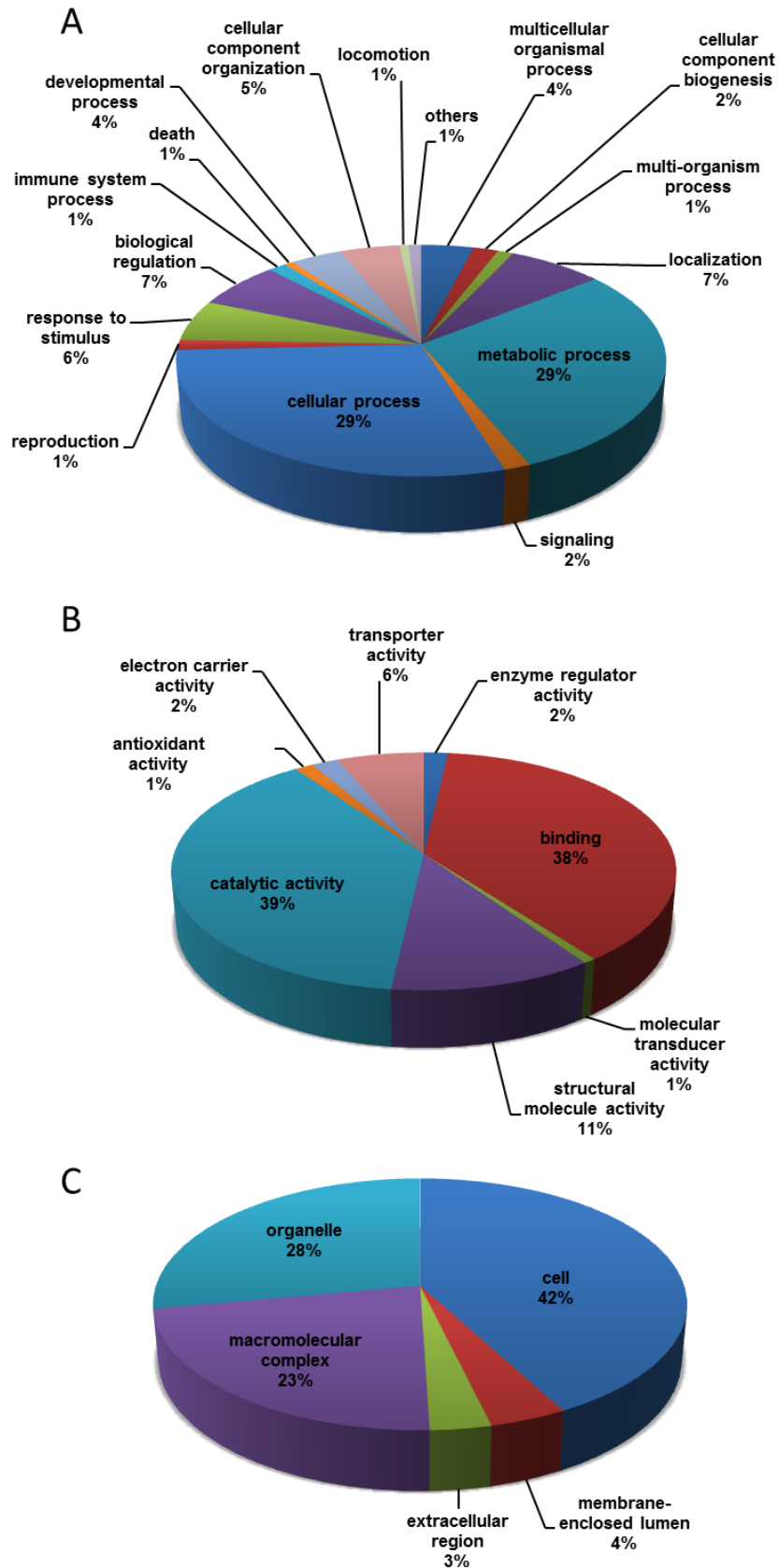


Figura 9. Classificação de ontologia gênica (GO) para os *contigs* do transcriptoma de *T. licus licus*. Os termos foram classificados nos nível 2 nas categorias (A) Processo Biológico, (B) Função Molecular e (C) Componente Celular, respectivamente. A porcentagem de *contigs* em cada termo está representada.

Tabela 2. Sumário dos 25 principais domínios de proteínas encontrados no transcrito de *T. licus licus*.

InterPro	Frequência	Descrição
IPR000618	292	Insect cuticle protein
IPR016040	264	NAD(P)-binding domain
IPR001128	252	Cytochrome P450
IPR001254	218	Peptidase S1/S6, chymotrypsin/Hap
IPR002198	209	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
IPR015880	206	Zinc finger, C2H2-like
IPR007087	162	Zinc finger, C2H2-type
IPR002347	153	Glucose/ribitol dehydrogenase
IPR001680	144	WD40 repeat
IPR019781	143	WD40 repeat, subgroup
IPR009003	142	Serine/cysteine peptidase, trypsin-like
IPR000215	137	Protease inhibitor I4, serpin
IPR002557	132	Chitin binding protein, peritrophin-A
IPR000504	126	RNA recognition motif, RNP-1
IPR001395	105	Aldo/keto reductase
IPR002018	92	Carboxylesterase, type B
IPR000834	86	Peptidase M14, carboxypeptidase A
IPR000734	84	Lipase
IPR001251	83	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, C-terminal
IPR000217	81	Tubulin
IPR001314	79	Peptidase S1A, chymotrypsin
IPR016196	73	Major facilitator superfamily, general substrate transporter
IPR005055	71	Insect pheromone-binding protein A10/OS-D
IPR012677	71	Nucleotide-binding, alpha-beta plait
IPR011046	69	WD40 repeat-like-containing domain

3.5 Análise de sequências possivelmente expressas no intestino de *T. licus licus*

O intestino dos insetos é um órgão responsável pela digestão, mas que também tem grande participação na detoxificação e em processos imunológicos. Visando identificar proteínas provavelmente expressas especificamente no intestino médio de *T. licus licus*, a biblioteca de ESTs da broca-gigante foi comparada com as sequências de ESTs do intestino de *M. sexta*, obtidos do banco de dados InsectaCentral. Essa espécie foi escolhida devido à quantidade de informação disponível em bancos de dados de acesso público e por apresentar bibliotecas de ESTs de diferentes órgãos e tecidos. Após BLASTx, 6.473 sequências apresentaram similaridade contra a biblioteca de ESTs de *M. sexta* com *e-value* acima do limite de 10^{-3} . Os domínios de InterPro mais frequentes foram de proteínas relacionadas com o metabolismo celular, digestão e detoxificação (Tabela 3). A presença de proteínas da

cutícula de insetos é um resultado intrigante e poderia indicar a presença de contaminantes de outros tecidos na biblioteca de *M. sexta*, porém tais proteínas já tinham sido identificadas em *Anopheles gambiae* e *Bombyx mori* e, provavelmente, estão envolvidas com o desenvolvimento do intestino (WARR *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2012). Além disso, a classificação da função dos resultados de BLAST contra a biblioteca de *M. sexta* foi realizada a partir do agrupamento dos *contigs* com função predita para proteínas digestivas. Com isso foi possível estimar o número de unigenes que codificam proteínas digestivas presentes no transcrito de *T. licus licus* e quantas delas não apresentaram similaridade alguma com proteínas digestivas de *M. sexta* (Tabela 4). Foram encontrados 120 *contigs* de proteases serínicas sendo que 96 deles apresentaram similaridade com sequências de *M. sexta*, correspondendo a 59 unigenes. Classificações semelhantes podem ser observadas para outras proteases, muitas delas estão bem representadas no banco de dados de *M. sexta*. Para aminopeptidase N foram identificados 16 *contigs* na biblioteca de ESTs de *T. licus licus*, mas após BLAST com as sequências de *M. sexta* dois outros *contigs* foram identificados. A anotação desses dois *contigs* não foi obtida anteriormente pois, além de apresentarem um tamanho muito reduzido, também não continham regiões de domínios, o que dificulta a classificação por grupos de proteínas (Tabela 4). Os *contigs* relacionados a aminopeptidases N foram selecionados para estudos mais detalhados.

Tabela 3. Sumário dos principais domínios de proteínas encontrados após BLASTx contra proteínas de *M. sexta*.

InterPro	Frequência	Descrição
IPR016040	139	NAD(P)-binding domain
IPR001254	116	Peptidase S1/S6, chymotrypsin/Hap
IPR001314	100	Peptidase S1A, chymotrypsin
IPR009003	96	Serine/cysteine peptidase, trypsin-like
IPR016196	88	Major facilitator superfamily, general substrate transporter
IPR000618	77	Insect cuticle protein
IPR002198	72	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
IPR011009	71	Protein kinase-like domain
IPR002347	67	Glucose/ribitol dehydrogenase
IPR012336	66	Thioredoxin-like fold
IPR001128	59	Cytochrome P450
IPR015943	59	WD40/YVTN repeat-like-containing domain
IPR011046	57	WD40 repeat-like-containing domain
IPR012335	55	Thioredoxin fold
IPR013781	54	Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core
IPR017853	54	Glycoside hydrolase, catalytic core
IPR000504	53	RNA recognition motif, RNP-1
IPR012677	53	Nucleotide-binding, alpha-beta plait
IPR011701	48	Major facilitator superfamily MFS-1
IPR017442	48	Serine/threonine-protein kinase-like domain
IPR017973	47	Cytochrome P450, C-terminal
IPR019781	47	WD40 repeat, subgroup
IPR002018	46	Carboxylesterase, type B
IPR000834	43	Peptidase M14, carboxypeptidase A

Tabela 4. Sumário das principais proteínas digestivas do transcriptoma de *T. licus licus* encontradas no transcriptoma e sua correspondência com enzimas de *M. sexta*.

Classificação	InterPro	Número de contigs	Número de contigs x <i>Manduca sexta</i> (unigenes)
Serine protease	IPR009003/IPR001314	120	96 (59)
Cystein protease	IPR015643	17	3 (2)
Carboxypeptidase	IPR000834	31	33 (18)
Aminopeptidase	IPR001930	16	18 (11)
Dipeptidase	IPR005320/IPR007865/IPR001548	10	10 (4)
α -amylase	IPR006047	15	9 (4)
α -glucosidase	IPR000322	6	5 (4)
β -glucosidase	IPR001360	13	13 (13)
β -galactosidase	IPR001944	2	3 (2)
Trehalase	IPR001661	2	2 (1)
Lipase	IPR006693/IPR000734/IPR013818/IPR002331	39	41 (16)

3.6 Aminopeptidases N

Foi realizada uma busca por sequências de APNs no transcrito de *T. licus licus* e após procura por similaridades contra sequências de proteínas de *M. sexta* foram encontrados 18 *contigs* de aminopeptidases de diferentes classes. Dois *contigs* apresentaram a sequência completa de duas APNs (APN3 e APN4) e um terceiro *contig* (APN1) faltava a região N-terminal, que foi resolvida por meio de 5'-RACE. Todas as sequências codificam proteínas de aproximadamente 1.000 aminoácidos. Sítios de ancoragem de GPI, assim como um peptídeo sinal de 20 aminoácidos foram identificados em todas as proteínas. O alinhamento entre as sequências mostrou que os motivos HEXXH(X)₂₄ e GAMEN são conservados (Figura 10).

```

APN1  MIVPWFYFLGVALIQGTFSINPIVVPD-EEWEDFQRLMRDP-----AYRLPTTLPLTHYEVTLTPYFDTEETNQKSFDFDGEVTIYISPTEE 87
APN3  MAALKLAVLAAACLCTRVFSQEIPSLRS-SIFGDELIMENVVTSEITALNDYRNYRLPTTTKPKHYTVLWGDIDFD-----TFVFGGTVEIDLVAEQE 92
APN4  MGSKMLLPAPFLTLTLLIGLTAAPSNEFRSNLEFLEYDTNLDLP-----AYRLLDNVQPTYFNLDLDVYLS-----ESRFDGLVQIQVNVNEE 81

APN1  NLKEIVMHCNDLTIESVSVLHETETGIEEKG---ESNENATCEMPYSFLRINTKEELQLEEEYIVKISFKGNLQTNMRGFYRSWYYD-FTGKR-WMGTQ 182
APN3  NVNKIVIHNSNDLVIENLQKRKRTSD-ITVNGTLVPLDHFYEVELESGLFDYDPEDESP---VYTLILNFEAPMRTDMYGIYRSWFRNNYTDEVSWMATQ 187
APN4  NLTQIVLHQRVVSITTVTVLDSNSQVNVLQFP----DPFDTDAYEYELLKINFAEPIAAG-AYTTLIRYVGRINENPFDRGFYKGYLYLDEIHYATTQ 175

APN1  FQPGHARQAFPCYDEPAFKATFDITINREADFSPTISNMPIKNNATLDNGRVSEFTFTPKTSTYLLAFIVSHYKVVATND-DEDRPFDIYARDNAGSTG 281
APN3  FQATSARAAPCYDEPSPKATFDITIRRPPTHKSWSCCTKINSTITSALSGYEEDIYNTTPVMSTYLLAIIVAEYDSLPPNPNETALYEVIARPAAIESG 287
APN4  FQPYHARKAFPCFDEPQPKSRVVISITRDSTLGEFSNMAINDTQTLSEGRIRETFLPTPIISAYLIAFHVSDFVATDSTS-SDTSPPQIISRPGLVLSQH 274

APN1  --EWSLEIGELLKEMEDFTDIPYYTITDNMNMK--QAAIPDFSA[GAMEN]WGLLTYREALILYDPQNSNHFYKQRVANIVS[HEVTH]MWFNGLVTCAWWDN 377
APN3  QAVYAYEVGQKLLAFMDTHTEIYFSDMDPNLKM--QASIPDFSA[GAMEN]WGLLTYREAYLMYDEEHTNSYFKQLIAYILS[HEIVH]MWFNGLVTCDDWDV 385
APN4  --EYAAQIGLSITEELNEYFDYNYDMGQHPMKNDHIALPDPFS[GAMEN]WGMVNYREAYLLYDENHTNLINKIFIATIMA[HELAH]KWFNGLVTCFWSN 372

APN1  LWLNEGFARFYQYYLTAIVAPDLGYETRFIVEQVHSAMFSDSTDEAHALTNPDVTDPTSVSAHFSVITYARGAAVLRMTQQLLGEETFKKGLRAYLKARK 477
APN3  LWLNEGFARYYQYFLTHWVEDYMLGATRFINEQVHTSLLSDSAANAHLPTNTGVGSPASVSAMFSTITYNKGASVIRMTHELLGFVHRRGLINYLTKS 485
APN4  LWLNESYASFEEYFAAHYADPSLELDKQFIVGVVHSALAAADAVASVTPMNVTVGNNASITAHFSTTSYAKGASVLRLEHFGVGETTFRDLSRLYLKNE 472

APN1  FDVAEPHLFQALDWALEDGALDAYN-GVTINEYFKDWSEKAGHPLLTVSIDQSTGRMIVTQARWERTTGISEQQLWRIPITWTRAYDANFENLKPSQ 576
APN3  FQTALPIDLDFQLHLDVAGPAGAIISAYGSDFSVIDYKWTQEAGHPVINQVNHQTDGMTIYQRRFDIDNGFSTATNNWIVPITFATKTNPDFIDTKPTH 585
APN4  YSIGTPEDMYTAFKTVVATDDTFAATYPGIDIGEVSFESWVQNGSPVLNVVDSAEAGNIIVQERFQLTG--TAPSTIWIQIPVWTHGGSPDFNTKPTF 570

APN1  VITGQSTVIQRGTTGLEWVIFNKQESGFYRVNYDFTNWALITRALRNEQNRSVIHEYNRAQIVDDLFAFARAGVMPYNRAFNVLSYLEFEDQYAPWIAAI 676
APN3  ILTESITVINRGTVGDEWVFNKQQTGFYRVNYPYTWDLITIALRG-SDRTLIHEYNRAQIVNDVVFQFARSGLMTYTRAFNLSFLRNETDYAPWVAAM 684
APN4  VLTGASTTIEG-DFEDNWIIFNVAQSGLYRVNYDSRNWELIATALRE--ERETIDRLNRAQIVNDVLFVFRAGKIEIELAFNLSFLEETDYVWAGAL 667

APN1  NAFSIVIRRVAHDASSLKDLQDEI IKLSPAITARLGYVENENDTYMDGLLRMYMTFLCNAGHEECVSTGKSYFEQWK--NGGFVPANMRPWVYCVGLREG 775
APN3  TGFSLRNRRLAPSPAYLTQLEEMI IEWSETVITELSYYPKEDFTFMTSYLRYQLAPVLCALNVSECREAAVAQFRALVENDDEVVDSRNWVYCNALRKG 784
APN4  SQLDWLRRLRLEHLPAAHDEFTEYLLLELLETVVEHVGYDEKASDSTSTILNRMQILNYACNLGHEGCISDSLEKWNDRFNNVLPVNSRRVYVICGLREG 767

APN1  DGDDFDYFWDRYLAEDLASEKVVMLQVAGCTKNQTSLEKFLSAIVAGDEAVRPQDYTTALNSAVSGNEENTQMAFEWLK--NNINQTTETLGGIGTPLSY 873
APN3  TEEDFTYLWQRYQQHNVTYKILLLLMLNLCGCTPHATSLYTFDLAIFEEENFVIRPQDYTTSLSSAVNGNPGNAQIVFKYIQ--ENLVKVSNAFSSIAATPLSY 882
APN4  NITDYNFLFEKYNSSENTADMVVMLRALACSKDQTAIAHYLDQSMYN-DKIRYHRTNNAFNALLGNKENLPTVLEFVQNFAEIRQNYGGSARLNIVFNA 866

APN1  IAARLISEEQITFRLWLEENKDEIGSAYNTGINGAESAANNLEWSARRIEELALYLETRYVEDNLVDLDSGEDGGEDGDEGDGDEGDGDEGDGDEGD 973
APN3  ISSRLTTEEEVEEFLAWANDNQEALGTAYQSVVNAISVRNTFAWVETVSNDLTSYFNN---PDQVIEPSS-----TTTQTPVAST 960
APN4  LPTYLTDQDISDFQTFVFSNQVALGESFETGKNVVTTSINNLVWANNIVVELYTFRLN----- 925

APN1  EDGDECEDEDEDED[SGS]ANIATLSIVTLAVTIVINFMV 1012
APN3  TETQPALAEPEAPELP[SAV]TTFLSISVISFAVLANIFF 999
APN4  -----RN[AAG]ITAPIVLIFVAITAHFFPLIYF--- 953

```

Figura 10. Alinhamento de APNs de *T. licus licus* identificadas no transcrito. O peptídeo sinal está indicado pela linha vermelha. Em azul e verde está indicado o sítio ativo da enzima. Os resíduos marcados em vermelho indicam a posição de ancoragem de GPI.

As APNs de insetos têm sido divididas em cinco grupos filogenéticos, mas até o momento não há relatos de que uma única espécie de inseto apresente todos os grupos de proteínas (PIGOTT e ELLAR, 2007). De maneira a melhor caracterizar as APNs de *T. licus licus* identificadas no transcrito de *T. licus licus*, foi realizada uma análise filogenética para discernir sobre relações evolutivas entre proteínas de lepidópteros e organizá-las de acordo com os cinco grupos de proteínas. Os resultados mostraram que as APNs da broca-gigante estão distribuídas entre sequências de diferentes espécies e divididas entre os grupos 1, 3 e 4, sendo denominadas Tl_APN1, Tl_APN3 e Tl_APN4. As sequências Tl_APN1 e Tl_APN4 se agruparam próximas a APNs de *M. sexta* e de *B. mori*, já bem caracterizadas como receptores de toxinas Cry (Figura 11).

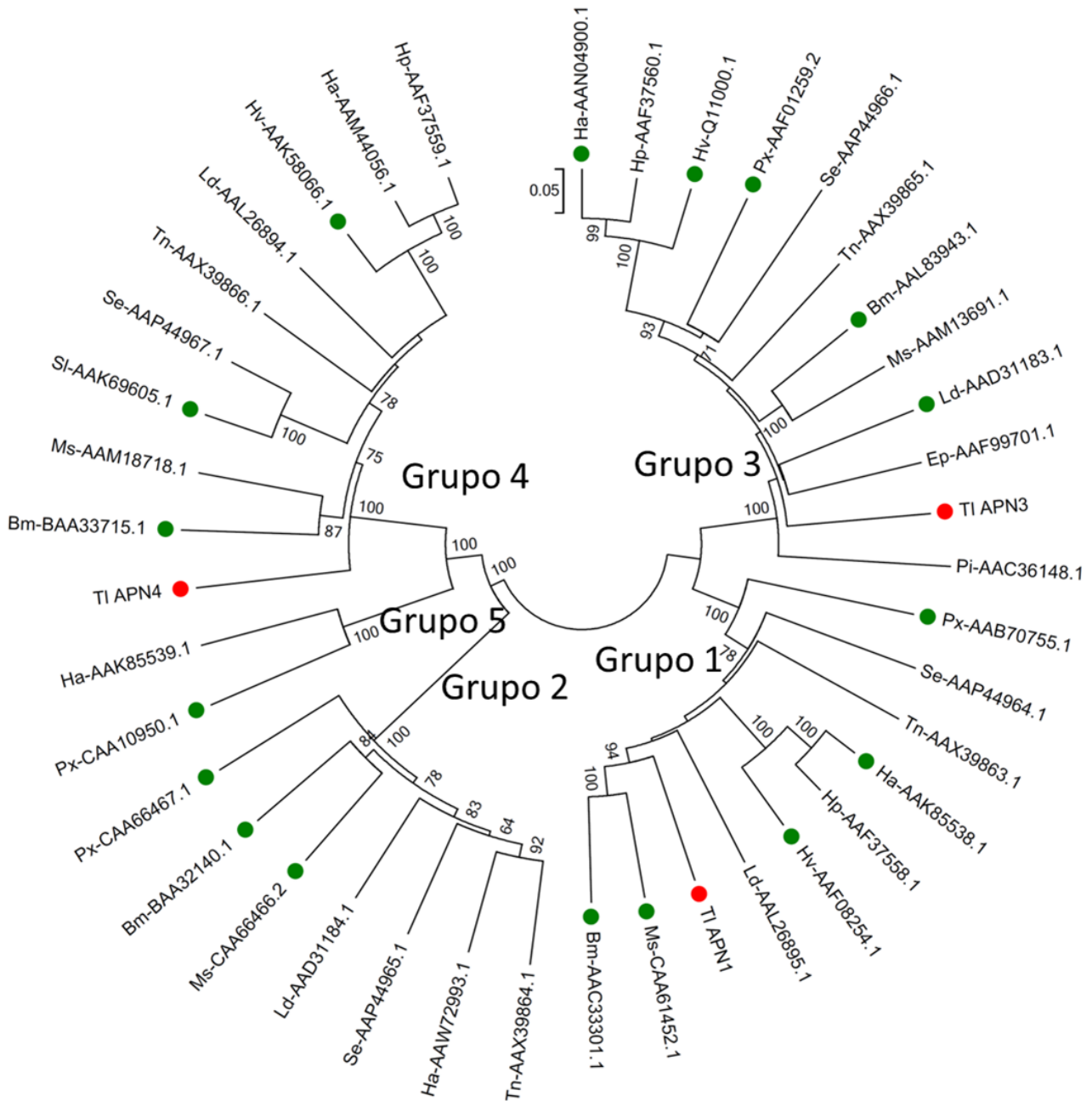


Figura 11. Análise filogenética de APNs representativas de lepidópteros. As proteínas de *T. licus licus* são mostradas em vermelho. As marcas verdes indicam as APNs que já foram identificadas experimentalmente como possíveis receptores de toxinas Cry. Os números de acesso do GenBank são mostrados junto às abreviações dos nomes das espécies. Abreviações: Ha, *Helicoverpa armigera*; Hp, *Helicoverpa punctigera*; Hv, *Heliothis virescens*; Px, *Plutella xylostella*; Se, *Spodoptera exigua*; Tn, *Trichoplusia ni*; Bm, *Bombyx mori*; Ms, *Manduca sexta*; Ld, *Lymantria dispar*; Ep, *Ephiphyas postvittana*; Pi, *Plodia interpunctella*; Sl, *Spodoptera litura*. Adaptado de Pigot e Ellar, 2007.

4. Conclusão

O estudo aqui apresentado gerou, pela primeira vez, um novo banco de dados altamente representativo para a broca-gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus*. Até o presente momento, existem somente 109 sequências de DNA mitocondrial depositadas no *GenBank* para esse organismo. Aproximadamente 24 mil *contigs* foram obtidos, apresentando um tamanho médio de 630 pares de bases. Após a anotação das sequências, foi possível determinar a composição gênica expressa em diferentes fases do ciclo de vida do inseto e classificá-las de acordo com sua função biológica, molecular e celular. Ao serem publicadas, as sequências aqui obtidas enriquecerão o conhecimento acerca da biologia da broca-gigante e contribuirão enormemente em pesquisas futuras. Com o auxílio de um banco de sequências expressas especificamente do intestino médio de *M. sexta* foram identificados domínios de proteínas envolvidas com o processo de digestão. Esses dados serão úteis para definir alvos potenciais para o desenvolvimento de métodos de controle do inseto por meio da alimentação. Para melhor compreender o papel das toxinas Cry sobre o inseto foram identificadas três aminopeptidases completas que possuem todas as características de APNs. Duas dessas proteínas agrupam-se próximas a outras APNs, já caracterizadas experimentalmente como receptores de toxinas Cry. O estudo comparativo entre essas proteínas poderá determinar se as APNs identificadas no transcrito de *T. licus licus* também são receptores de toxinas e direcionar estudos de caracterização de toxicidade e de evolução molecular *in vitro*, visando o controle do inseto. Além disso, o banco de dados contribuirá como uma fonte de sequências de interesse que poderão ser validadas em experimentos de silenciamento gênico, com o objetivo de avaliar a função de cada gene. Dentre os potenciais alvos biotecnológicos foram identificados genes relacionados com processos industriais, como a produção de etanol de segunda geração, genes relacionados com o desenvolvimento, fatores de transcrição, vias de síntese e degradação de hormônios, entre outros.

Capítulo II – Estudo da atividade de toxinas Cry contra larvas neonatas de *Telchin licus licus*

1. Introdução

1.1 *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911)

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria da família *Bacillaceae*, pertencente ao grupo do *Bacillus cereus*. É um organismo, Gram positivo, aeróbio, cosmopolita, presente no solo, água, superfícies vegetais, poeiras de grãos, insetos mortos e fezes de insetos, dentre outros lugares (FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010). Essa bactéria apresenta um ciclo de vida o qual, quando a quantidade de nutrientes e as condições do ambiente são favoráveis, há a germinação de um esporo, produzindo uma célula vegetativa que cresce e se reproduz por fissão binária. As células continuarão a se multiplicar até que um ou mais nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio, começam a ser insuficientes para a continuidade do crescimento celular. Sob essas condições, as bactérias alteram seu metabolismo, dando origem ao esporo e ao corpo parasporal, este último sendo composto por proteínas na forma de inclusões cristalinas (FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010). Esses cristais podem conter uma ou várias δ -endotoxinas, proteínas que possuem atividade inseticida (BENINTENDE e MÁRQUEZ, 1996; SCHNEPF *et al.*, 1998) (Figura 12). Além disso, o *Bt* pode produzir outros fatores entomotóxicos, como α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e toxinas VIP (HANSEN e SALAMITOU, 2000), que podem atuar ou não em sinergia com as δ -endotoxinas.

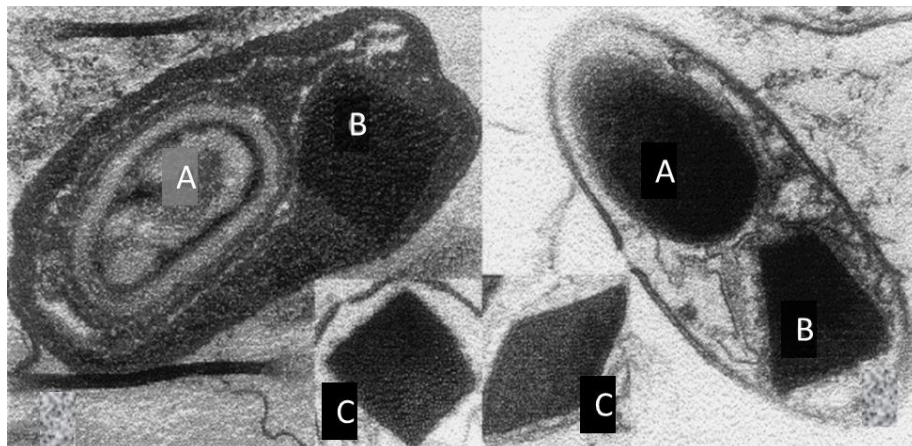


Figura 12. Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Bacillus thuringiensis* na fase de esporulação. A) Esporos; B) Cristais protéicos; C) Imagem aproximada dos cristais mostrando as diferentes formas que podem assumir (cubóides, bipiramidais, entre outras). Adaptado de Bobrowski *et al.*, 2002.

O uso de inseticidas a base de microrganismos, em substituição aos pesticidas químicos, é uma alternativa para o controle de insetos-praga de diversas culturas. A maior parte dos inseticidas biológicos a base de bactérias é composta por *Bt* (PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013). Os produtos a base de *Bt* têm sido bem recebidos pela comunidade científica, principalmente por serem organismos inócuos a plantas e vertebrados, por não poluírem o meio ambiente e por sua eficácia contra os insetos.

Inseticidas a base de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* têm sido utilizados com sucesso para o controle de pragas agrícolas há quase 60 anos para o controle de lepidópteros. Estima-se que em todo o mundo esses inseticidas tenham uma participação no mercado de até 100 milhões de dólares (FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010).

Adicionalmente, *B. thuringiensis* serovar *israelensis* mostrou ser altamente tóxico contra larvas de mosquitos. Essa característica chamou a atenção para a possibilidade de utilização de produtos baseados em *Bt* contra larvas de mosquitos que atuem como vetores de doenças animais, incluindo seres humanos (RABINOVITCH; SILVA; ALVES, 2000).

Entretanto, mesmo com todas essas vantagens citadas, esses inseticidas podem apresentar algumas limitações tais como, baixa persistência no campo, dificuldade de controle de pragas que possuam hábitos endofíticos e ação letal mais lenta quando comparada aos inseticidas químicos.

Visando criar um mecanismo que possa contornar essas limitações, têm-se investido muito no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando toxinas Cry. As primeiras plantas GM resistentes a insetos foram obtidas na década de 1980, quando o gene *cry bt2* foi expresso em tabaco visando o controle da lagarta *M. sexta* (VAECK *et al.*, 1987). Desde então, o número de países que passaram a investir em culturas GM vem aumentando gradativamente. Em 2011, 29 países cultivaram plantas GM, em uma área de 160 milhões de hectares. O Brasil produz soja, milho e algodão geneticamente modificados, resistentes a insetos (via expressão de toxinas Cry) ou a herbicidas, ocupando a segunda colocação mundial entre os maiores produtores de culturas GM. Atualmente, várias culturas de grande importância econômica tais como, algodão, soja, milho, batata, arroz, tomate, berinjela e crucíferas foram geneticamente modificadas para expressão de diferentes toxinas Cry (JAMES, 2011).

1.2 Toxinas Cry

Devido a sua grande importância na agricultura, silvicultura e na saúde pública, a busca por novos genes ou novos isolados de *Bt* tem sido foco de estudo de diversos grupos de pesquisa. Toda a informação sobre a caracterização de cepas e de genes de toxinas Cry, VIP e Cyt é depositada em um banco de dados virtual (<http://www.btnomenclature.info/> - acesso em 22/07/13). As toxinas Cry são classificadas de acordo com sua sequência primária de aminoácidos. Mais de 700 genes já foram sequenciados e divididos em 72 grupos (Cry1 – Cry72) (<http://www.btnomenclature.info/> - acesso em 22/07/13). A maior parte das toxinas possui cinco blocos de aminoácidos conservados na sua estrutura primária da toxina na sua forma inativa (protoxina), sugerindo que podem ser importantes tanto para a estabilidade quanto para a função da proteína (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001) (Figura 13).

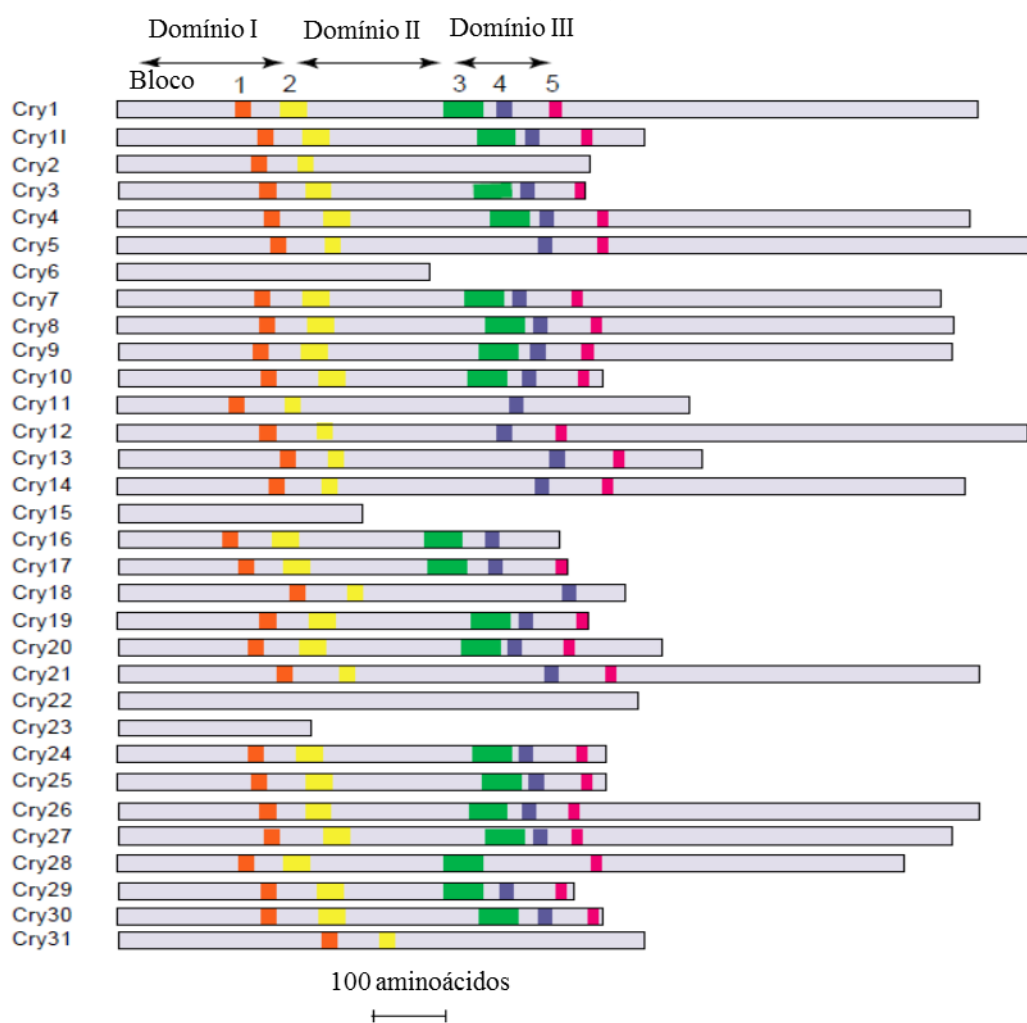


Figura 13. Estrutura primária de toxinas Cry indicando o tamanho relativo das proteínas e a posição dos blocos conservados, quando existentes. Adaptado de: de Maagd; Bravo; Crickmore, 2001.

Esses genes podem ser divididos em quatro grandes grupos não relacionados filogeneticamente entre si: as Mtx (*mosquitocidal Cry toxins*), Bin (*binary-like toxins*), Cyt (*cytolytic toxins*) e as 3D-Cry (*three domain Crystal toxins*) (BRAVO *et al.*, 2011). Essas proteínas são codificadas por genes plasmidiais, alguns deles flanqueando elementos de transposição, o que explica a facilidade de transferência desses genes dentro da espécie (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

As toxinas Mtx, Bin e Cyt têm ação restrita contra dípteros e alguns coleópteros (HERMAN *et al.*, 2002; HOFTE e WHITELEY, 1989). As toxinas da classe 3D-Cry, assim denominadas por apresentarem três domínios principais na sua estrutura (BRAVO, 1997), ou simplesmente toxinas Cry, apresentam um amplo espectro de ação, sendo tóxicas contra lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros e até mesmo nematóides (WEI *et al.*, 2003).

A estrutura tridimensional de oito toxinas foi determinada por cristalografia: Cry1Aa (PDB ID: 1CIY) (GROCHULSKI *et al.*, 1995), Cry1Ac (DERBYSHIRE; ELLAR; LI, 2001), Cry2Aa (PDB ID: 1I5P) (MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001), Cry3Aa (PDB ID: 1DLC) (LI; CARROLL; ELLAR, 1991), Cry3Ba (PDB ID: 1JI6) (GALITSKY *et al.*, 2001), Cry4Aa (PDB ID: 2C9K) (BOONSERM *et al.*, 2006), Cry4Ba (PDB ID: 1W99) (BOONSERM *et al.*, 2005) e Cry8Ea (PDB ID: 3EB7) (GUO *et al.*, 2009). Além disso, outras três toxinas tiveram sua estrutura tridimensional descrita por modelagem molecular: Cry1Ab19 (KASHYAP; SINGH; AMLA, 2012), Cry5Aa (XIN-MIN *et al.*, 2009) e Cry8Ka5 (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Apesar de, uma forma geral, apresentarem baixa identidade na sequência de aminoácidos, a topologia entre elas é muito semelhante, confirmando a presença de três domínios principais (PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013) (Figura 14). Estudos de filogenia mostraram que a variação na atividade biológica dessas toxinas é resultado da evolução independente de cada um desses domínios e também da troca do domínio III entre diferentes toxinas (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

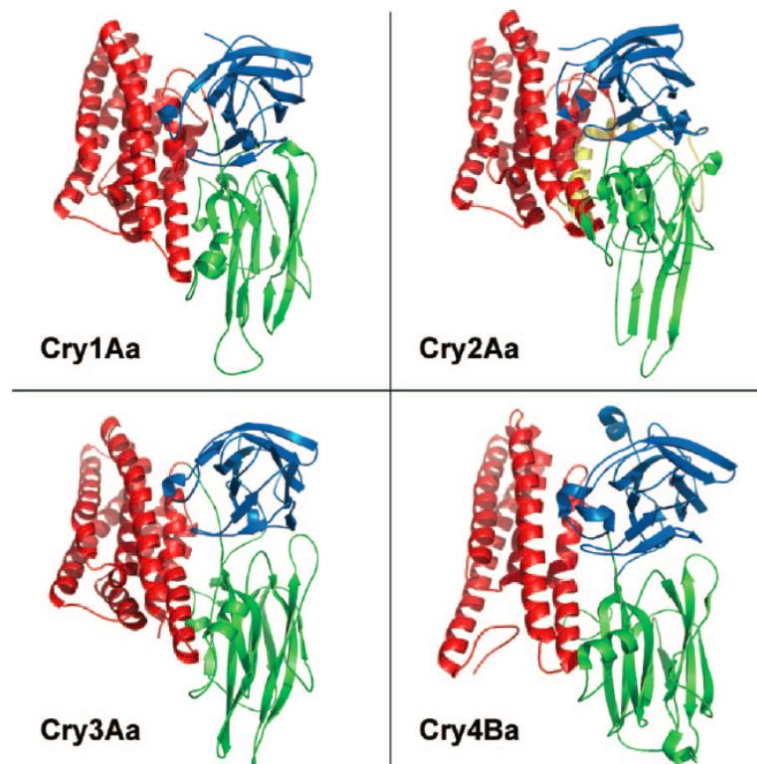


Figura 14. Estrutura tridimensional de toxinas Cry obtidas por cristalografia. Em vermelho, verde e azul estão indicados os domínios I, II e III, respectivamente. Adaptado de Pigott e Ellar, 2007.

O domínio I consiste em um empacotamento de α -hélices anfipáticas, onde uma α -hélice central (α -5) é cercada por outras seis α -hélices (α -1, α -2, α -3, α -4, α -6 e α -7). Nas α -hélices periféricas, seus resíduos polares ou carregados ficam expostos para o solvente, enquanto os resíduos hidrofóbicos notadamente se projetam em direção a α -hélice central. O espaço inter-hélices é preenchido com pontes de hidrogênio ou pontes salinas. As hélices possuem mais de 30 Å de comprimento e apresentam uma estrutura semelhante ao domínio com atividade formadora de poros transmembrana da proteína colicina (PIGOTT e ELLAR, 2007).

O domínio II é formado por três folhas β antiparalelas que se agrupam para formar um prisma β . Duas destas folhas estão voltadas para o solvente e apresentam uma estrutura do tipo chave-grega, onde cada folha é composta por quatro fitas β . A terceira folha, composta por três fitas antiparalelas em disposição do tipo chave-grega e uma α -hélice curta, fica colada internamente ao domínio I. Estruturalmente, o domínio II apresenta a maior variabilidade entre as toxinas, especialmente na região das alças (*loops*) que formam a extremidade do domínio, variando em comprimento, conformação e sequência. Devido a essa variabilidade, o domínio II vem sendo relacionado com a especificidade das toxinas. Além

disso, comparações entre a estrutura das alças das extremidades com a região complementar ao paratopo de anticorpos que reconhecem receptores de membrana sugerem que este domínio pode exercer alguma influência na ligação a receptores presentes na membrana de células do epitélio intestinal (PIGOTT e ELLAR, 2007).

O domínio III é composto por um β sanduíche de duas folhas- β antiparalelas. Estas folhas são, por sua vez, formadas por cinco fitas β , com uma folha voltada para o solvente e a outra para o centro de massa da toxina, na interface entre os três domínios. Este domínio apresenta menor variabilidade estrutural do que o domínio II e as principais diferenças entre eles são encontradas nos comprimentos, orientação e sequências de aminoácidos das alças (PIGOTT e ELLAR, 2007). Neste domínio, são encontradas regiões com estrutura semelhante aos domínios de proteínas que se ligam a carboidratos. De fato, as variações nessa região são tão importantes que mesmo entre toxinas do subgrupo Cry1A, a extensão de uma das alças cria um sítio único de ligação a N-acetilgalactosamina (Gal-NAc) na toxina Cry1Ac, e isso pode ter relação direta com a ligação a receptores (DERBYSHIRE; ELLAR; LI, 2001).

1.3 Receptores de toxinas Cry

Para melhor compreender o mecanismo de ação das toxinas Cry, vários trabalhos vêm buscando determinar os aspectos fisiológicos e moleculares da interação da proteína com a membrana epitelial do intestino do inseto. Quanto aos aspectos fisiológicos, observou-se que o uso de toxinas Cry contra espécies diversas de insetos pode desencadear um quadro citopatológico comum (KNAAK *et al.*, 2010). Poucos minutos após a ingestão das proteínas, o inseto susceptível diminui a sua alimentação e, após alguns dias morre em consequência de inanição e de septicemia (HEIMPEL e ANGUS, 1960). Em alguns casos isso se deve ao fato de que as toxinas Cry, quando em contato com as células do epitélio intestinal, causam lise osmótica, seguida do colapso das mesmas, levando o inseto à morte (BRAVO; JANSENS; PEFFEROEN, 1992).

Quanto aos aspectos moleculares, observou-se que as toxinas Cry só surtem o efeito citotóxico quando o inseto as ingere. O simples contato com a cutícula do inseto não é capaz de gerar todo o quadro que causa a morte do organismo (FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010). Outra observação importante diz respeito à toxicidade variável das toxinas Cry entre diferentes espécies de insetos, mesmo entre espécies muito próximas evolutivamente (FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010). Isso indica que as toxinas interagem de maneira

diferente com as células epiteliais do intestino, muito provavelmente devido a diferenças de solubilização dos cristais, diferenças de pH intestinal, do processamento das protoxinas no organismo dos insetos e na presença de receptores diferentes na membrana celular. Essas observações mostram que a ligação das proteínas ativas a receptores é determinante importante da especificidade da toxina e que, em geral, apresentam um mecanismo de ação com algumas etapas em comum.

Para identificar prováveis receptores de toxinas Cry, diferentes trabalhos foram realizados utilizando metodologias variadas. A correlação entre a ligação da toxina aos receptores e a toxicidade foi demonstrada por meio de ensaios de competição homóloga/heteróloga utilizando BBMV's (*Brush Border Membrane Vesicles*) (Wolfersberger, 1990). A ligação estável à membrana sugere a existência de uma interação forte e específica com um receptor de membrana. De fato, estudos posteriores comprovaram a presença de diferentes classes de proteínas de membrana com participação efetiva no mecanismo de ação. A interação entre toxinas Cry1A com diferentes proteínas do intestino de alguns lepidópteros é um processo complexo, envolvendo múltiplas proteínas de membrana como caderinas (CAD), aminopeptidases N (APN) e fosfatases alcalinas (ALP). Além disso, foram identificadas outras moléculas que interagem com toxinas Cry como, glicolipídeos, um glicoconjugado de 270 KDa (BTR-270), uma proteína de 252 KDa (P252), metaloproteases (ADAM), α -glicosidases (BRAVO *et al.*, 2011; PIGOTT e ELLAR, 2007; SOBERÓN *et al.*, 2010), além de uma *heat-shock cognate protein* e uma V-ATPase (NAKASU *et al.*, 2010). Entretanto, não se sabe se essa interação está relacionada com o mecanismo de ação das toxinas.

1.4 Mecanismo de ação das toxinas Cry

Existem diferentes modelos que visam explicar o mecanismo de ação das toxinas Cry: I) o modelo de formação de poros, II) o modelo de transdução de sinal e III) um modelo que combina os dois citados anteriormente (JURAT-FUENTES e ADANG, 2006; PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013; ZHANG *et al.*, 2005). Entretanto existem alguns passos em comum entre os três modelos, principalmente no início do processo de ativação das toxinas. Uma vez ingeridos por um inseto susceptível, os cristais são solubilizados no homogenato intestinal (suco digestivo), liberando a forma inativa das toxinas, conhecida como protoxina (GILLILAND *et al.*, 2002). Em seguida, as protoxinas são clivadas pela ação de proteases do intestino médio. Esta clivagem ocorre em dois sítios, um localizado na região N-terminal e outro na porção C-terminal da proteína, liberando um monômero com estrutura

globular de aproximadamente 60-70 kDa (GROCHULSKI *et al.*, 1995). Em lepidópteros, as principais enzimas digestivas envolvidas na clivagem das proteínas Cry são as proteases serínicas, como a tripsina e a quimotripsina (SCHNEPF *et al.*, 1998) enquanto que em coleópteros, a clivagem ocorre por ação das proteases cisteínicas e aspárticas (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

O mecanismo de ação das toxinas Cry mais estudado é o modelo de formação de poros. Nele, após a solubilização e ativação das toxinas, as mesmas se ligam a receptores específicos presentes na região apical da membrana das células do intestino médio dos insetos (BRAVO *et al.*, 2002). Em *Manduca sexta*, a primeira interação das toxinas Cry1A acontece com uma interação de baixa afinidade com receptores APN e ALP ($K_d = 101$ nM e 267 nM, respectivamente). A interação com APN acontece principalmente através de ligação do receptor com a alça 3 do domínio II da toxina, enquanto que a interação com ALP acontece através de ligação com a folha- β 16 do domínio III (ARENAS *et al.*, 2010; MASSON *et al.*, 1995; PACHECO *et al.*, 2009). APN e ALP são proteínas muito abundantes, ancoradas à membrana celular por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (UPADHYAY e SINGH, 2011).

A interação com esses receptores concentram as toxinas ativas nas microvilosidades da membrana, onde então as toxinas Cry1A se ligam com uma interação de alta afinidade a receptores do tipo CAD ($K_d = 1$ nM). A interação com CAD é um processo complexo que envolve três epítomos, correspondendo às regiões extracelulares denominadas CR7, CR11 e CR12, onde CR12 localiza-se na região proximal do domínio de membrana da caderina. Esses epítomos de CAD interagem com as alças expostas 2, 3 e α -8 do domínio II da toxina, promovendo a quebra proteolítica da região N-terminal, incluindo a remoção da hélice α -1 do domínio I (ATSUMI *et al.*, 2008; GOMEZ *et al.*, 2002).

Alguns estudos indicam que a remoção da hélice α -1 expõe regiões hidrofóbicas do domínio I, dessa forma, acredita-se que essa clivagem seja essencial para induzir a formação de um oligômero de toxinas Cry (ARENAS *et al.*, 2010; GOMEZ *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2009). Com isso, em *M. sexta*, o oligômero aumenta sua afinidade para APN e ALP ($K_d = 0,6$ nM e 0,5 nM, respectivamente), ligando-se aos receptores através da alça 2 do domínio II de Cry1Ab (ARENAS *et al.*, 2010), inserindo o complexo na membrana celular, induzindo a formação do poro e causando lise osmótica (ARENAS *et al.*, 2010; BRAVO *et al.*, 2004; PARDO-LOPEZ *et al.*, 2006) (Figura 15).

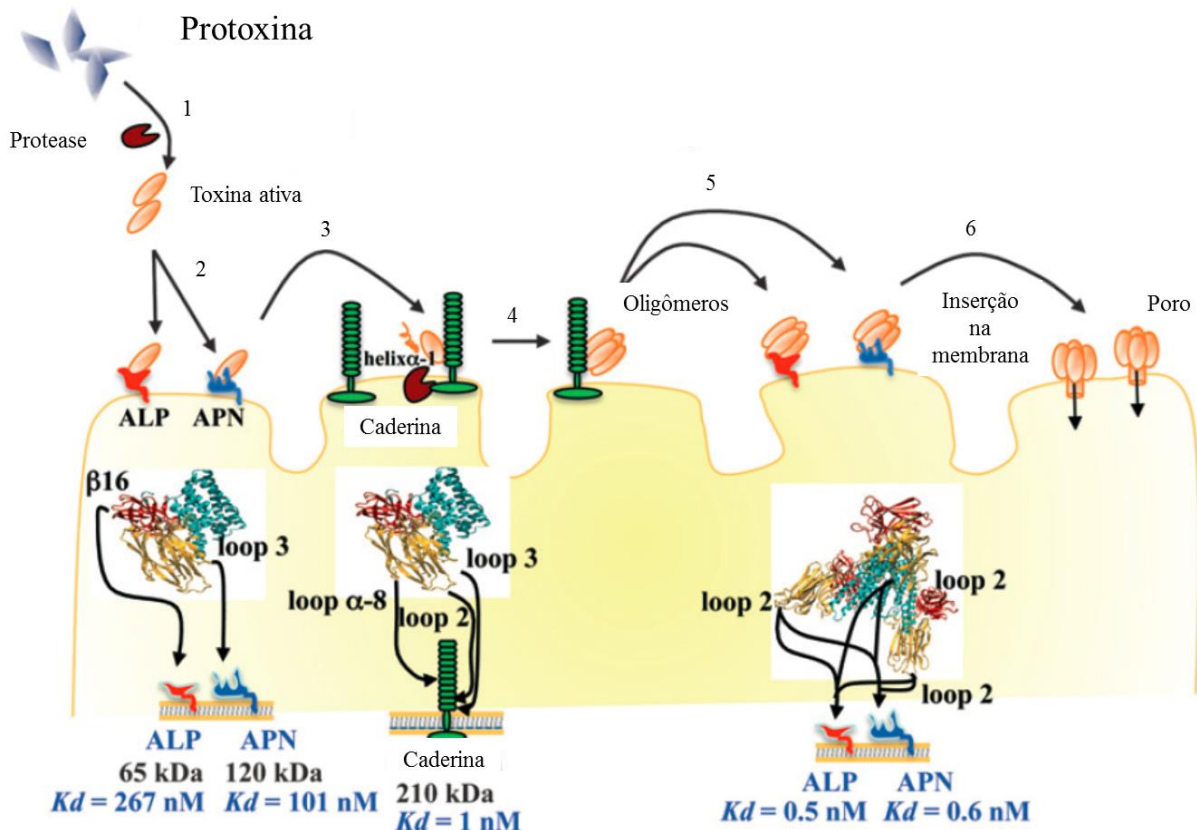


Figura 15. Mecanismo de ação de toxinas Cry1A em células epiteliais do intestino médio de *M. sexta*. 1) Ativação da protoxina por proteases do intestino médio. 2) Reconhecimento da forma monomérica da toxina por receptores do tipo fosfatase alcalina (ALP) ou aminopeptidase N (APN). 3) Reconhecimento da toxina monomérica pelo receptor do tipo caderina e clivagem da α -hélice-1. 4) Oligomerização das toxinas. 5) Reconhecimento do oligômero por receptores do tipo ALP e APN. 6) Inserção do oligômero na membrana de células do epitélio intestinal e formação do poro. Adaptado de Pardo-Lopez *et al.*, 2013.

1.5 Atividade de toxinas Cry contra *Telchin licus licus*

Um dos objetivos principais do estudo da atividade de toxinas Cry contra lagartas da broca-gigante da cana-de-açúcar é o desenvolvimento de plantas GM resistentes ou menos susceptíveis ao inseto-praga e, para isso, a identificação de toxinas ativas contra esse inseto é um passo essencial no processo de melhoramento genético da cultura. Em 2007, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) isolou e caracterizou os genes *cry8Kal* e *cry11a12*, a partir da cepa S811 de *B. thuringiensis* (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2007).

O gene *cry11a12* foi utilizado posteriormente em protocolos de evolução molecular *in vitro* (utilizando as técnicas de *DNA shuffling* e *phage display*) para o desenvolvimento de moléculas com atividade melhorada contra larvas neonatas de *T. licus licus*. Após a

realização dos bioensaios foram identificados três clones os quais apresentaram atividade maior, quando comparados à toxina original (CRAVEIRO *et al.*, 2010). Em estudo recente, GOMES JÚNIOR (2012) utilizou a mesma metodologia citada para tentar gerar moléculas híbridas entre os genes *cryIAa* e *cryIIa12*. Apesar de os clones resultantes serem variantes apenas do gene *cryIIa12*, testes de atividade em bioensaios com larvas neonatas de *T. licus licus* mostraram que duas moléculas apresentaram atividade maior (2,5 e 3,5 vezes), quando comparadas à molécula original. Esses resultados mostram a importância da seleção e caracterização de toxinas ativas contra os insetos e permitem o uso desta tecnologia para melhorar o controle de pragas, além de gerar moléculas novas que não apresentam nenhuma proteção da sequência em forma de patente.

1.6 Transferência de domínios entre toxinas Cry e alteração da atividade

Além da mutação de alguns aminoácidos na sequência da proteína, outras formas de alteração da atividade vêm sendo testadas. Como as toxinas Cry assumem uma conformação tridimensional muito parecida umas com as outras, mesmo entre proteínas de grupos distintos, pesquisadores vêm desenvolvendo moléculas híbridas a partir da fusão de domínios de toxinas Cry. Diferentes fusões, tais como Cry1Ab-Cry1B (HO *et al.*, 2006) e Cry1Ac-Cry1Ab (HONÉE; VRIEZEN; VISSER, 1990) foram sintetizadas e expressas em plantas visando obter moléculas com maior atividade ou com maior espectro de ação. A transferência do domínio III de Cry1C para Cry1Ab, gerando um híbrido (Cry1Ab-Cry1C), mostrou uma atividade muito maior contra lagartas de *Spodoptera exigua*, que antes eram resistentes a toxinas da família Cry1A (DE MAAGD *et al.*, 1996; DE MAAGD *et al.*, 2000). Plantas de batata expressando um híbrido contendo os domínios I e III de Cry1Ba e o domínio II de Cry2A apresentaram alta resistência contra *Phthorimaea operculella* e *Leptinotarsa decemlineata* (NAIMOV *et al.*, 2001).

Para que essa metodologia possa ser realizada com sucesso, a informação acerca da estrutura tridimensional das toxinas e dos receptores presentes nas células epiteliais do intestino médio dos insetos é de suma importância. Com ela pode ser possível simular *in vitro* ou *in silico* como ocorre e qual a estabilidade da ligação das toxinas aos receptores. Utilizando programas de modelagem e *docking* de proteínas, TAJNE e colaboradores (2012) observaram que ao trocar o domínio III de Cry1Ac por uma lectina isolada de *Allium sativum*, a estabilidade da ligação da toxina pelo receptor aumentou consideravelmente. Baseado nessas observações, o desenho de novas moléculas a partir da troca de domínios entre toxinas

Cry ou da inserção de outras classes de proteínas surge como uma maneira alternativa de mudar ou incrementar a atividade de moléculas inseticidas.

1.7 Modelagem molecular e dinâmica de proteínas

A estrutura terciária de diversas toxinas Cry já foi determinada por cristalografia (PIGOTT e ELLAR, 2007). O conhecimento da estrutura de uma proteína é importante, pois permite a identificação de aspectos funcionais das moléculas tais como sítios ativos, regiões flexíveis, sítios de ligação e interações intramoleculares (SAMISH; GU; KLEIN, 2009). Porém, a resolução da conformação tridimensional de proteínas nem sempre pode ser obtida devido a limitações inerentes às técnicas de cristalografia, ressonância magnética nuclear e difração de nêutrons. Fatores, tais como a obtenção de amostras em quantidades suficientes para os ensaios, a qualidade dos cristais obtidos, a escolha do sistema de expressão de proteínas, a existência de alterações pós-traducionais na cadeia polipeptídica e a origem do material (proteínas de membrana, por exemplo) muitas vezes prejudicam ou impedem a determinação da estrutura terciária da molécula (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003).

Nesse contexto, a modelagem por homologia vem sendo bastante utilizada para contornar a falta de informação da estrutura terciária de proteínas de diversas classes. Esta metodologia baseia-se em observações quanto a similaridades e diferenças na estrutura primária e o seu respaldo na estrutura terciária e, conseqüentemente, na função das proteínas. Geralmente, quando duas ou mais proteínas apresentam as mesmas funções ou funções muito parecidas, há conservação da estrutura terciária e essa informação pode ser relevante para a construção de um modelo a partir do uso das coordenadas cartesianas dos átomos que compõem uma molécula com estrutura já conhecida (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003).

Para a realização da modelagem por homologia é necessária a identificação e seleção de proteínas-molde. Essas proteínas podem ser obtidas a partir de bancos de dados como, por exemplo, o PDB (<http://www.pdb.org/>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/>). Em seguida, é realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas-molde com a proteína-alvo. Se o grau de identidade entre as estruturas primárias das proteínas for igual ou superior a 30% e apresentar uma cobertura alta por toda a cadeia, é possível que as proteínas apresentem estruturas tridimensionais semelhantes e, dessa forma, a informação pode ser utilizada para a construção de um modelo para a proteína-alvo (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Por último, o modelo

gerado deve ser validado e se possível otimizado para reorganizar as interações desfavoráveis, os ângulos torcionais e de ligação entre os átomos. A validação é utilizada para examinar o empacotamento global da proteína, erros estruturais e parâmetros estereoquímicos, enquanto que a otimização pode ser realizada a partir da simulação por dinâmica molecular, que permite que os átomos da molécula se ajeitem para um estado mais próximo ao natural.

Vale ressaltar que as estruturas de proteínas presentes nos bancos de dados e mesmo as estruturas obtidas via modelagem por homologia, fornecem apenas um quadro momentâneo da conformação adotada pela molécula. A caracterização da variação dos estados conformacionais é de grande importância para o entendimento da plasticidade funcional, das interações proteína-proteína, entre outras propriedades. Dentro desse contexto, as informações presentes em uma estrutura rígida podem ser usadas para simular a estrutura adotada pela proteína ou por uma região específica da molécula em função do tempo (FERNANDEZ-BALLESTER e SERRANO, 2006).

A dinâmica molecular (DM) compreende um conjunto de métodos utilizados na análise conformacional de moléculas. Essa ferramenta basicamente aplica a mecânica newtoniana clássica para calcular a posição de cada átomo constituinte do sistema no transcorrer de um tempo determinado. O histórico de coordenadas do núcleo de cada átomo e sua evolução ao longo do tempo define a trajetória das moléculas do sistema. Com isso é possível visualizar o comportamento da proteína e as mudanças em seu estado conformacional bem como caracterizar as interações intra e intermoleculares e a estabilidade das ligações. Nesse contexto, o uso da DM, associado à análise da atividade das toxinas Cry em bioensaios, pode ser uma ferramenta que auxiliará a validação da ligação das proteínas e seus respectivos receptores.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção de larvas de *Telchin licus licus*

Foi estabelecido um protocolo de criação de lagartas em laboratório que permitiu obter larvas neonatas saudáveis e em grande quantidade. Este protocolo encontra-se em processo de sigilo e foi omitido para respeitar as exigências do patenteamento.

2.2 Obtenção de toxinas Cry

As toxinas Cry utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Dra. Rose Monerat (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). As toxinas foram expressas em estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* transformadas com o vetor pHT315 (ARANTES e LERECLUS, 1991) portando separadamente os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* e *cry2Aa*.

2.3 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a análise da massa molecular e a integridade das proteínas, 25 µg de cada amostra foram solubilizados em 20 µL de tampão de amostra, aquecidos a 100 °C durante 10 minutos e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. A eletroforese foi realizada no sistema Mini PROTEAN[®] 3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) contendo 400 mL de tampão de corrida 1X (190mM Glicina, 25 mM Tris-Base e 0,1% SDS) e aplicando-se uma corrente de 15 mA/cm² durante 90 minutos. Ao final da eletroforese, o gel foi corado em solução corante de Comassie Brilliant Blue 1% (p/v) e as bandas visualizadas após tratamento com solução descorante contendo 40% de metanol e 12% de ácido acético glacial.

2.4 Bioensaio de toxicidade e determinação da concentração letal LC₅₀

Para examinar o efeito das toxinas sobre larvas de *T. licus licus*, bioensaios foram realizados utilizando disco de esponja de 0,4 cm² embebido em 50 µL de dieta artificial líquida (Anexo XII) contendo uma diluição seriada de cada uma das toxinas ou apenas a dieta no tratamento controle. As concentrações testadas de cada proteína foram de 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL, 2000 ng/mL e 4000 ng/mL. A unidade experimental consistiu em doze larvas neonatas individualizadas em placas de 96 poços. Foram realizadas 6 repetições para cada tratamento. Os insetos foram mantidos a 28 ± 2 °C, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 (C:E). A taxa de mortalidade foi avaliada após 7 dias

e calculada utilizando a formula de ABBOTT (1925) para a determinação da LC₅₀. As porcentagens de mortalidade foram avaliadas por análise de variância (ANOVA, p<0,05) e teste de Tukey (p<0,05) para verificar a significância dos testes realizados.

2.5 Modelagem de proteínas

As proteínas que tiveram suas estruturas tridimensionais modeladas por homologia estão listadas na tabela 5, juntamente com o molde e o código de acesso ao PDB.

Tabela 5. Toxina Cry e aminopeptidases (APNs) que foram modeladas por homologia.

Proteína-alvo	Número de acesso	Molde	PDB ID
Cry1Ab	CAA28405.1	Cry1Aa	1CIY
APN1Ms	CAA61452.1	APN humana	2YD0
APN1TI	transcritoma	APN humana	2YD0
APN3TI	transcritoma	APN humana	2YD0
APN4TI	transcritoma	APN humana	2YD3

As sequências de aminoácidos das proteínas modeladas foram submetidas a três servidores diferentes, PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) e PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) para predição da estrutura secundária das proteínas. Essa informação foi útil para melhorar o alinhamento entre a sequência molde e a sequência alvo. Em seguida as sequências de aminoácidos das proteínas-alvo foram submetidas ao servidor M4T v.3.0 (<http://manaslu.aecom.yu.edu/M4T/>) para busca de moldes cristalográficos a partir da identidade de aminoácidos. Esse servidor realizou um alinhamento com as melhores estruturas encontradas. Esse arquivo de alinhamento foi inspecionado manualmente e falhas foram corrigidas de acordo com a predição da estrutura secundária realizada previamente. Os alinhamentos foram submetidos ao programa MODELLER v.9.10 para gerar 100 estruturas-modelo (FISER e SALI, 2003).

Dentre as 100 estruturas geradas para cada proteína, o programa MODELLER calculou um potencial estatístico conhecido como DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*), que atribuiu um valor de energia para cada modelo gerado. Os modelos com os menores valores de DOPE representam as estruturas mais estáveis das proteínas (SHEN e SALI, 2006) e foram selecionadas para as análises subsequentes.

Cada modelo foi analisado com o programa PROCHECK, presente no banco de dados PDBsum (LASKOWSKI *et al.*, 1997). As regiões desfavoráveis consideradas de baixa qualidade, caso identificadas pelo Ramachandran, tiveram o seu alinhamento reformulado para garantir a melhor precisão possível. O alinhamento corrigido foi submetido ao MODELLER para gerar o novo modelo.

2.6 Sistemas simulados

Para os estudos de DM foram escolhidas quatro toxinas: Cry1Aa (PDB: 1CIY), Cry1Ab (modelada a partir de Cry1Aa), Cry1Ac (modelada a partir de Cry1Aa – modelo gentilmente cedido pelo Dr. Wagner Lucena) e Cry2Aa (PDB: 1I5P). Além de serem as toxinas que apresentam muita informação na literatura científica, elas foram as mesmas utilizadas nos ensaios de atividade contra larvas de *T. licus licus* e servirão de modelo para estudar o mecanismo molecular de interação das toxinas com os receptores das células do epitélio intestinal.

As proteínas a serem caracterizadas como possíveis receptores em estudos de DM foram as mesmas citadas no capítulo 1 do presente trabalho e consistem em três aminopeptidases N identificadas a partir do transcrito da broca-gigante, assim como a APN1 de *M. sexta* (número de acesso do GenBank: CAA61452.1). Foram utilizadas como molde as informações de coordenadas dos cristais de uma aminopeptidase humana (PDB: 2YD0). A APN1 de *M. sexta* foi utilizada neste trabalho por ser uma fonte rica de informações, pois a proteína já foi caracterizada experimentalmente como receptor das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (PIGOTT e ELLAR, 2007), além de já ter sido caracterizada quanto a diversas outras características como glicosilação (STEPHENS *et al.*, 2004), simulação de *docking* com a toxina Cry1Ac (TAJNE *et al.*, 2012) entre outras.

2.7 Dinâmica molecular

As simulações de DM foram executadas utilizando o pacote de programas GROMACS v.4.5.3 (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995) e o campo de força GROMOS 43^a1 (VAN GUNSTEREN, 1996).

O protocolo de simulação foi realizado de acordo com DE GROOT; GRUBMÜLLER (2001). Para a montagem dos sistemas, cada proteína foi solvatada em uma caixa cúbica com condições periódicas de contorno e utilizando como solvente, moléculas de água SPC (*Single Point Charge*) (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987). Os contra-íons cloreto ou sódio, quando necessários, foram adicionados aos sistemas com o objetivo de neutralizar a

carga líquida dos mesmos. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método *Particle-Mesh Ewald* (PME) com raios de corte de Coulomb e van der Waals de 9 Å (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). Para a restrição das ligações covalentes foi aplicado o método Lincs (HESS *et al.*, 1997), a fim de possibilitar 2 fs como passo de integração. Para todas as simulações, a temperatura foi mantida a 310 K. O acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão foi empregado para manter a temperatura e pressão constantes. As constantes de acoplamento foram de $\tau = 0,1$ ps e $\tau = 0,5$ ps, respectivamente (BERENDSEN *et al.*, 1984) e a constante dielétrica do meio foi de $\epsilon = 1$.

Inicialmente foi realizada uma termalização que promoveu um aquecimento gradativo dos sistemas, a fim de evitar as deformações nas proteínas estudadas. Este aumento gradual da temperatura consistiu em um passo de 5 ps a 50 K com restrição de posição, seguido de seis outros passos de 5 ps com aquecimento lento de 50 K a 310 K. Com isso a cada passo havia um aumento da temperatura em 50 K.

Ao final da termalização, os sistemas aquecidos a 310 K e em estado de equilíbrio seguiram a simulação até 50.000 ps ou 50 ns.

2.8 Simulação de ligação por *docking* molecular

O *docking* molecular foi utilizado com o intuito de buscar uma maneira de mimetizar a formação de heterodímeros entre toxinas Cry e os receptores APN de *M. sexta* e de *T. licus licus* e simular a interação dessas proteínas durante o primeiro passo do mecanismo de ação das toxinas, ou seja, a ligação da toxina em sua forma monomérica ao receptor.

As coordenadas atômicas dos modelos a 50 ns obtidos após DM foram submetidas ao programa ClusPro (COMEAU *et al.*, 2004). Segundo os modelos propostos na literatura, há uma concordância quanto a participação das alças 2 e 3 do domínio II das toxinas Cry1A no processo de ligação com os receptores APN. Para Cry1Aa, os aminoácidos que compõem a alça 2 estão entre as posições R367 – Q378, enquanto que a alça 3 é composta pelos aminoácidos A441 – V444. Para Cry1Ab e Cry1Ac, a alça 2 é representada pelos resíduos R336 – Q347 e a alça 3 é composta pela região S406 – S414. Essas regiões foram escolhidas como ligantes para os modelos das toxinas enquanto que nenhuma restrição de região foi imposta para os modelos dos receptores. Os resultados de melhor energia e coincidentes com os dados de interação descritos na literatura foram selecionados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise do perfil protéico dos cristais

A análise do perfil protéico dos cristais demonstrou bandas de 130 kDa para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e de 72 kDa para a proteína Cry2Aa (Figura 16). A presença de rastros no gel deve-se, provavelmente, a presença de outras proteínas dos cristais que não correspondem às toxinas Cry ou à degradação por proteases ou quebra mecânica após a solubilização. Apesar disso, o perfil protéico das toxinas está de acordo com o descrito na literatura (HOFTE e WHITELEY, 1989; SCHNEPF *et al.*, 1998).

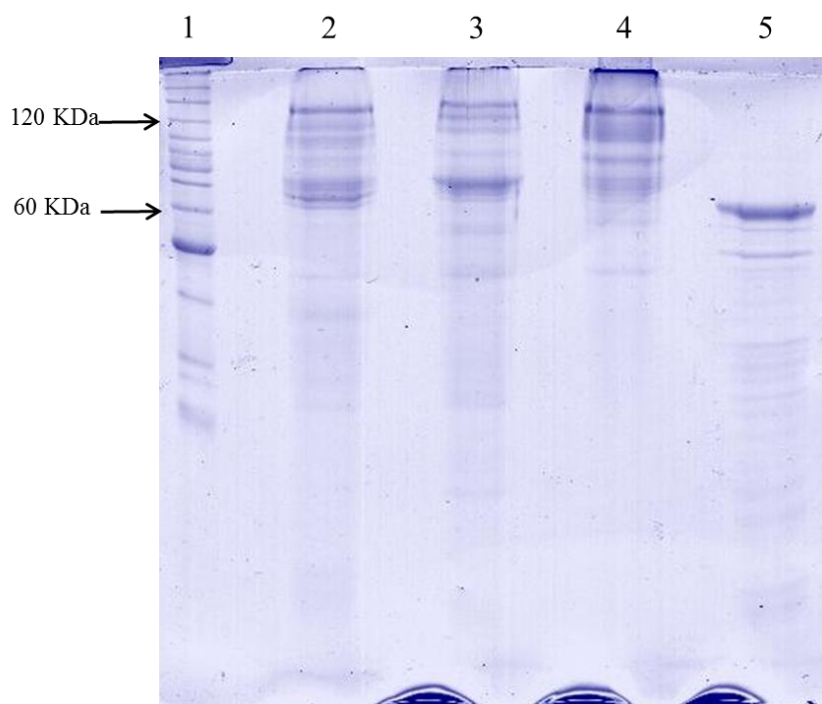


Figura 16. Perfil protéico dos cristais solubilizados contendo as toxinas Cry após eletroforese em gel de acrilamida 12%. 1) *Benchmark Protein Ladder* (Invitrogen). 2) Cry1Aa. 3) Cry1Ab. 4) Cry1Ac. 5) Cry2Aa.

3.2 Ensaios de toxicidade

Para a determinação da atividade das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, foram realizados bioensaios utilizando larvas neonatas de *T. licus licus*, onde foram testadas diluições seriadas da concentração das proteínas. A figura 17 mostra a mortalidade observada, de acordo com a concentração das toxinas. Para a toxina Cry1Aa, o máximo de mortalidade foi observado para concentrações de aproximadamente 2.000 ng/mL de toxina (Figura 17A). Esse mesmo índice foi alcançado em concentrações de aproximadamente 1.000

ng/mL de Cry1Ab (Figura 17B) e 2.000 ng/mL para a toxina Cry1Ac (Figura 17C). Já para a toxina Cry2Aa, a mortalidade continuou aumentando mesmo utilizando as concentrações de 4.000 ng/mL.

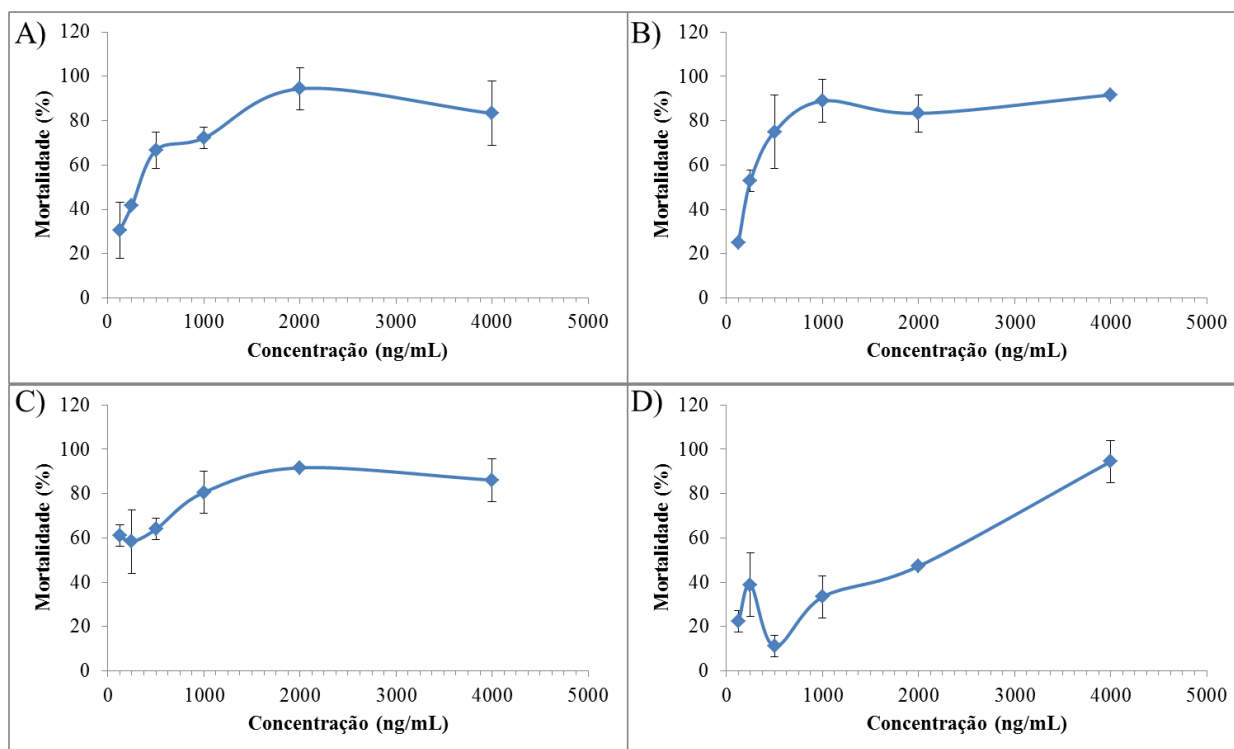


Figura 17. Taxa de mortalidade de larvas neonatas de *T. licus licus* em bioensaios com toxinas Cry em diferentes concentrações. A) Cry1Aa. B) Cry1Ab. C) Cry1Ac. D) Cry2Aa.

Após a realização de testes estatísticos dos dados dos bioensaios foi possível determinar a concentração letal em que há 50% de mortalidade dos insetos (LC_{50}). De acordo com a tabela 6, a toxina que apresentou melhor atividade foi Cry1Ac (139,3 ng/mL, com um intervalo de confiança a 95% de 73,2 - 234,4 ng/mL). Comparada à atividade das outras toxinas, Cry1Ac apresentou atividade 2,1 vezes maior do que Cry1Aa; 1,7 vezes maior do que Cry1Ab e 9,7 vezes maior do que Cry2Aa. A segunda toxina com maior atividade foi Cry1Ab, seguida de Cry1Aa. A toxina Cry2Aa apresentou uma LC_{50} muito alta, quando comparada às outras proteínas, de aproximadamente 1300 ng/mL. Entretanto, levando em consideração o intervalo de confiança de 95%, não houve diferença estatística das atividades das toxinas Cry1A. A única diferença significativa estatisticamente foi observada para a toxina Cry2Aa, pois o intervalo de confiança calculado para a atividade desta toxina não se sobrepôs aos valores das outras toxinas.

Tabela 6. Determinação da LC₅₀ para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa em bioensaios contra larvas neonatas de *T. licus licus*.

Protoxina	LC ₅₀ (ng/mL)	Intervalo de confiança 95%
Cry1Aa	297,3	173,7 – 476,9
Cry1Ab	238,0	135,1 – 386,2
Cry1Ac	139,3	73,2 – 234,4
Cry2Aa	1.353,3	851,2 – 2.268,1

Esses resultados comprovaram o que já vem sendo observado com outras espécies de insetos da ordem Lepidoptera. As toxinas da família Cry1A são aquelas que apresentam a melhor atividade inseticida contra lagartas como observado para *M. sexta* e *Pieris brassicae* (GILLILAND *et al.*, 2002), *P. xylostella* (MONNERAT *et al.*, 1999) e *D. sacharalis* (WU *et al.*, 2009). As quatro toxinas utilizadas neste trabalho já haviam sido testadas contra larvas neonatas de *T. licus licus*, porém utilizando uma dosagem muito alta (1 mg/mL), o que resultou em mais de 90% de mortalidade para todos os ensaios realizados (GOMES JÚNIOR, 2012). Dessa forma, foi necessário realizar uma curva de concentração para determinar o perfil de atividade de cada toxina. Esses dados são importantes, pois irão permitir o planejamento dos próximos trabalhos de evolução molecular *in vitro* de proteínas inseticidas com atividade melhorada especificamente contra esse inseto. Outra característica importante desses dados é que eles permitirão estudar o mecanismo de ação das toxinas no organismo da broca-gigante, a partir da correlação entre dose letal e características de ligação entre as toxinas e os receptores, de acordo com os dados obtidos experimentalmente nos bioensaios do presente trabalho e dos dados da literatura.

3.3 Modelagem das aminopeptidases e da toxina Cry1Ab

3.3.1 Descrição da estrutura das proteínas modeladas

A busca por sequências similares a Cry1Ab no *GenBank* utilizando o banco de dados PDB encontrou uma sequência protéica como o homólogo mais próximo com 89% de identidade, que corresponde à toxina Cry1Aa (PDB: 1CIY). Após a remoção de parte das regiões N- e C-terminais, visando obter a forma ativa da toxina (GROCHULSKI *et al.*, 1995), o alinhamento com a sequência de Cry1Aa resultou em uma identidade de 88% com cobertura de 51%, variando entre os resíduos 33-610. Da mesma forma que a sequência-molde, o modelo obtido para Cry1Ab apresentou uma estrutura tridimensional com os três

domínios característicos deste grupo de proteínas (DERBYSHIRE; ELLAR; LI, 2001; GROCHULSKI *et al.*, 1995; LI; CARROLL; ELLAR, 1991) (Figura 18).

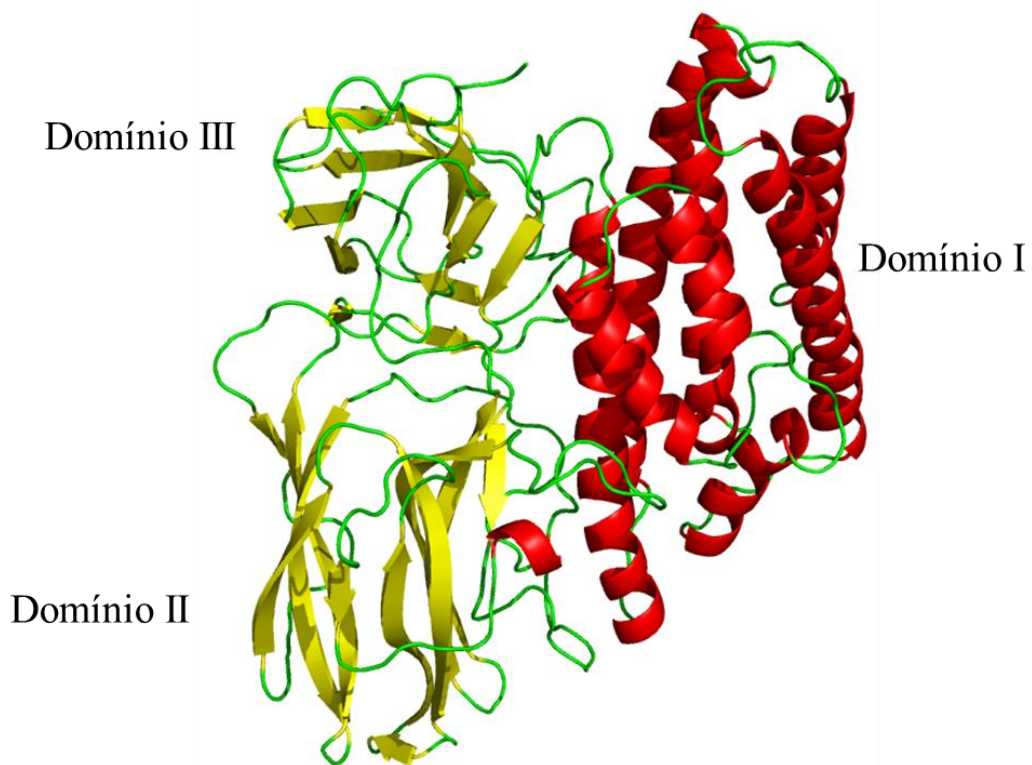


Figura 18. Estrutura tridimensional da toxina Cry1Ab obtida após modelagem por homologia.

A busca por sequências similares a APN1Ms realizada seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente encontrou a estrutura cristalográfica de uma aminopeptidase humana (PDB: 2YD0) como a que apresentou maior homologia. A identidade entre as sequências de aminoácidos foi de 28%, com uma cobertura de 88%. Após inspeção visual das sequências, exclusão da região correspondente ao peptídeo sinal e correção de erros de alinhamento, a identidade aumentou para 56% com uma cobertura de 96%, variando entre os resíduos 26 - 934.

Para a modelagem das APNs de *T. licus licus* foi utilizada como molde a mesma estrutura cristalográfica da aminopeptidase humana (PDB: 2YD0). No caso da APN1TI, foi observada uma identidade de 27% e cobertura de 86% que, após a edição das sequências, mudou para 30% de identidade e 97% de cobertura. O alinhamento com a sequência de APN3TI mostrou uma identidade de 28% com 98% de cobertura, sendo que após a edição das sequências a identidade foi alterada para 47%. Para a APN4TI, a identidade inicial observada

foi de 28% com 97% de cobertura. Após a edição da estrutura primária a identidade observada aumentou para 36%.

De uma maneira geral, todos os modelos de APNs gerados resultaram em uma proteína com estrutura globular composta por 4 domínios, também observáveis no arquivo de cristalografia da aminopeptidase humana, mas com algumas diferenças de tamanho principalmente nas regiões de alças (Figura 19).

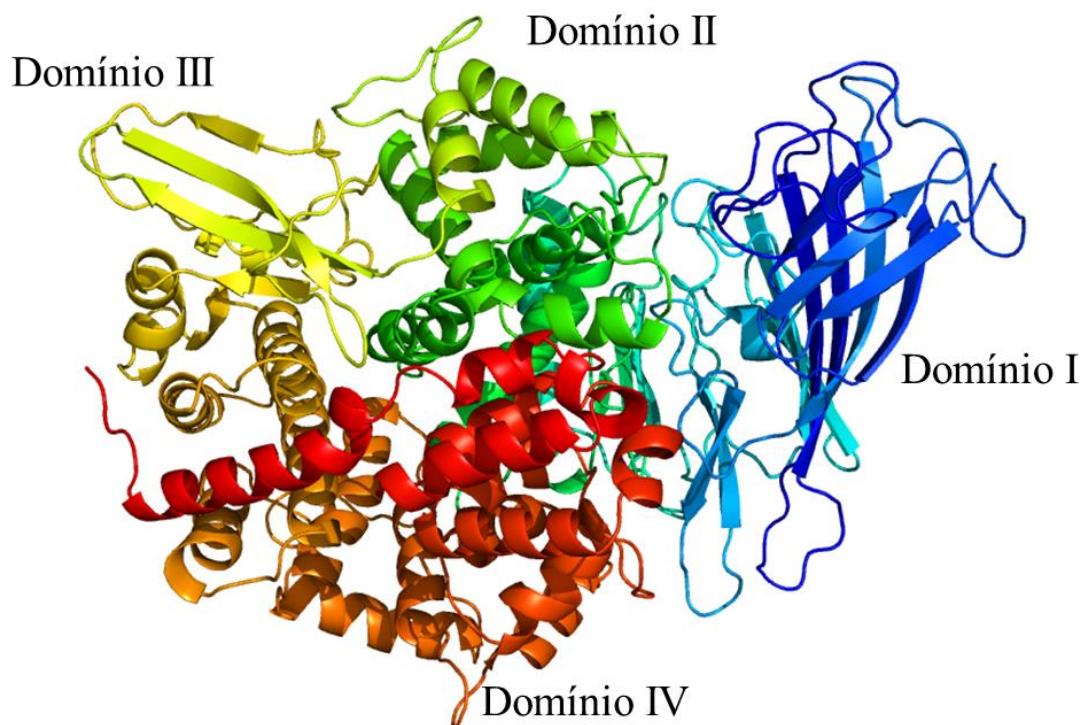


Figura 19. Estrutura tridimensional da APN1T1 obtida após modelagem por homologia.

3.3.2 Validação dos modelos

Os resultados da predição da estrutura secundária utilizando os programas PSIPRED, PHYRE2 e SWISS-MODEL coincidiram com a estrutura secundária final dos modelos obtidos. Além disso, os gráficos de Ramachandran gerados utilizando o programa PROCHECK permitiram identificar falhas na montagem dos modelos, quando existentes. No caso do modelo da toxina Cry1Ab, o programa identificou que 98% dos resíduos de aminoácidos foram encontrados nas regiões permitidas e favoráveis, enquanto que 2% foram identificados nas regiões desfavoráveis (Figura 20A). Para a APN1 de *M. sexta* 99,8% dos resíduos encontraram-se nas regiões permitidas e favoráveis e apenas 0,2% nas regiões

desfavoráveis (Figura 20B). Para APN1 de *T. licus licus* 99,9% dos resíduos foram identificados nas regiões permitidas e favoráveis e 0,1% nas desfavoráveis (Figura 20C). Para APN3 de *T. licus licus* 98,8% dos resíduos foram encontrados nas regiões permitidas e favoráveis e 1,2% nas regiões desfavoráveis (Figura 20D). No caso da APN4 de *T. licus licus*, 99,6% foram identificados nas regiões permitidas e favoráveis e 0,4% nas regiões desfavoráveis (Figura 20E).

Esses dados mostraram que todos os modelos obtidos neste trabalho apresentaram uma estrutura compatível com o padrão de coordenadas atômicas conhecido para proteínas de diferentes organismos. Esses modelos correspondem à forma ativa das proteínas, tanto das toxinas Cry, quanto dos receptores. Isso é de extrema importância para obter-se maior confiança nos resultados dos experimentos de DM e *docking* molecular e garantir um mecanismo de ação das proteínas mais aproximado ao que é observado *in vivo*. Portanto, as extremidades N-terminal e C-terminal das toxinas Cry não foram modeladas. No caso das APNs, além da remoção do peptídeo sinal na região N-terminal, também foi necessária a exclusão de parte da região C-terminal, correspondente ao sítio de adição da âncora de GPI, pois não há molde conhecido desta estrutura oriundo de células de insetos, o que implicaria na modelagem de uma alça que não existe no sistema estudado.

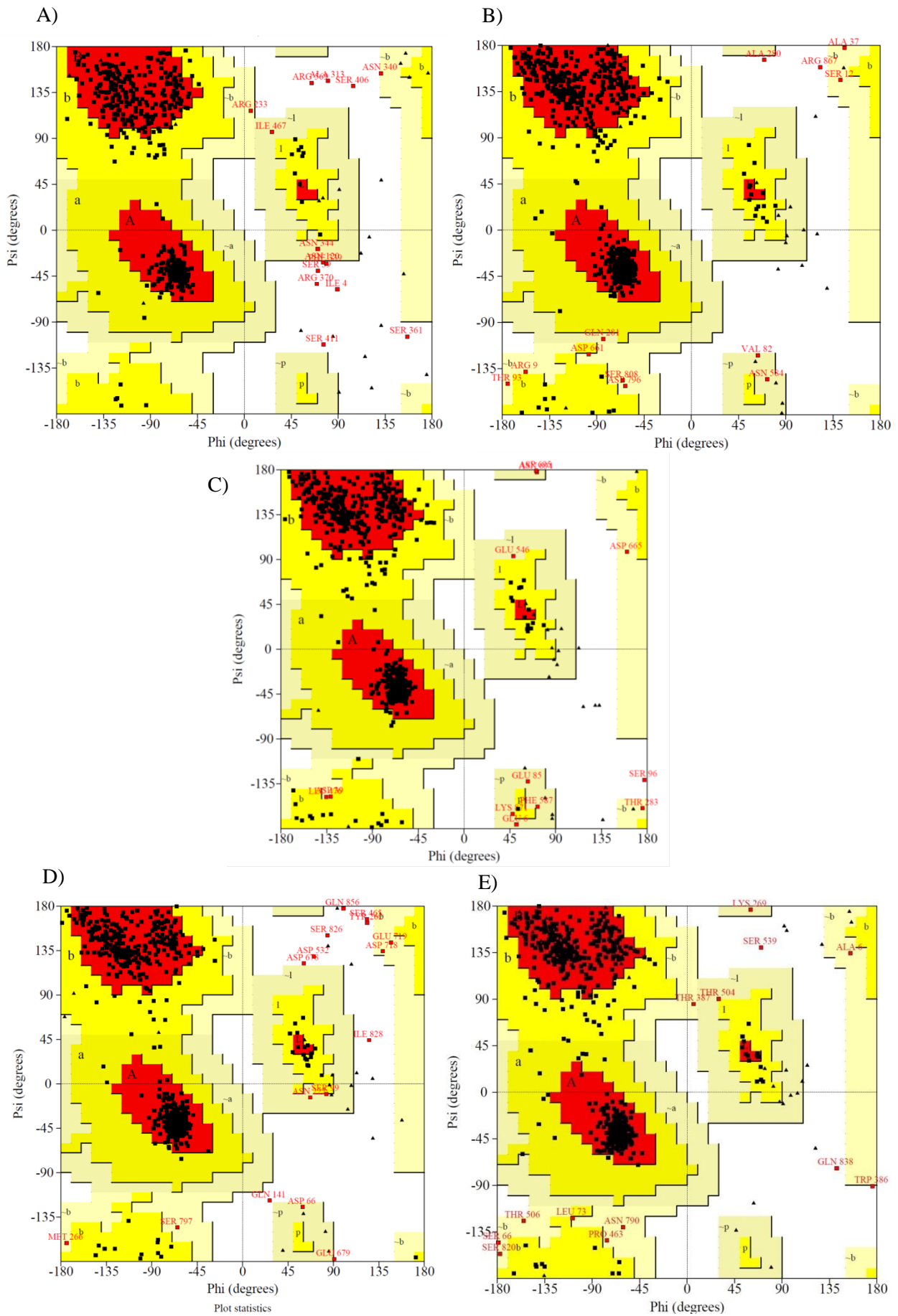


Figura 20. Gráfico de Ramachandran das proteínas modeladas. A) Cry1Ab. B) APN1Ms. C) APN1TI. D) APN3TI. E) APN4TI.

3.4 Dinâmica molecular das toxinas Cry e das aminopeptidases

Os sistemas contendo as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, assim como as proteínas APN1Ms, APN1T1, APN3T1 e APN4T1 foram simulados por 50 ns. Esse tempo foi necessário, pois de acordo com a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*), realizada pelo pacote de programas GROMACS, foi nesse intervalo de tempo em que os modelos convergiram para uma conformação final ou que não sofriram uma mudança muito severa em suas topologias.

O desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos dos sistemas foi calculado a partir das trajetórias entre o intervalo de 35 ps (resultante do passo de termalização, explicado na seção 2.7, cap.II) a 50 ns. A variação do RMSD em função do tempo fornece uma medida da convergência das propriedades dinâmicas das proteínas. Em média, os RMSDs variaram de 0,2 a 0,45 nm para todas as APNs, sendo que a menor variação foi observada para APN4T1 (Figura 21). No caso das toxinas Cry, o RMSD variou de 0,1 a aproximadamente 0,4 nm para Cry1Aa e Cry1Ac e de 0,1 a 0,35 nm para Cry1Ab e Cry2Aa, sendo que a toxina Cry2Aa sofreu uma variação brusca em aproximadamente 32 ns, mas que não resultou em mudanças na estrutura da proteína (Figura 22).

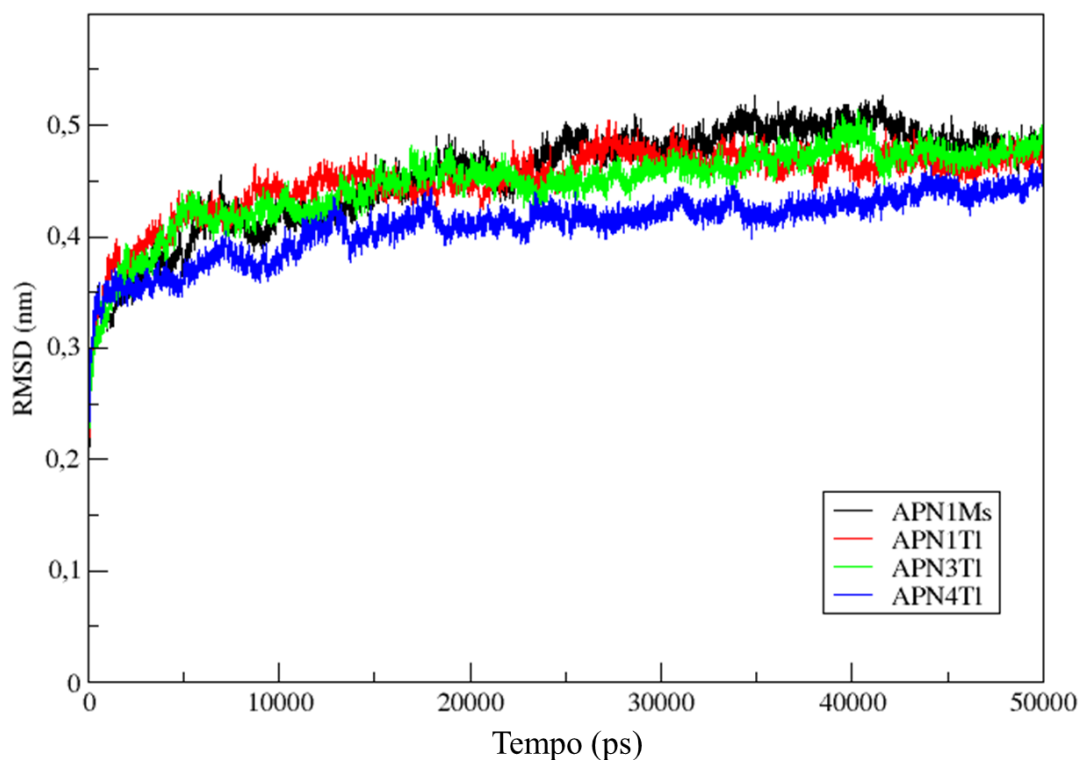


Figura 21. Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos sistemas simulados para APN1Ms (preto), APN1T1 (vermelho), APN3T1 (verde) e APN4T1 (azul).

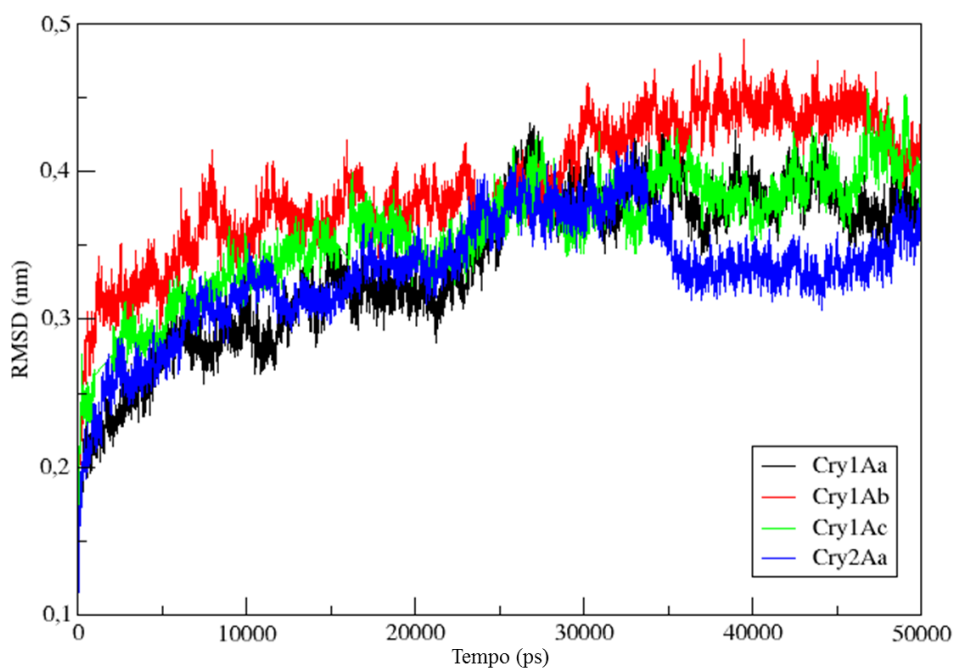


Figura 22. Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos sistemas simulados para Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul).

Para determinar a estabilidade da estrutura globular das proteínas foram realizadas análises de raio de giro (R_g). Os R_g s para os sistemas de simulação das APNs mostraram uma diferença estrutural entre a APN1Tl e o restante das proteínas. Enquanto APN1Tl variou entre 2,925 - 2,85 nm, as APN1Ms, APN3Tl e APN4Tl variaram entre 2,875 - 2,725. Esses resultados indicaram que a APN1Tl apresentou uma distância maior entre o centro de massa da proteína e as suas extremidades, que a manteve com um grau de compactação muito menor se comparada com as outras moléculas (Figura 23).

O raio de giro observado para as toxinas Cry mostrou que as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab variaram entre 2,55 - 2,6 nm, Cry1Ac variou entre 2,55 - 2,65 nm, enquanto a toxina Cry2Aa apresentou uma estrutura muito mais compacta, com R_g variando entre 2,525 - 2,475 nm. De uma maneira geral, a variação do raio de giro das toxinas não sofreu uma variação elevada, o que as manteve com a estrutura estável. O maior grau de compactação da toxina Cry2Aa deveu-se ao fato de que esta toxina apresenta uma estrutura primária reduzida, o que reflete em uma sua estrutura tridimensional menor, principalmente nas regiões das alças (Figura 24).

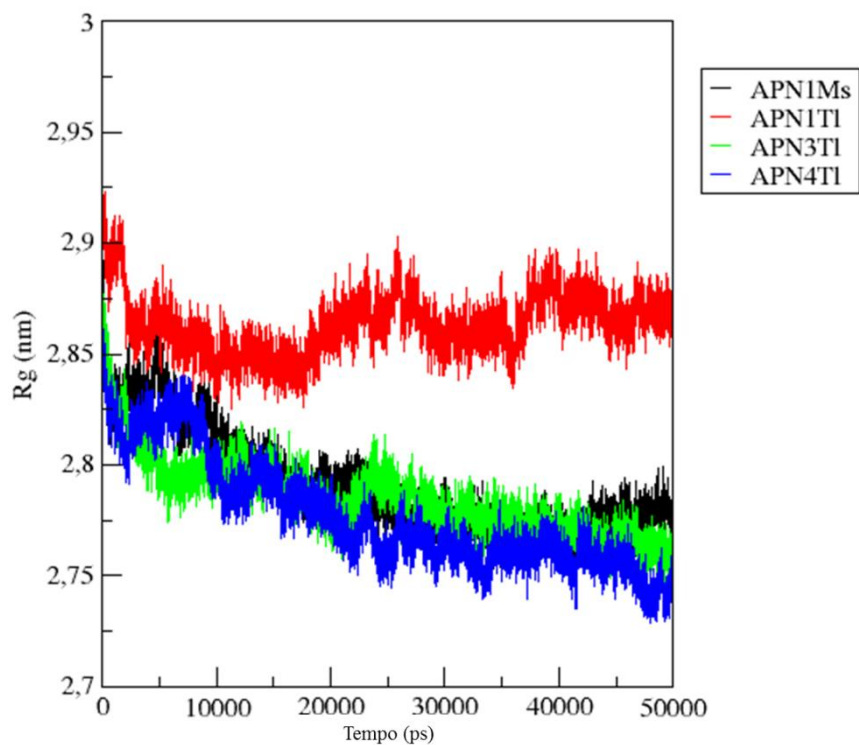


Figura 23. Raio de giro (R_g) das estruturas dos sistemas simulados para APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul).

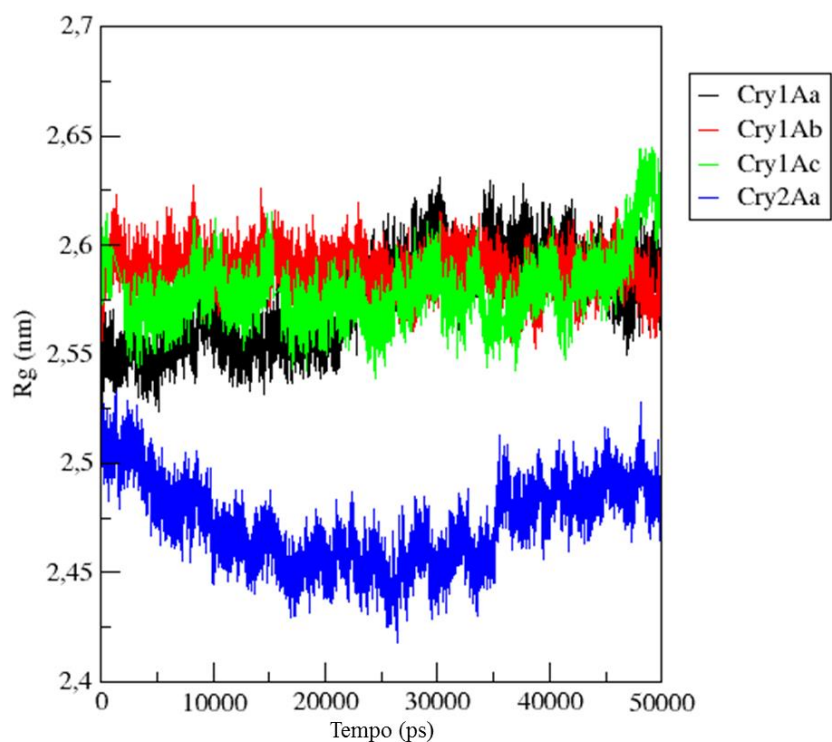


Figura 24. Raio de giro (R_g) das estruturas dos sistemas simulados para Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul).

A análise das flutuações quadráticas médias (RMSF) para os resíduos apresentou perfis semelhantes entre as toxinas Cry e entre as APNs. Os picos das curvas correspondem às regiões mais flexíveis que, em muitos casos são representadas pelas alças das proteínas. O RMSF das APNs mostrou que, de uma maneira geral, as regiões mais flexíveis encontram-se na região N-terminal das proteínas, entre os resíduos de aminoácidos 40 e 150. A APN1Ms também apresentou uma maior flexibilidade na região C-terminal, entre os resíduos 450 e 700 (Figura 25).

De acordo com dados da literatura, a região entre os resíduos Ile135 – Pro198 das APNs 3 de *B. mori* e *P. xylostella* e APN 1 de *M. sexta* corresponde ao sítio de ligação comum das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (NAKANISHI *et al.*, 2002; NAKANISHI *et al.*, 1999). Nos modelos utilizados no presente estudo, essa região está representada entre os resíduos 110 – 175 para APN1Ms e APN1TI e resíduos 105 – 155 para APN3TI e APN4TI, que se mostraram flexíveis.

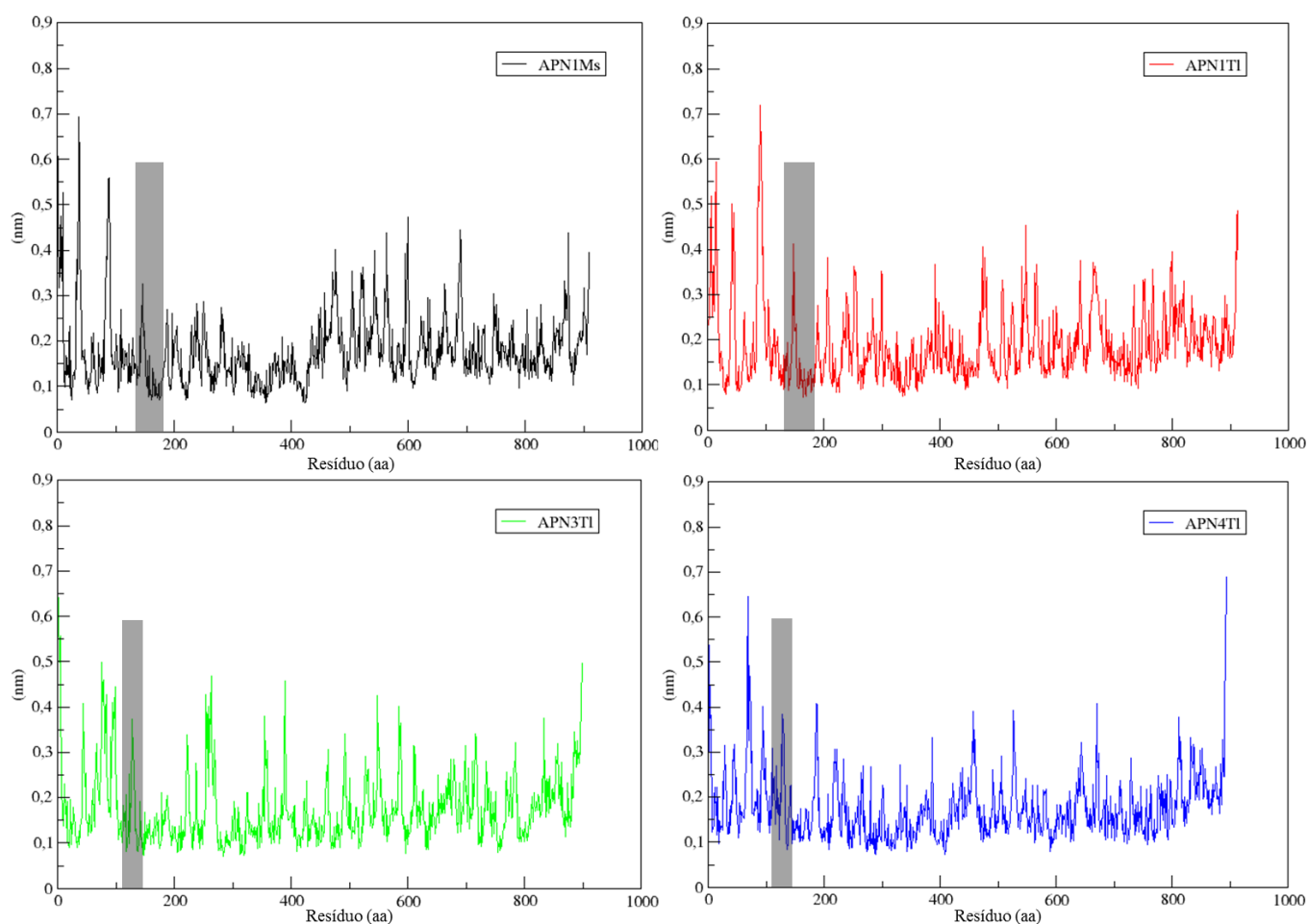


Figura 25. Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul). O quadro cinza indica a região de ligação das toxinas Cry1A aos receptores APN.

Nos modelos das toxinas Cry, a flexibilidade foi observada de maneira mais distribuída ao longo da cadeia polipeptídica, entretanto, Cry2Aa mostrou uma flexibilidade geral muito menor quando comparada com as outras proteínas. As regiões correspondentes aos sítios de ligação aos receptores também se mostraram bastante flexíveis. Entre as quatro toxinas, Cry1Aa foi a molécula que apresentou menor flexibilidade nas alças 2 e 3 enquanto Cry1Ab apresentou a maior variação nas regiões ligantes e no domínio II (região entre os aminoácidos 230 – 430) de uma forma geral. Outro detalhe interessante foi o pico entre os aminoácidos 450 – 500 de Cry1Ac, essa região corresponde ao sítio de reconhecimento de Gal-Nac e mostrou que a flexibilidade dessa região pode ser a característica que melhor contribuiu para permitir a ligação aos açúcares presentes nos receptores (Figura 26).

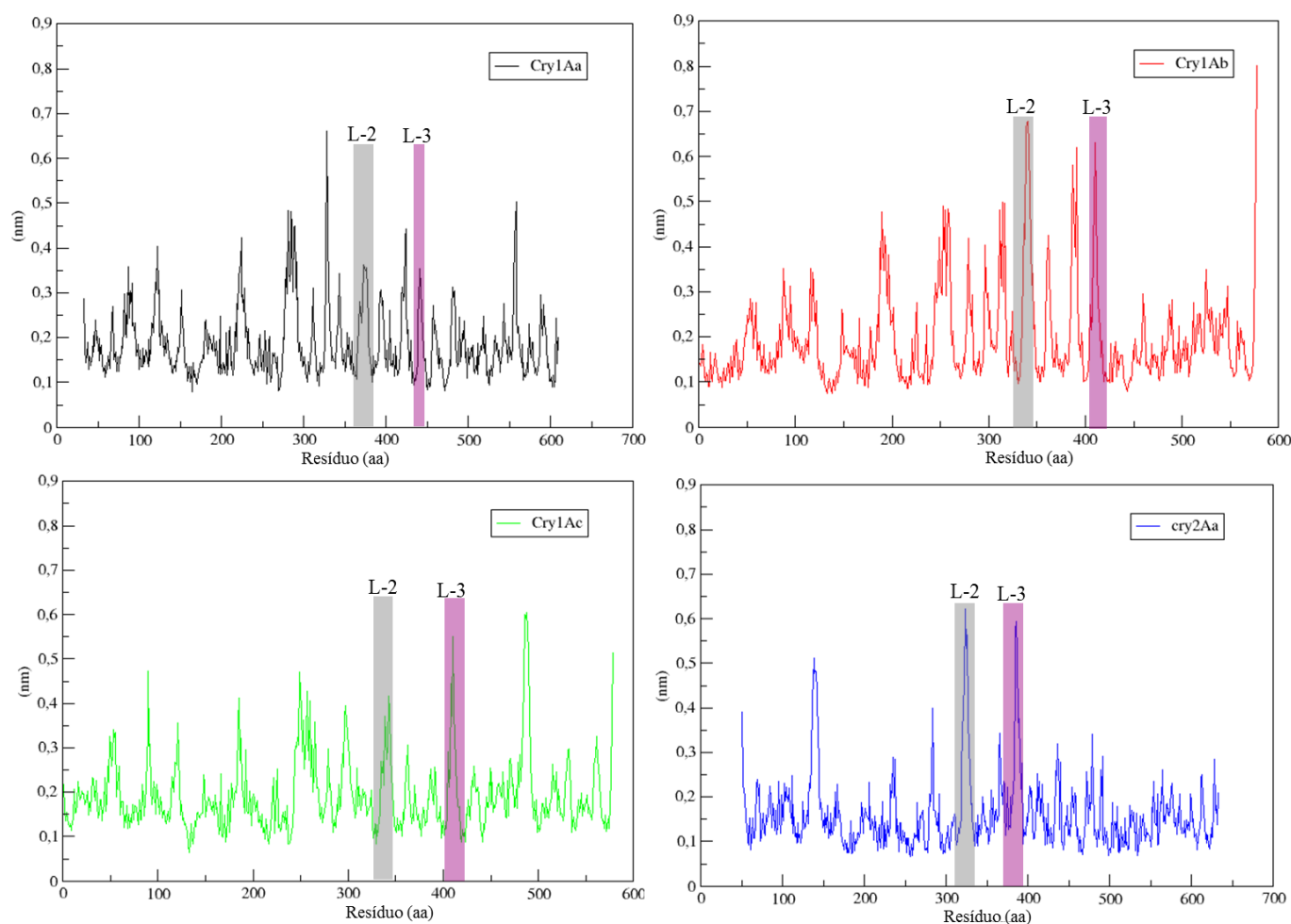


Figura 26. Flutuações quadráticas médias (RMSF) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. Toxina Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul). L-2 indica os resíduos que formam a alça 2 (*loop 2*). L-3 indica os resíduos que formam a alça 3 (*loop 3*).

Outra análise de grande importância que pode ser realizada com os dados da dinâmica molecular é a predição da superfície de acesso ao solvente das proteínas (*Solvent accessible surface – SAS*). Esse dado mostra a média da alteração da superfície de contato disponível ao longo da simulação para cada resíduo ou átomo da molécula. De acordo com o SAS calculado para as APNs existem diversos pontos que aumentaram a superfície de contato ao longo do tempo, o que indica que essas proteínas possuem uma grande área acessível ao solvente. As regiões de ligação às toxinas se comportaram de maneira semelhante entre todas as proteínas (Figura 27).

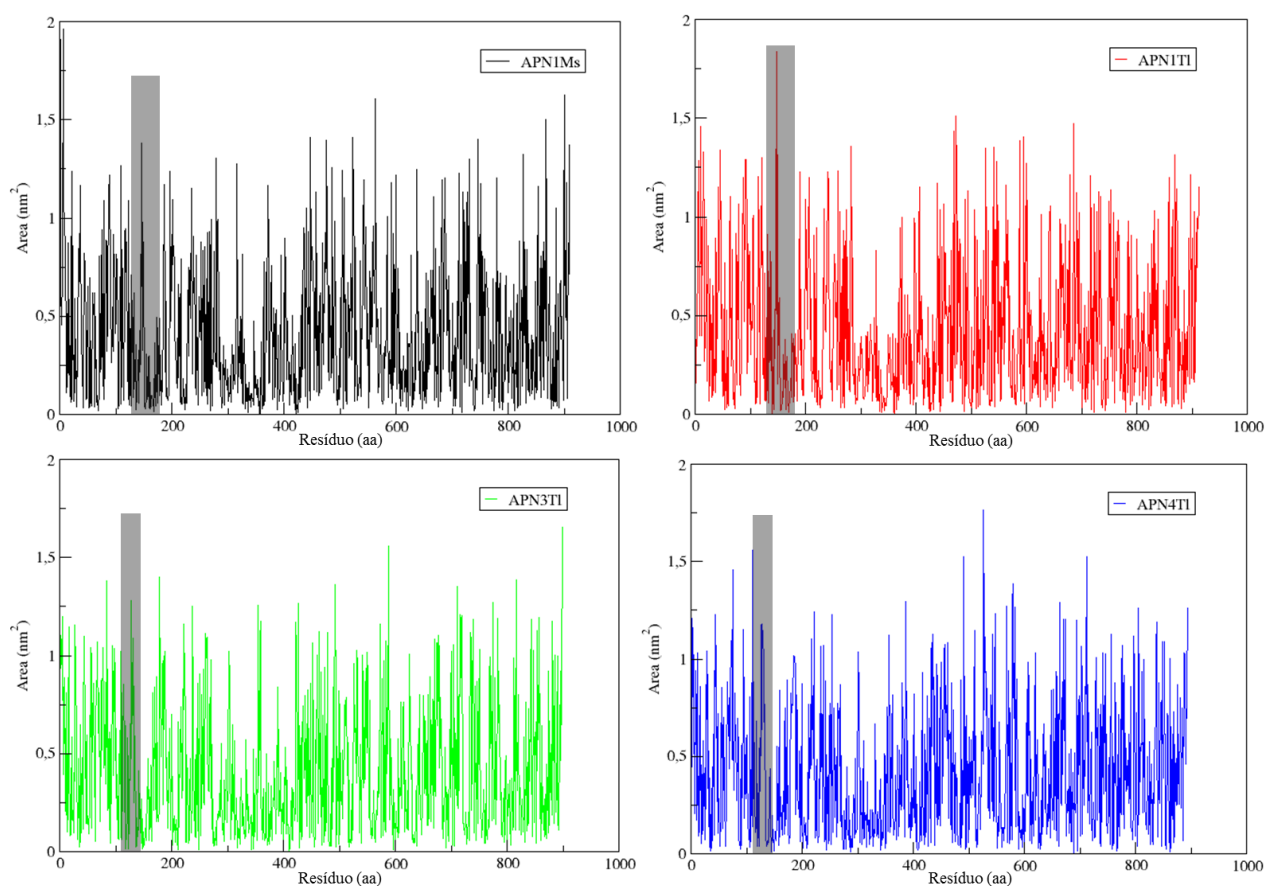


Figura 27. Superfície de acesso ao solvente (SAS) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. APN1Ms (preto), APN1TI (vermelho), APN3TI (verde) e APN4TI (azul). O quadro cinza indica a região de ligação às toxinas Cry1A.

Para as toxinas Cry, o SAS calculado indicou que as regiões correspondentes às alças 2 e 3 aumentaram a área acessível ao solvente, o que pode determinar uma superfície maior para o contato com os receptores, porém, a toxina Cry1Aa apresentou a menor variação na alça 3, enquanto Cry2Aa apresentou a menor variação na alça 2 (Figura 28).

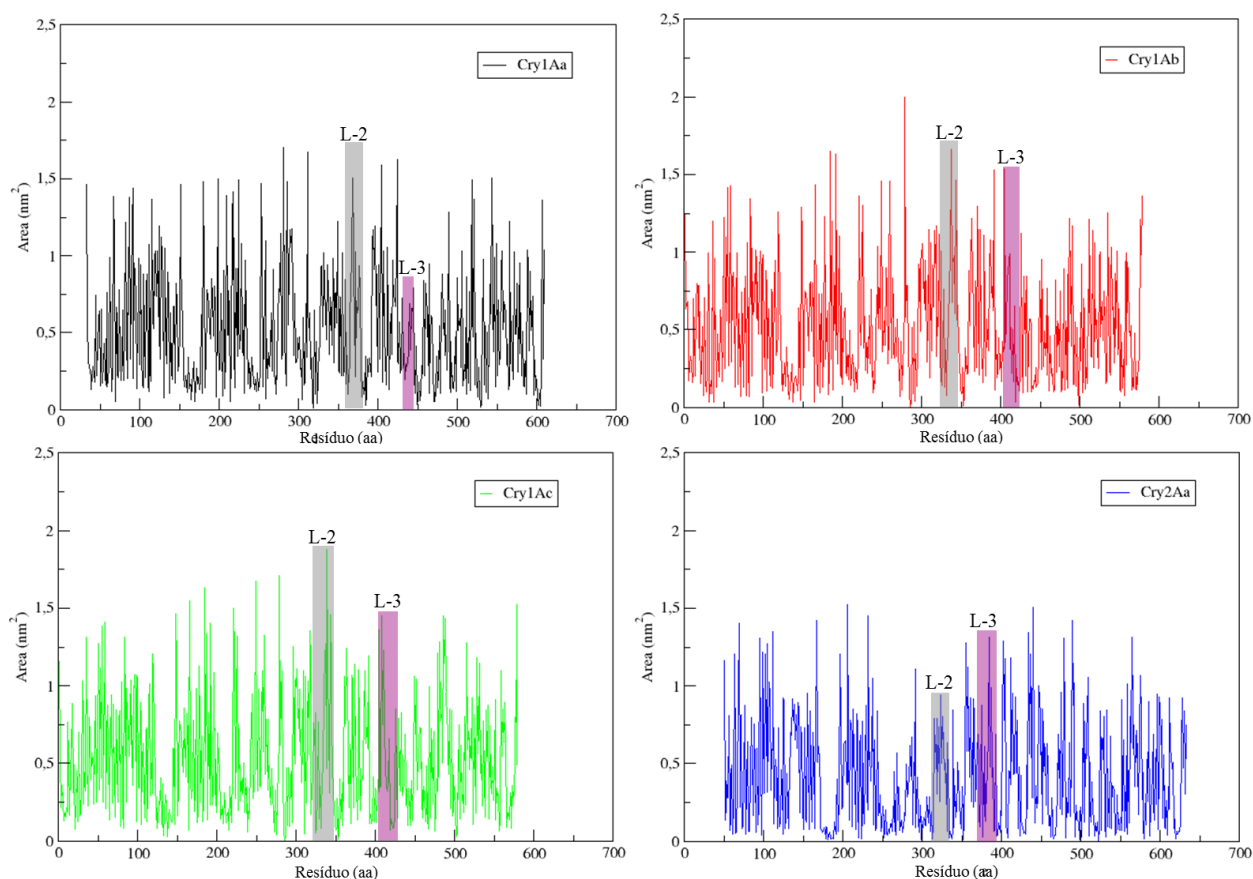


Figura 28. Superfície de acesso ao solvente (SAS) dos modelos após 50 ns de dinâmica molecular. Toxina Cry1Aa (preto), Cry1Ab (vermelho), Cry1Ac (verde) e Cry2Aa (azul). L-2 indica os resíduos que formam a alça 2 (*loop 2*). L-3 indica os resíduos que formam a alça 3 (*loop 3*).

Os RMSDs dos sistemas com as APNs não apresentaram uma variação significativa, o que pode significar que de uma forma geral as moléculas apresentaram um comportamento semelhante ou não sofreram grandes mudanças conformacionais quando aquecidas a 310 K. A única diferença encontrada nos resultados desta análise foi a menor movimentação dos átomos de APN4T1, que resultou em uma variação um pouco menor a 50 ns, se comparada às outras toxinas. Isso pode estar relacionado a uma menor flexibilidade ou a adoção de uma estrutura mais compactada, que dificulta a mudança conformacional da molécula. De fato, o raio de giro calculado para essas proteínas mostrou que a APN1T1 assumiu uma estrutura menos compactada enquanto que as proteínas APN1Ms, APN3T1 e APN4T1 convergiram para uma estrutura tridimensional com raio de giro muito menor.

O RMSF calculado para cada proteína mostrou que existem pontos bastante flexíveis ao longo da cadeia polipeptídica. Nas APNs, as regiões preditas como sítios de ligação das toxinas Cry1A se mostraram muito flexíveis, o que permitiu aumentar a exposição da região

ao solvente o que conseqüentemente pode fornecer uma área maior de contato e favorecer o acoplamento das proteínas ligantes.

Para as toxinas Cry, foram observados em toda a extensão da proteína pontos de grande flexibilidade, inclusive nas alças 2 e 3 do domínio II. Entretanto, no caso da Cry1Aa a alça 3 apresentou uma exposição menor quando comparada com as outras toxinas Cry1A. Essa característica pode causar uma alteração marcante na capacidade de ligação da proteína, o que pode gerar um quadro de toxicidade diferente entre toxinas Cry. De acordo com a LC₅₀ calculada para as toxinas Cry1A nos bioensaios com a broca-gigante, observou-se que Cry1Aa apresentou uma tendência de toxicidade menor. A toxina Cry1Ab apresentou uma flexibilidade muito alta em ambas as alças levando a uma grande exposição dessa região ao solvente, o que pode melhorar a interação entre a toxina e o receptor. A toxina Cry1Ac apresentou flexibilidade menor na alça 2, porém mais alta na alça 3 e também na região de ligação a Gal-Nac, o que é sugerido por alguns autores como um sítio de interação que aumenta a afinidade da toxina ao receptor e potencializa a toxicidade, apesar de não se essencial para a atividade da proteína (ATSUMI *et al.*, 2005; DE MAAGD *et al.*, 1999; PARDO-LOPEZ *et al.*, 2006).

3.5 Docking molecular

As estruturas das proteínas obtidas após 50 ns de dinâmica molecular foram utilizadas para os cálculos de *docking* molecular. A APN1 de *M. sexta* já foi descrita na literatura como receptora das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e, dessa forma, serviu como referência para o estudo *in silico* da ligação de toxinas Cry nas APNs de *T. licus licus* identificadas no transcrito do inseto. Os dados iniciais utilizados para a escolha das regiões ligantes foram obtidos após extensa busca na literatura. De acordo com o mecanismo de ação mais aceito, as toxinas da classe Cry1A se ligam aos receptores do tipo APN por um sítio comum, localizado principalmente na alça 3 do domínio II e também de maneira mais fraca à alça 2 do domínio II (ARENAS *et al.*, 2010; GOMEZ *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2009). Além disso, Cry1Ac também pode se ligar por meio da região da folha β -16 do domínio III, que se assemelha a uma lectina, uma proteína que se liga a carboidratos como N-acetilgalactosamina (ATSUMI *et al.*, 2005; DE MAAGD *et al.*, 1999). Devido à impossibilidade de simular as glicosilações do receptor, a participação desta região no mecanismo de ação não pôde ser estudada no presente trabalho.

O sítio de ligação das toxinas Cry1A nas APNs receptoras foi identificado como sendo uma região presente no domínio I. De acordo com Nakanishi e colaboradores (2002), a região entre os resíduos Ile135 – Pro198 apresenta vários aminoácidos conservados entre diferentes espécies de insetos e assim os autores sugeriram o motivo RXXFPXXDEP como a região mais provável de ligação. Ao analisar a região sugerida na estrutura tridimensional das APNs, observou-se que a maioria dos resíduos RXXFPXXDEP se encontram protegidos no interior da molécula e que seria necessária uma grande mudança conformacional para permitir o acesso das toxinas, o que não foi observado em nenhuma estrutura após a simulação e após o *docking* molecular. Dessa maneira foram selecionados os modelos os quais a ligação ocorreu nos resíduos da região ligante que estavam acessíveis ao solvente (Figura 29).

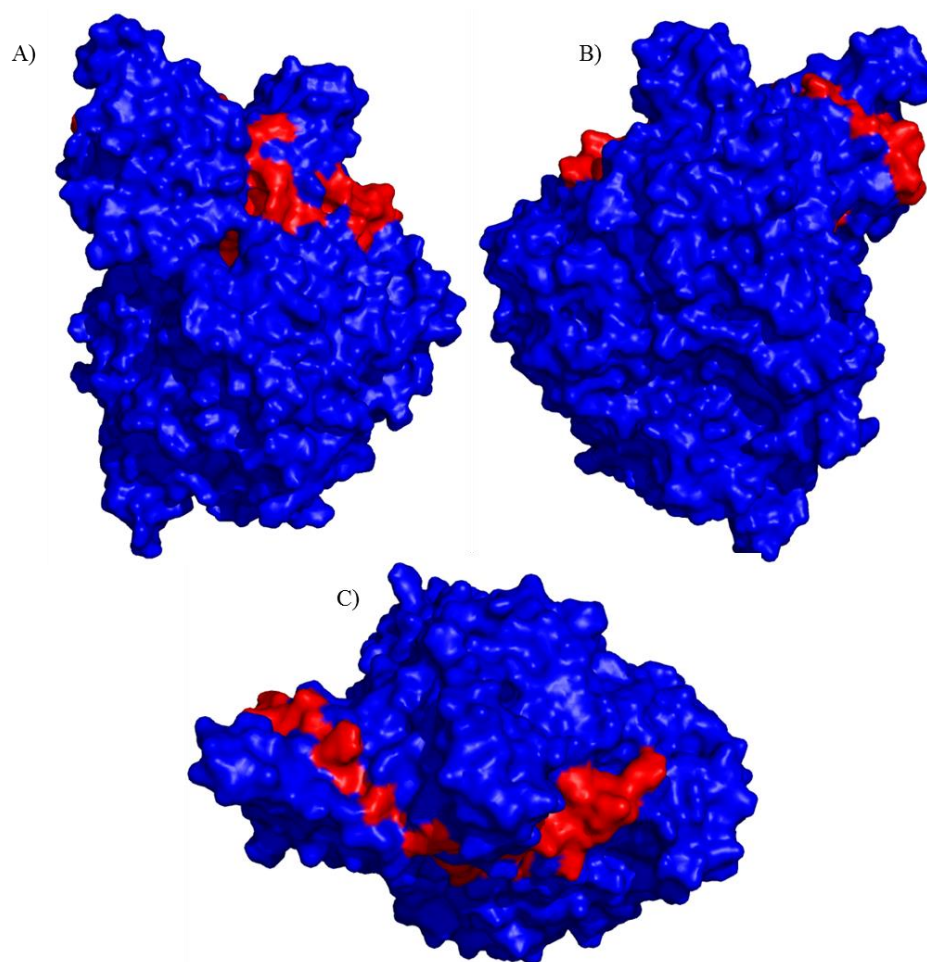


Figura 29. Representação esquemática da região de ligação das toxinas Cry1A na APN1 de *M. sexta*. A) Vista lateral da APN1Ms (azul) indicando a região de ligação (vermelho). B) Giro de 180° em relação à imagem anterior. C) Vista superior da imagem.

3.5.1 Docking das toxinas Cry1A contra APN1 de *Manduca sexta*

O *docking* da toxina Cry1Aa com APN1Ms gerou um modelo o qual a ligação da toxina com o receptor ocorreu apenas por meio da alça 2 do domínio II (Figura 30). Foram identificadas 18 pontes de hidrogênio entre os resíduos e também 152 contatos não ligados (interações hidrofóbicas) que auxiliaram a estabilizar a interação entre as moléculas (Anexo I).

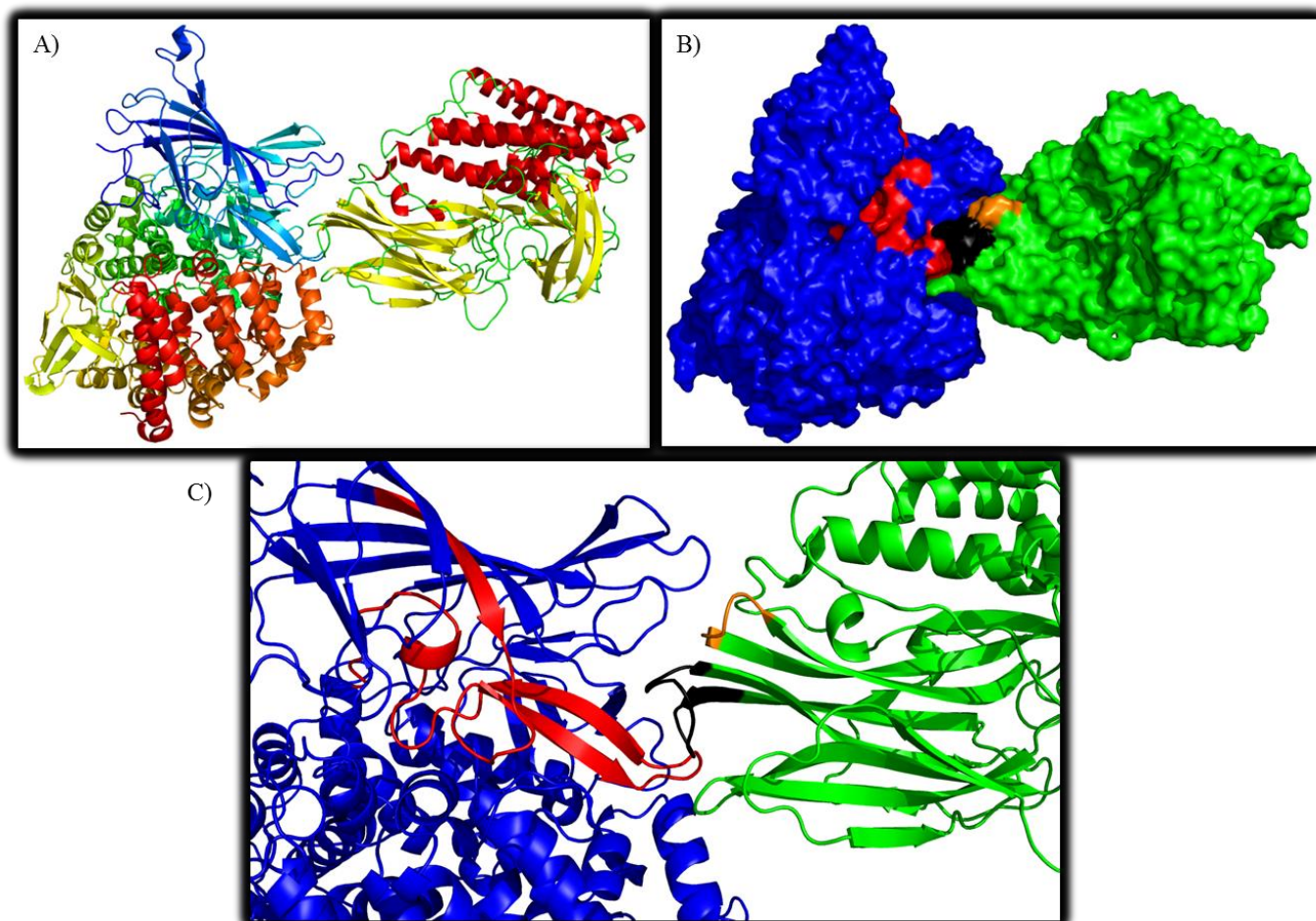


Figura 30. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Aa à APN1Ms. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Aa; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

O melhor modelo obtido para a interação entre Cry1Ab e a APN1Ms mostrou que tanto a alça 2 e a alça 3 se conectaram ao sítio de ligação do receptor. A interação entre as moléculas ocorreu de tal forma que resíduos do domínio III também se ligaram (Figura 31). Essa ligação já foi observada entre a toxina Cry1Aa e a APN1 de *B. mori* (ATSUMI *et al.*, 2005) e mais tarde entre Cry1Ab e APN1 de *M. sexta*, mas essa interação foi considerada

mais importante para a ligação da toxina ao receptor do tipo fosfatase alcalina (ARENAS *et al.*, 2010). De qualquer maneira essa interação pode ocorrer com APN, mesmo que de maneira mais fraca. Foram identificadas 33 pontes de hidrogênio e 312 interações hidrofóbicas entre as moléculas (Anexo II).

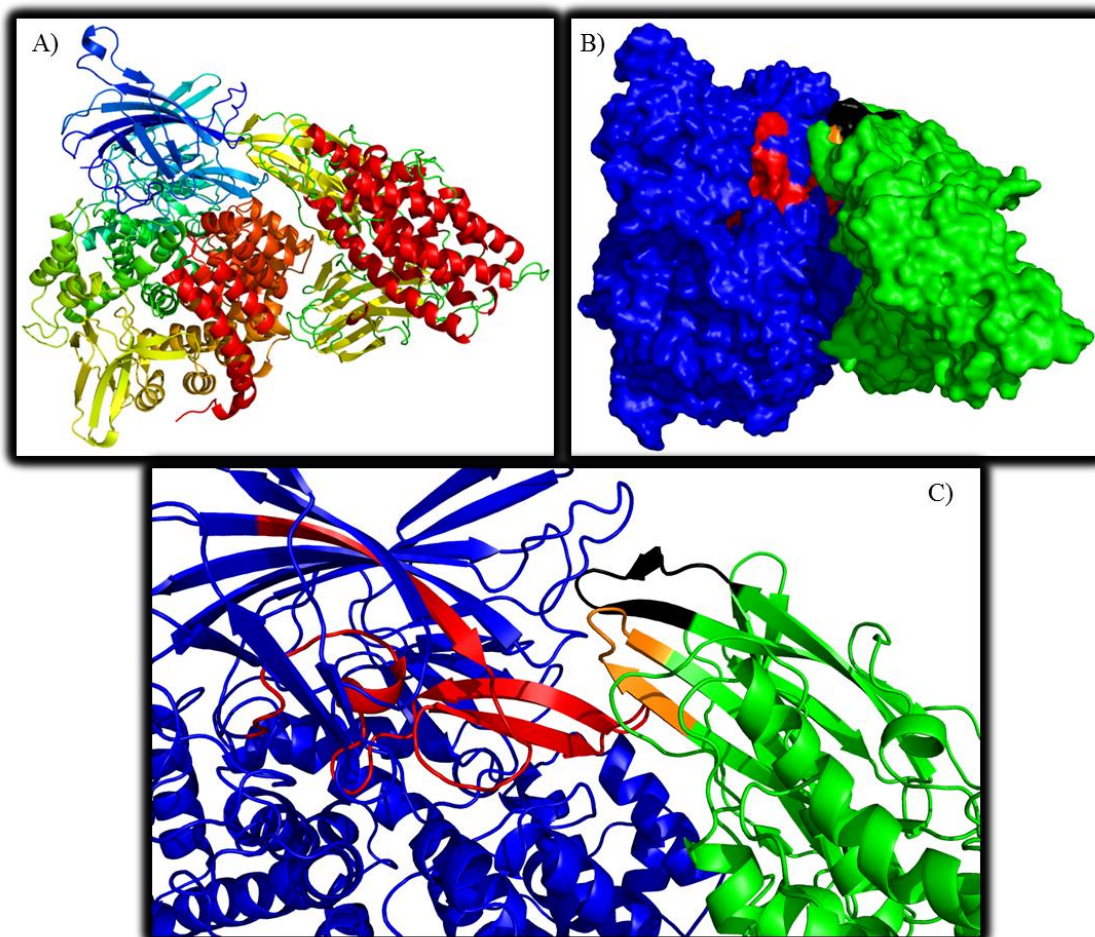


Figura 31. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN1Ms. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Ab; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

A análise da interação entre a toxina Cry1Ac e a APN1Ms apresentou um padrão de ligação muito parecido com o observado com a toxina Cry1Ab. Porém, neste caso, não houve conexão da alça 2 do domínio II com o receptor, mas apenas interações hidrofóbicas dessa região com a proteína de *M. sexta*. A interação com o sítio de ligação do receptor ocorreu por meio da alça 3 do domínio II (Figura 32). Também foram observadas ligações em regiões adjacentes às alças 2 e 3 no domínio II, mas nenhuma delas com o sítio de ligação do receptor. Foram previstas 15 pontes de hidrogênio e 236 contatos não ligados (Anexo III).

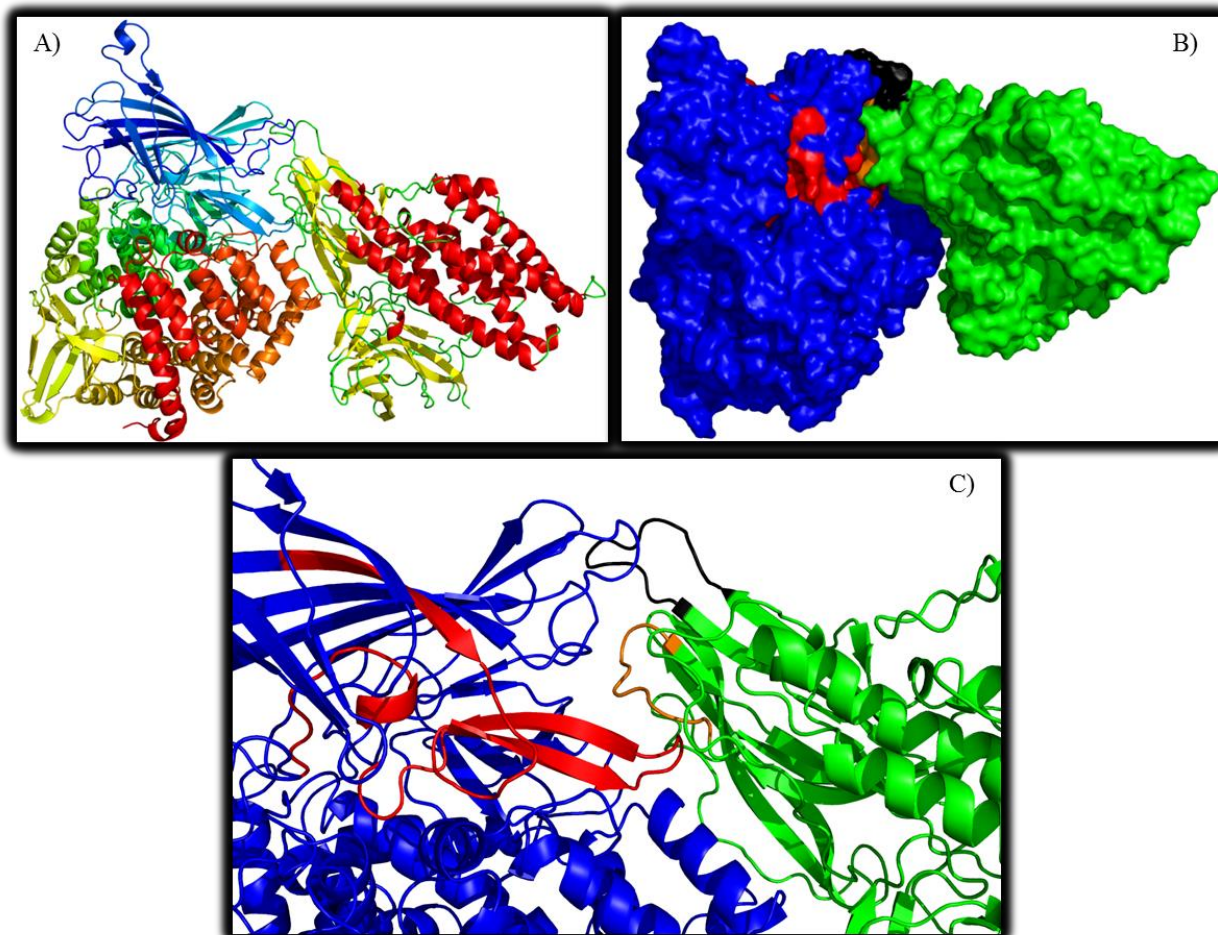


Figura 32. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN1Ms. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Ac; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

3.5.2 Docking das toxinas Cry1A contra APN1 de *Telchin licus licus*

O *docking* das toxinas Cry1A contra as proteínas da broca-gigante foi realizado, tendo como referência o padrão dos modelos observados para *M. sexta*.

O melhor modelo obtido para analisar a interação entre Cry1Aa e APN1Tl gerou um *docking* o qual a ligação ocorreu por meio da alça 2 do domínio II (Apêndice I). Apenas um resíduo da alça 3 apresentou interação por meio de ponte de hidrogênio, mas o pareamento ocorreu com o aminoácido E838 da APN. O restante dos resíduos interagiu por meio de interações hidrofóbicas com o domínio IV da APN. No geral foram previstas 21 pontes de hidrogênio e 230 interações hidrofóbicas (Anexo IV).

Para a interação entre Cry1Ab e APN1TI, foi observada que a ligação entre as proteínas aconteceu por meio da alça 3 e regiões adjacentes à alça 2 (Apêndice II). Nenhum aminoácido da alça 2 interagiu com a molécula por meio de pontes de hidrogênio, porém os resíduos N340, G342, I343 e N344 interagiram por meio de ligações hidrofóbicas com o sítio de ligação do receptor. No total foram identificadas 22 pontes de hidrogênio e 174 interações hidrofóbicas (Anexo V).

Os modelos obtidos visando determinar o padrão de ligação da toxina Cry1Ac e APN1TI mostraram que tanto a alça 2 como a 3 se conectaram ao receptor por meio de pontes de hidrogênio, porém a orientação da interação entre as proteínas foi diferente quando comparada com os modelos obtidos de *M. sexta* (Apêndice III). No melhor modelo obtido, apenas os aminoácidos G342 e G346 da alça 2 interagiram com o sítio de ligação do receptor. Em ambos os casos os aminoácidos das alças 2 e 3 realizaram interações hidrofóbicas com a região de ligação. De uma forma geral foram preditas uma ponte salina, 17 pontes de hidrogênio e 189 interações hidrofóbicas (Anexo VI).

3.5.3 Docking das toxinas Cry1A contra APN3 de *Telchin licus licus*

A análise do *docking* das toxinas contra a APN3TI mostrou que, no caso da Cry1Aa, nenhum modelo obtido apresentou um resultado compatível com os dados da literatura. A toxina se ligou principalmente no domínio III da APN, enquanto nenhum modelo se aproximou da região do sítio de ligação.

O modelo obtido a partir do ensaio com a toxina Cry1Ab mostrou que houve ligação da alça 2 do domínio II e de dois aminoácidos da alça 3 do mesmo domínio ao sítio de ligação da APN3TI (Apêndice IV). O restante dos aminoácidos da alça 3 se ligou por pontes de hidrogênio aos resíduos do domínio IV da APN. De uma maneira geral, foram identificadas uma ponte salina, 18 pontes de hidrogênio e 214 interações hidrofóbicas entre as proteínas (Anexo VII).

O *docking* realizado com a toxina Cry1Ac mostrou que a ligação entre as proteínas ocorreu por meio de 20 pontes de hidrogênio e 203 interações hidrofóbicas (Anexo VIII). Dentre as pontes de hidrogênio, as que se ligaram especificamente ao sítio de ligação da APN pertencem à alça 2 do domínio II e de regiões adjacentes. Outros aminoácidos da alça 3 também formaram pontes de hidrogênio, porém com aminoácidos do domínio IV da APN (Apêndice V).

3.5.4 Docking das toxinas Cry1A contra APN4 de *Telchin licus licus*

Os ensaios realizados com a toxina Cry1Aa mostraram que alguns resíduos das alças 2 e 3 formaram pontes de hidrogênio com aminoácidos do sítio de ligação do receptor. Além disso, aminoácidos de regiões próximas às alças também participaram deste tipo de interação, tanto com o sítio de ligação quanto com regiões do domínio IV da APN (Figura 33). A maior participação dos resíduos das alças 2 e 3 foi na formação de interações hidrofóbicas com os domínios I e IV do receptor. No total foram previstas 25 pontes de hidrogênio e 279 interações hidrofóbicas entre as proteínas (Anexo IX).

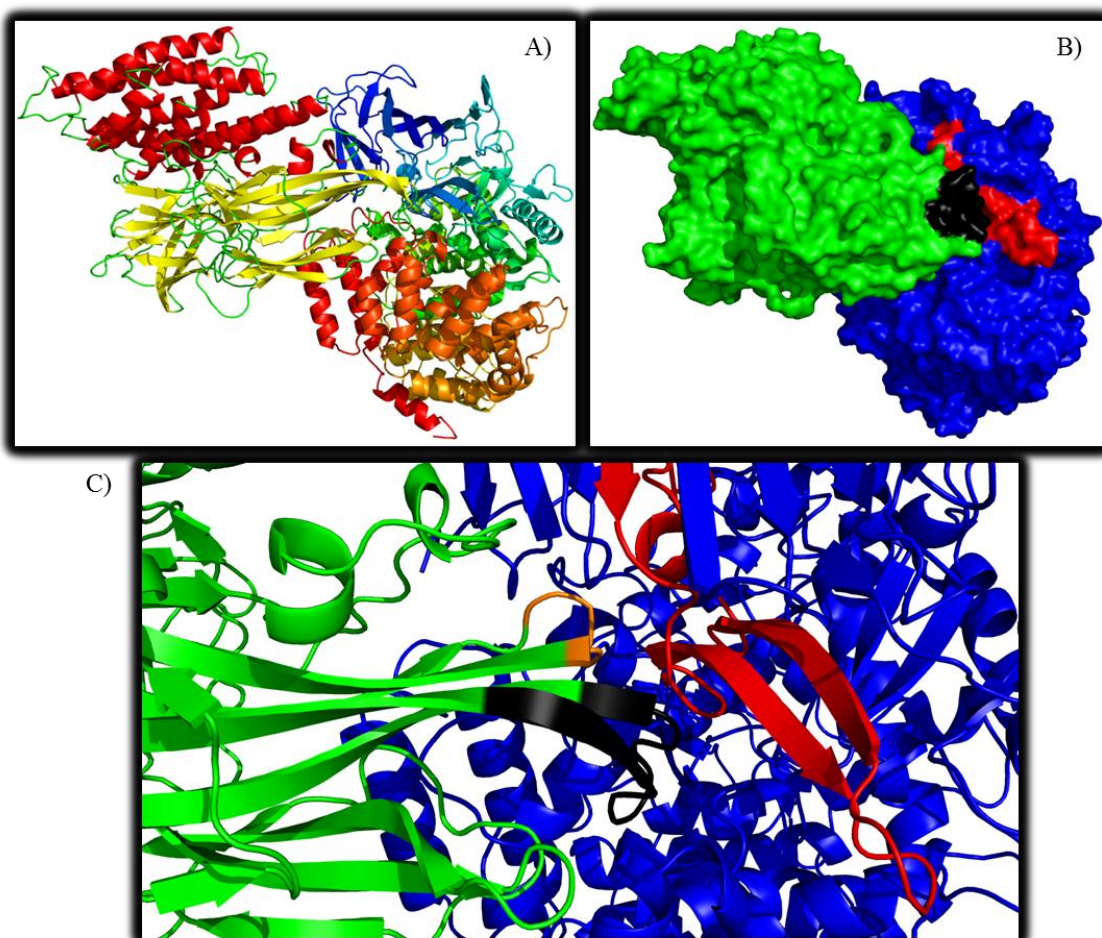


Figura 33. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Aa à APN4TI. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Aa; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

De acordo com o melhor modelo obtido, a interação entre a toxina Cry1Ab e os aminoácidos do sítio de ligação da APN4TI ocorreu por intermédio da alça 3 e dos aminoácidos S247 e R249 (Figura 34). Os resíduos de aminoácidos da alça 2 formaram pontes de hidrogênio com aminoácidos do domínio IV da APN. Além disso, vários

aminoácidos de ambas as alças se envolveram em interações hidrofóbicas tanto com regiões próximas ao sítio de ligação da APN, quanto com regiões do domínio IV. A análise das interações identificou que 27 pontes de hidrogênio e 248 interações hidrofóbicas foram formadas entre as proteínas (Anexo X).

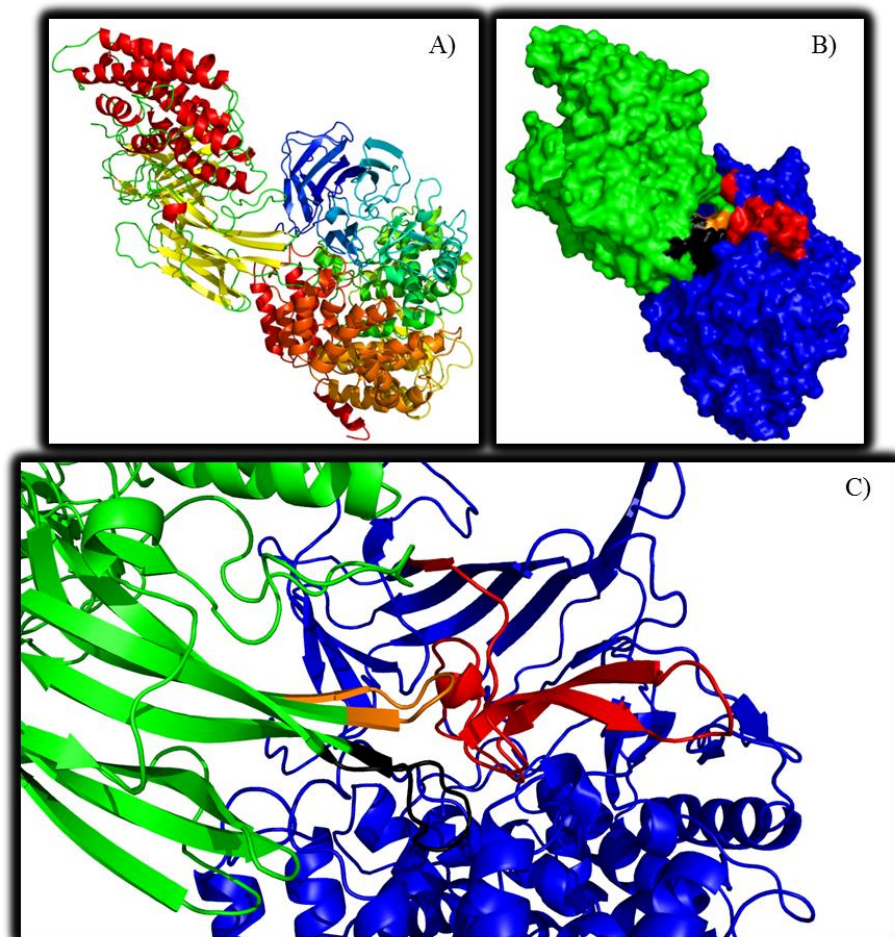


Figura 34. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN4T1. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Ab; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

O modelo de interação obtido para Cry1Ac contra a APN4T1 mostrou que ambas as alças 2 e 3 interagiram com a região de ligação do receptor como também com aminoácidos do domínio IV (Figura 35). Foram observadas 43 pontes de hidrogênio e 417 interações hidrofóbicas (Anexo XI).

As tabelas 7 e 8 resumem os resíduos de aminoácidos das toxinas e dos receptores que participaram de interações por meio de pontes de hidrogênio.

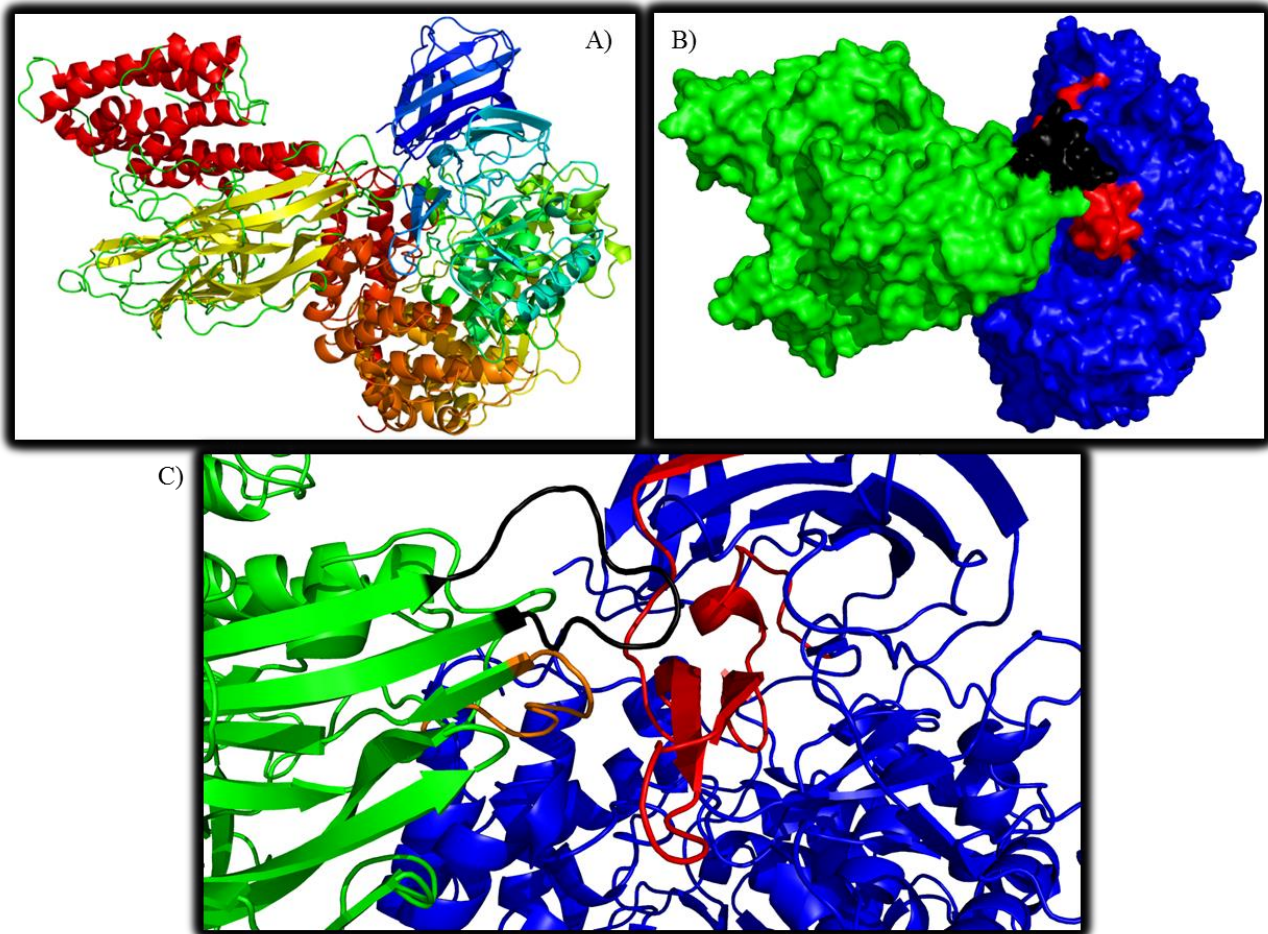


Figura 35. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN4T1. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem anterior representada pela superfície das proteínas (azul: APN1Ms; verde: Cry1Ac; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça 3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

Tabela 7. Aminoácidos das APNs que interagiram por meio de pontes de hidrogênio com as toxinas Cry1A.

Combinação	Aminoácidos ligantes	
	Receptor	
APN1MS		
Cry1Aa	R139, D144, T146, K148, R149, W150,	E184, D186, H228, N249, N757, D797
Cry1Ab	A37, S40, T43, T44, R139, K148, R149, W150,	D186, D661, A662, N664, R745, Y746, A749, N757, R779
Cry1Ac	V39, Y142, R145, K148, R149, W150,	E184, D186, S188, N230, G728, A749, Y754
APN1TI		
Cry1Aa	E8, D9, N44, F48, D74, E103, N132, L133, T135, R142,	D799, E800, R803, E838
Cry1Ab	E8, D9, D74, T76, K130, N132, T135, N136, R142,	D799, N831, N870
Cry1Ac	N44, Q45, S47, F48, T135, N136, W153,	D799, A801, R803, N834
APN3TI		
Cry1Aa	n/a	
Cry1Ab	F26, D27, R121, R125, D130, W134,	Q749, Y774, D778, F781, E783, N784, F785
Cry1Ac	F26, T114, Y120, R121, D130, V132, W134,	D778, E782, E783, N784, Y813, K820
APN4TI		
Cry1Aa	N1, E28, V55, I58, T81, D82, N91, R110, N114, Y121, K122,	M775, Y776, D778, Y782, N809, Q815, Q851, V852
Cry1Ab	R110, I111, N112, E113, N114,	Y776, Y782, E805, N809, F810, E812, Q815, N816, Y817, N850, Q851
Cry1Ac	S27, E28, R110, I111, E113, Y121, K122, Y124, D129, E130, Y133,	H769, D772, Q773, M775, Y776

Legenda: Em vermelho, azul, verde e magenta estão destacados os aminoácidos que formam a região de ligação das toxinas Cry1A. Não se aplica (n/a - não houve ligação entre os aminoácidos).

Tabela 8. Resíduos de aminoácidos das toxinas Cry1A que interagiram por meio de pontes de hidrogênio com as APNs de *M. sexta* e *T. licus licus*.

Combinação	Aminoácidos ligantes Toxina
APN1MS	
Cry1Aa	R281, R311, G312, R367, R368, I369, L371, N376
Cry1Ab	R249, S251, Y306, G307, R337, N340, N344, R405, G407, S409, N410, S411 , S452, Y454, V456, R469, Y471, S525, N560, N563, E564
Cry1Ac	R249, S261, R279, Y302, Y306, G307, N311, G407, N410, S411
APN1TI	
Cry1Aa	R209, R217, R281, G285, R311, R368, S373, N376, N377, E379, G442, Y445
Cry1Ab	R185, R249, R279, M309, G310, N311, R405, S409, N410, S411
Cry1Ac	R249, R279, Y281, N340, G342, N344, N345, G346, R409, N410, S411, S412
APN3TI	
Cry1Aa	n/a
Cry1Ab	R249, L305, N340, I343, N344, N345, R405, S406, N410, S411
Cry1Ac	R249, S251, A252, G253, R279, F339, N340, I343, F408, S409, N410
APN4TI	
Cry1Aa	R217, G285, R286, E288, N290, I291, G293, N340, Y366, R368, S373, G374, N377, E379, S438, G439, A440, G442
Cry1Ab	S247, R249, R279, N311, R337, P338, N340, I341, N344, G346, R405, G407, S409, N410, S411
Cry1Ac	R249, S251, G253, I255, E256, D276, R279, Y283, G307, Y308, M309, P338, N340, I341, G342, I343, N344, G346, R405, S406, N410, S411, S412, V413, S414, I416, R417, A418

Legenda: Em negrito e laranja estão indicados os aminoácidos que formam as alças 2 e 3, respectivamente. Não se aplica (n/a – não houve ligação entre os aminoácidos).

De acordo com a análise de *docking* molecular, utilizando o padrão de interação entre as toxinas Cry da classe 1A e a APN1 de *M. sexta*, foi possível buscar os melhores modelos que apresentaram um comportamento parecido com as APNs da broca-gigante. Com os dados gerados no presente trabalho foi possível observar quais proteínas apresentaram um potencial para se comportarem como receptores. Além disso, os ensaios de *docking* molecular serviram principalmente para estudar o mecanismo de ação das toxinas, corroborando ou não os dados da literatura e identificar pela primeira vez quais os resíduos de aminoácidos que podem participar da interação entre as proteínas.

A toxicidade das proteínas Cry é um fenômeno que será o resultado da capacidade de solubilização dos cristais protéicos, da ativação das protoxinas no homogenato intestinal, da presença de receptores no epitélio intestinal de um inseto susceptível, da força da interação entre a toxina e o receptor, da inserção das toxinas na membrana celular para a formação dos poros e da intensidade do efeito da lise osmótica. A correlação entre a força de interação entre as proteínas e a toxicidade pode servir apenas como um indício para estimar um possível efeito letal sobre os organismos.

A dose letal das toxinas Cry1A foi calculada para *M. sexta* por diferentes grupos de pesquisa. De uma maneira geral, a LC₅₀ da toxina Cry1Aa foi determinada em 16 ng/cm² (com intervalo de confiança a 95% variando entre 8,0 – 25,3 ng/cm²) (NAIR e DEAN, 2008). Para Cry1Ab, foi observada uma LC₅₀ de 20 ng/cm² (com intervalo de confiança a 95% variando entre 7,5 – 31,7 ng/cm²) (NAIR e DEAN, 2008) ou de 10,3ng/cm² (com intervalo de confiança a 95% variando entre 8,9 – 11,9 ng/cm²) (PACHECO *et al.*, 2009). A LC₅₀ calculada para Cry1Ac girou em torno de 14,4 ng/cm² (com intervalo de confiança a 95% variando entre 12 – 18,9 ng/cm²) (COOPER *et al.*, 1998). Levando em consideração a variação no intervalo de confiança foi observado que a toxina Cry1Ab apresentou a maior toxicidade, enquanto que Cry1Aa e Cry1Ac apresentaram resultados muito parecidos entre si. Ao comparar esses dados com o perfil das interações formadas entre as toxinas e o receptor nos ensaios de *docking* molecular, houve uma relação direta entre toxicidade e quantidade de pontes de hidrogênio.

Ao realizar a mesma análise com os modelos obtidos para a broca-gigante, foi observado que a APN que apresentou um comportamento mais parecido com o ensaio de *M. sexta* foi a APN4Tl. De acordo com a LC₅₀ calculada para *T. licus licus*, apesar de não haver diferenças estatísticas entre a atividade das toxinas Cry1A, há uma tendência de Cry1Ac exibir uma maior atividade, seguida de Cry1Ab e Cry1Aa. De acordo com o número de

pontes de hidrogênio formadas entre as toxinas e a APN4TI, é possível identificar uma relação direta com a toxicidade observada nos bioensaios.

Entretanto, vale ressaltar que esses dados não excluem a APN1TI e APN3TI de também poderem apresentar capacidade de atuarem como receptores das toxinas. O modelo de interação entre Cry1Ab e APN1TI, sugere um perfil muito parecido com o que ocorreu para *M. sexta*. O mesmo pôde ser observado para a interação entre Cry1Ab e Cry1Ac contra APN3TI.

Como no presente trabalho não foi analisado o perfil de expressão de cada uma das APNs em larvas neonatas da broca-gigante, pode ser que haja um efeito compensatório entre os receptores. Esse fenômeno já foi observado ao analisar o perfil de expressão de duas aminopeptidases de *Trichoplusia ni*, APN1 e APN6, para avaliar o desenvolvimento de organismos resistentes à toxina Cry1Ac (TIEWSIRI e WANG, 2011). Dessa forma, somente após o estudo do nível de expressão de cada gene associado a ensaios de ligação *in vitro* e da identificação de outros receptores além das APNs é que se saberá a real participação de cada elemento no mecanismo de ação.

Neste estudo não foi possível realizar o *docking* molecular com a toxina Cry2Aa. Isso se deveu ao fato de que não existem informações sobre quais são os receptores que participam do mecanismo de ação assim como não há trabalhos que tenham explorado os sítios de ligação da toxina. Segundo Hernández-Rodríguez e colaboradores (2008), ensaios de competição heteróloga entre toxinas Cry2A e Cry1A mostraram que a ligação de uma classe de proteínas não impede a ligação da outra, o que sugere que as toxinas interajam com receptores distintos ou em sítios diferentes no mesmo receptor. Além disso, a determinação da estrutura da toxina Cry2Aa mostrou que essa proteína apresenta diferenças marcantes nas alças 2 e 3 do domínio II, quando comparada às toxinas Cry1A o que levou os autores a sugerirem um sítio de interação incomum, presente no domínio III da toxina (MORSE; YAMAMOTO; STROUD, 2001). Essa característica pôde ser observada nos resultados da análise de SAS, que mostraram que a alça 2 apresentou baixa acessibilidade ao solvente. Dessa forma, os estudos com essa toxina se concentraram somente em analisar a variação de sua estrutura em experimentos de dinâmica molecular e comparar com o padrão observado para as outras proteínas.

4. Conclusões

No presente trabalho, foi estudada a atividade entomotóxica de quatro toxinas Cry contra larvas neonatas da broca-gigante. Para que os ensaios fossem realizados foi necessário o desenvolvimento de um protocolo de criação de lagartas, já que não existe nenhum grupo de pesquisa que tenha conseguido estabelecer o ciclo de vida deste inseto em laboratório. O procedimento desenvolvido neste trabalho encontra-se protegido para cumprir as exigências do processo de patenteamento.

A análise da atividade das toxinas mostrou que as proteínas da classe Cry1A foram as que mostraram maior taxa de mortalidade, enquanto que a toxina Cry2Aa apresentou uma LC₅₀ muito mais alta. Entretanto, todas as toxinas resultaram em altas taxas de mortalidade, o que pode auxiliar em trabalhos futuros de evolução molecular *in vitro* por meio de combinação da sequência gênica das proteínas ou, até mesmo, a introdução de um ou mais genes que codificam a síntese de toxinas Cry no genoma de plantas de cana-de-açúcar, visando dificultar o desenvolvimento de insetos resistentes às toxinas.

De acordo com o estudo de dinâmica molecular das toxinas Cry e também das APNs de *T. licus licus*, observou-se que a APN4Tl apresentou as características mais semelhantes ao receptor APN1 de *M. sexta*. Após ensaios de *docking* molecular foi observado que houve correlação entre a atividade das toxinas nos bioensaios com as larvas e o número de ligações (pontes de hidrogênio) entre as toxinas e os receptores.

Capítulo III – Silenciamiento de genes de *Telchin licus licus*

1. Introdução

1.1 RNA interferente e silenciamento gênico

O silenciamento gênico foi primeiramente observado por grupos que realizavam estudos de síntese de antocianinas em plantas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Em uma tentativa de alterar a coloração de flores de petúnias, pesquisadores introduziram cópias adicionais de um gene que codifica a chalcona sintase, uma enzima crucial que participa do processo de pigmentação das flores, que são normalmente rosas ou violetas. Esperava-se que a superexpressão desse gene originasse plantas com flores mais escuras, mas ao invés disso, apareceram plantas menos pigmentadas ou totalmente brancas, indicando que a atividade da enzima chalcona sintase foi substancialmente reduzida (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Alguns anos mais tarde o mesmo grupo confirmou os resultados e denominou o fenômeno observado de silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) (JORGENSEN *et al.*, 1996) e foi associado a um mecanismo de defesa natural contra vírus e elementos de transposição (VOINNET, 2001; WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001).

Foi somente em 1998, quando pesquisadores trabalhavam com *Caenorhabditis elegans* que o termo interferência mediada por RNA ou RNAi surgiu. Fire e colaboradores (1998) observavam o efeito da injeção de determinadas moléculas sobre a expressão de um gene específico que codifica a síntese de uma proteína do músculo do nematóide. Em um primeiro momento foram injetadas moléculas de mRNA e de RNA antisenso, separadamente, mas nenhum efeito, ou um efeito muito baixo foi observado. Ao injetar uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA), os efeitos de silenciamento foram muito altos e com isso os pesquisadores concluíram que a molécula sinalizadora do RNAi era o dsRNA (FIRE *et al.*, 1998). Ao introduzirem uma das moléculas de mRNA ou RNA antisenso e logo em seguida a outra, os efeitos do silenciamento também foram observados, sugerindo que o anelamento das duas moléculas antes da injeção não era necessário. Hoje se sabe que esse mecanismo é encontrado em diversos organismos como plantas e metazoários e é parte integral do processo de regulação da expressão gênica (LILLEY *et al.*, 2007).

O mecanismo básico de RNAi pode ser dividido em três passos: I) Um dsRNA longo que é produzido ou introduzido na célula é reconhecido por uma RNase III, conhecida como DICER, que cliva a molécula em um processo dependente de ATP, em séries de “duplexes” de aproximadamente 21-23 pb. Esses “duplexes” são denominados siRNAs (*Small*

Interfering RNA). II) Os siRNAs são acoplados a um complexo protéico chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*) que, em um processo dependente de ATP, separa as fitas e uma delas, denominada fita guia, é preferencialmente acoplada ao complexo RISC. III) A fita guia é utilizada para reconhecer os mRNAs alvos pelo pareamento de bases complementares. Após o pareamento há a degradação do mRNA pela enzima Argonauta, uma RNase H que faz parte do complexo RISC (SIOMI e SIOMI, 2009). Se o pareamento entre o siRNA e o mRNA alvo não for total, o mRNA não é clivado. Em vez disso, o silenciamento do gene é um resultado da inibição da tradução por impedimento físico dos ribossomos (GHILDIYAL e ZAMORE, 2009; HAMMOND, 2005).

Em alguns organismos o RNAi pode gerar uma resposta sistêmica, isso porque existem proteínas de membrana SID-1 e SID-2 que permitem a transferência dos siRNAs para células de tecidos diferentes. Essas proteínas foram bem caracterizadas em *C. elegans* e em plantas (AGRAWAL *et al.*, 2003), enquanto que apenas homólogos de *sid-1* foram encontrados, mas não tiveram sua função confirmada, em *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* e *Apis mellifera* (GORDON e WATERHOUSE, 2007), mas não foram encontrados em *Drosophila* (BELLES, 2010). Já foi mostrado também que o efeito do silenciamento pode ser duradouro devido à amplificação do sinal *via* uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP – *RNA-dependent RNA Polymerase*), porém esse gene foi encontrado apenas em *C. elegans*, plantas e carrapatos (GORDON e WATERHOUSE, 2007).

Em diferentes organismos, as vias de RNAi podem compreender proteínas e mecanismos de regulação gênica distintos. As várias classes de pequenos RNAs regulatórios diferem nos tipos de proteínas requeridas para a sua biossíntese, no tipo de Argonauta e sua associação com o complexo RISC, no modo de regulação dos genes e nas funções biológicas que eles participam. Por exemplo, siRNAs são originados de dsRNA que, por sua vez, podem ser formados pela transcrição de sequências invertidas, pela hibridização de sequências repetitivas, sequências virais ou de transposição, além de transcrição de regiões com repetições *in tandem*. Os miRNAs podem ser transcritos pela RNA polimerase II ou III, a partir de genes independentes ou de regiões de íntrons. Geralmente estão envolvidos no desenvolvimento e com a regulação do metabolismo da própria célula, preservando a sua função e integridade (RÖTHER e MEISTER, 2011). A figura 36 resume algumas vias e os tipos de pequenos RNAs envolvidos no silenciamento gênico.

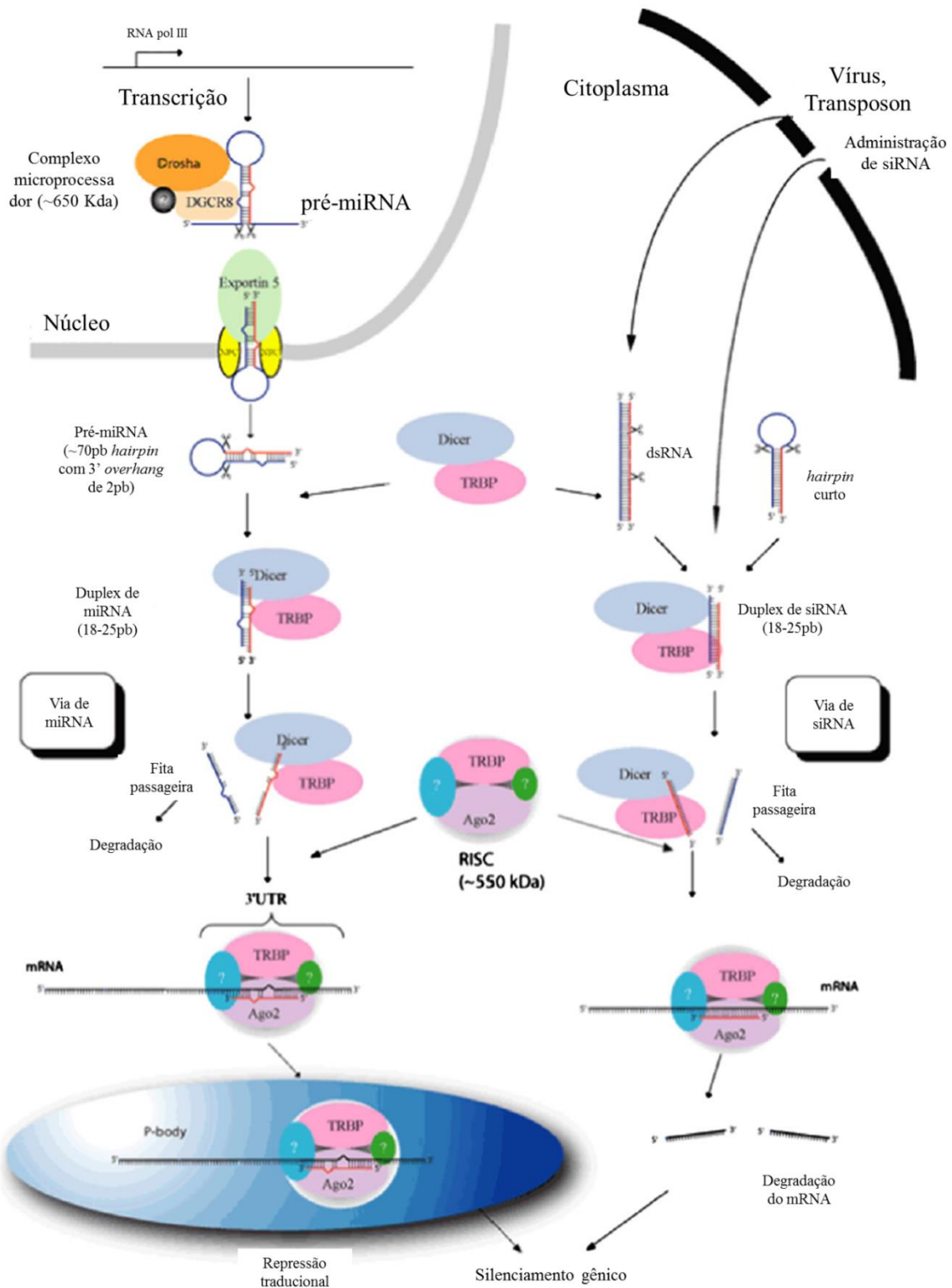


Figura 36. Resumo das vias de silenciamento gênico por siRNA e miRNA. Os miRNAs são derivados da transcrição pela RNA polimerase II ou III no núcleo. Após clivagem em moléculas de 70 pb pelo complexo microprocessador, os miRNAs são transportados para o citoplasma por meio de uma exportina. No citoplasma os miRNAs e os siRNAs são reconhecidos pelo complexo Dicer/TRBP que separa as duplikes. Enquanto as fitas passageiras são degradadas, as fitas guias são incorporadas pelo complexo RISC, que acopla a fita guia na molécula de mRNA levando a sua degradação (siRNA) ou causando a repressão traducional (miRNA). DROSHA (RNase III), DGCR8 (subunidade do complexo microprocessador), TRBP (RISC loading complex subunit), Ago2 (Argonata 2), *P-body* (*Processing bodies*). Adaptado de: YEUNG *et al.* (2005).

O RNAi tornou-se uma ferramenta muito importante, pois com ela é possível obter a alteração de fenótipos, já que a clivagem do mRNA reduz a sua quantidade disponível para tradução e, assim, pode mimetizar a perda de função por mutação. Áreas como biologia do desenvolvimento, biologia celular, biologia evolutiva e genômica funcional têm sido drasticamente impactadas pela capacidade de se analisar rapidamente a função do gene. Além da vantagem de usar o RNAi como uma ferramenta para a análise funcional dos genes, diferentes aplicações biotecnológicas têm sido desenvolvidas, incluindo a terapia médica para a infecção viral ou doenças genéticas (SHANKAR; MANJUNATH; LIEBERMAN, 2005), assim como manejo de pragas, dentre outras.

1.1.1 Uso do silenciamento gênico para o controle de insetos-praga

Os insetos-modelo, organismos os quais são utilizados para realizar experimentos de prova de conceito, são considerados ferramentas eficientes para o estudo de genômica funcional (BELLES, 2010; NOH; BEEMAN; ARAKANE, 2012). Características tais como pequeno tamanho corporal, curto tempo de geração e quantidade da progênie são de grande importância para o estudo da biologia desses organismos. Os insetos representam um grupo extremamente diversificado em relação à morfologia e as características dos seus ciclos de vida, o que os tornam modelos ideais para estudos comparativos nas áreas de fisiologia, biologia evolutiva, biologia do desenvolvimento e biologia populacional. Além disso, o conhecimento da biologia do inseto é crucial para se resolver os problemas causados, por exemplo, por vetores de doenças e pragas agrícolas.

Desde a descoberta do mecanismo de RNAi, cientistas vêm testando uma grande diversidade de formas de administração de dsRNA para os organismos, como microinjeção, imersão (*soaking*), administração oral e expressão em plantas transgênicas (BAUM *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; EATON; FETTER; DAVIS, 2002; MAO *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2009). Geralmente, em estudos de análise funcional em insetos modelo os dsRNAs são introduzidos por microinjeção na hemolinfa, pois permite distribuir diretamente os dsRNAs em vários tecidos e obter uma resposta mais rápida. Após o silenciamento realizado com sucesso em *C. elegans*, através de administração oral (TIMMONS; COURT; FIRE, 2001; TIMMONS e FIRE, 1998), abordagens semelhantes foram aplicadas em insetos, resultando em alguns estudos que mostraram que a ingestão de dsRNA pode reprimir os genes-alvo nesses animais (CHEN *et al.*, 2010; LI; ZHANG; ZHANG, 2011; WALSH *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2008).

Trabalhos recentes têm demonstrado que plantas transgênicas que produzem shRNAs (*short harpin RNA*) podem proteger tais plantas contra o ataque de insetos-pragas (BAUM *et al.*, 2007; MAO *et al.*, 2007; ZHA *et al.*, 2011). Em um desses trabalhos, Baum e colaboradores (2007) identificaram 290 genes de uma biblioteca de cDNA da lagarta da raiz do milho, *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), que poderiam ter funções biológicas essenciais. Foram sintetizados dsRNAs para cada um desses genes e o silenciamento de 14 deles produziu algum efeito sobre o desenvolvimento como nanismo ou causaram mortalidade significativa quando o dsRNA foi administrado por via oral em dieta artificial. Os autores selecionaram o gene que codifica a subunidade A da enzima V-ATPase, que mostrou rápido silenciamento do gene em uma baixa concentração de dsRNA e gerou um milho transgênico expressando dsRNA. As plantas transgênicas mostraram uma significativa proteção contra danos causados pela infestação de *D. virgifera*.

A aplicação de RNAi *in planta* tem um grande potencial como uma abordagem para o manejo de insetos (BURAND e HUNTER, 2013). Além disso, a especificidade do RNAi para fins inseticidas é uma consideração importante para o uso desta tecnologia em aplicações práticas, já que os efeitos sobre insetos não alvo podem ser minimizados. Dentre outras vantagens, esta técnica permite o uso de apenas fragmentos de sequências, tendo em vista que a tradução de uma proteína não é necessária, o que minimiza as preocupações com biossegurança e alergenicidade, e pode representar uma forma de controle mais eficaz do que as atuais (PRICE e GATEHOUSE, 2008).

1.2 Potenciais alvos para o silenciamento

1.2.1 Sistema digestório de insetos

Os insetos são adaptados a praticamente todos os ambientes e se alimentam de uma grande variedade de fontes de nutrientes como grãos, caules de plantas, seiva, celulose, carne e sangue. O sucesso adaptativo dos insetos deve-se, entre outros fatores, à diversidade de estruturas das peças bucais e também da especialização do trato digestório (WIGGLESWORTH, 1950). O trato digestório dos insetos é constituído por um tubo de células epiteliais que se estende da boca ao ânus (TERRA e FERREIRA, 1994; WIGGLESWORTH, 1950). De acordo com a sua origem embrionária e função fisiológica, este é dividido em três regiões principais, estomodeu (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctoneu (intestino posterior) (GALLO *et al.*, 2002). A região onde há a digestão e

absorção dos nutrientes é o intestino médio (TERRA e FERREIRA, 1994; WIGGLESWORTH, 1950).

Uma vez que está envolvido em diversas funções no organismo, como digestão, proteção mecânica e defesa imunológica, o intestino dos insetos tem sido alvo de muito estudo (PAUCHET *et al.*, 2010). O conhecimento da composição gênica pode facilitar o entendimento da participação de receptores na resistência de alguns insetos a inseticidas (PIGOTT e ELLAR, 2007), vias de detoxificação (KARATOLOS *et al.*, 2011; MITTAPALLI *et al.*, 2010), interações com microorganismos (BOISSIERE *et al.*, 2012), genes que codificam enzimas de degradação de parede celular de plantas e fungos (PAUCHET *et al.*, 2009) além de quais as alterações podem ser causadas quando há o distúrbio da constituição básica da fisiologia e morfologia do intestino (BROEHAN *et al.*, 2010). De fato, o intestino é uma via de comunicação direta entre o organismo do inseto e o ambiente em que se encontra e é tão sensível que quaisquer alterações na composição do homogenato intestinal podem afetar a atividade de diversas enzimas digestivas (VINOKUROV *et al.*, 2006). Vários trabalhos sugerem o sistema digestório como um alvo possível a ser utilizado em programas de manejo de pragas (CHRISTOU *et al.*, 2006; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010; RODRIGUEZ-CABRERA *et al.*, 2010; WHYARD; SINGH; WONG, 2009; ZHU *et al.*, 2011), já que as alterações na atividade e composição enzimática do homogenato e o uso de inibidores podem modificar o metabolismo do inseto, levando-o a reduzir a alimentação e causando problemas de desenvolvimento. Além disso, como mencionado no capítulo II do presente estudo, as toxinas Cry apresentam capacidade de interagir com receptores presentes na membrana de células do epitélio intestinal (PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013), o que reforça a estratégia de utilizar o intestino como alvo para o controle de insetos-praga.

1.2.2 Membrana Peritrófica

O trato digestório dos insetos está exposto a uma variedade de agentes nocivos de natureza química, física e biológica necessitando de mecanismos para a sua proteção. Em vertebrados o muco é uma secreção que recobre e protege o epitélio intestinal, enquanto auxilia o processo de digestão. Nos insetos, entretanto, não se observa uma camada mucosa propriamente dita recobrindo o epitélio intestinal. Em seu lugar, o intestino médio é protegido por uma estrutura acelular e semipermeável denominada membrana peritrófica ou matriz peritrófica (LEHANE, 1997; PETERS, 1992; TERRA, 2001). A membrana peritrófica é uma estrutura mucosa (WANG e GRANADOS, 1997), que difere do muco dos vertebrados

pela incorporação de quitina, resultando em uma estrutura protéica reforçada por fibrilas de quitina (PETERS, 1992; TELLAM; WIJFFELS; WILLADSEN, 1999). É constituída principalmente por glicoproteínas e proteoglicanos (20-55%) e por quitina (3-40%) (KRAMER; HOPKINS; SCHAEFER, 1995; LEHANE, 1997) em uma organização que fornece semi-permeabilidade e elasticidade à estrutura (LEHANE, 1997). A quitina é um importante componente estrutural da membrana peritrófica, além de fornecer rigidez, serve também como sítio de ancoragem para proteínas como as peritrofinas (WANG e GRANADOS, 1997).

As peritrofinas interagem entre si por meio de ligação a oligossacarídeos contendo N-acetil-D-glucosamina, e desta maneira uma malha tridimensional de interação de glicoproteínas pode ser formada e contribuir para as características estruturais como força, elasticidade e porosidade que são observadas nas membranas peritróficas (TELLAM; WIJFFELS; WILLADSEN, 1999).

As principais funções atribuídas a esta membrana são a de proteção mecânica contra injúria às células do intestino (WIGGLESWORTH, 1950), uma barreira física contra microorganismos (PETERS, 1992), uma barreira seletiva para enzimas digestivas e produtos de digestão (DAY e WATERHOUSE, 1953) e atua no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação endo-ectoperitrófica (BOLOGNESI *et al.*, 2005; TERRA, 1988; TERRA e FERREIRA, 1994).

Variações na taxa de formação da membrana peritrófica são observadas com frequência em insetos, dependendo da condição fisiológica em que ele se encontra (LOCKE, 1991). Existem casos em que os insetos cessam completamente a produção de membrana peritrófica durante períodos de fome e muda. A membrana peritrófica antiga é então expelida ou reabsorvida e se regenera quando o inseto volta a se alimentar (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003).

Dessa maneira, o crescimento e o desenvolvimento estão estritamente dependentes da capacidade de remodelagem de estruturas quitinosas. Logo, os insetos sintetizam e degradam constantemente quitina, de maneira muito controlada, principalmente pela ação de quitinases e quitina sintase, para permitir a ecdise e a regeneração da membrana peritrófica.

Diversos estudos demonstram que a interrupção da formação da membrana peritrófica por agentes capazes de se ligar na quitina presente nessa estrutura, competir pelos sítios de ligação com as peritrofinas ou, ainda, degradar a quitina podem alterar suas propriedades

funcionais como a proteção química e mecânica do epitélio intestinal. Danos à membrana peritrófica acarretam em aumento da suscetibilidade e mortalidade dos insetos por agentes infecciosos como vírus e bactérias, além de interferir na assimilação de nutrientes (BOLOGNESI *et al.*, 2005; GATEHOUSE *et al.*, 1998; WANG e GRANADOS, 1997). Assim a quitina é considerada um dos componentes mais importantes desta estrutura.

1.2.3 Quitina sintase

A quitina sintase é uma enzima de grande importância na via de síntese de quitina. A análise de sua estrutura secundária sugere que possa conter vários domínios hidrofóbicos, indicando que pode se tratar de uma proteína transmembrana (TELLAM *et al.*, 2000). Em estudos de silenciamento gênico com *Tribolium castaneum*, pesquisadores observaram que a interrupção da atividade da enzima quitina sintase II, responsável pela síntese de quitina da membrana peritrófica, levou a uma redução acentuada na alimentação dos insetos que diminuíram de tamanho (ARAKANE *et al.*, 2004). Diversos outros estudos mostraram o potencial uso da estratégia de silenciamento gênico utilizando a quitina sintase II como alvo para o desenvolvimento de novos métodos de controle de insetos-praga (ALVES *et al.*, 2010; ARAKANE *et al.*, 2008).

Além de exercer participação fundamental durante o processo de digestão e de proteção mecânica contra microorganismos, o intestino dos insetos também contribui em processos metabólicos de manutenção do equilíbrio osmótico do organismo. Esse equilíbrio é obtido através do funcionamento de diversas proteínas de membrana, que atuam como canais iônicos, facilitando ou restringindo a passagens de substâncias para o interior das células (WIECZOREK *et al.*, 2009).

1.2.4 V-ATPase

As vias de secreção são umas das características principais das células eucarióticas. A via envolve a célula em uma rede elaborada de membranas, operando no espaço entre o núcleo e a membrana plasmática. Ela inclui todas as organelas celulares e membranas, excluindo apenas as organelas que surgiram como resultado de endossimbiose (mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos). As organelas e membranas da via de secreção, assim como a membrana plasmática, são conectadas umas às outras por um fluxo contínuo que resulta em troca de materiais e triagem de proteínas e lipídios da membrana. Entretanto, a composição das membranas de todas as organelas da via de secreção é única e os conteúdos internos específicos são sempre mantidos da mesma forma. A montagem e manutenção desta entidade

dinâmica requer energia em níveis máximos. Apesar de a maior parte dessa energia ser provida por um processo metabólico mitocondrial, um grande percentual da energia utilizada para construir e manter a composição única tanto do meio intracelular, quanto do extracelular, é provido por bombas de íons. Boa parte dessa energia é provida por uma H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase) a partir de uma força próton-motiva (NELSON *et al.*, 2000).

A enzima V-ATPase é uma bomba de prótons altamente conservada evolutivamente entre diversos eucariotos, mas que pode exercer funções completamente diferentes em cada um. Essas enzimas acidificam uma gama variada de organelas intracelulares como endossomos, lisossomos e vesículas secretórias. Em leveduras, por exemplo, o gradiente de prótons gerado por essas bombas é utilizado para a assimilação de cálcio para dentro do vacúolo por meio de um sistema antiporte com a bomba de H⁺/Ca²⁺ (OHYA *et al.*, 1991). Mutações que anularam a síntese de V-ATPase em leveduras resultaram em fenótipos que foram incapazes de se multiplicar em meios com pH elevado e tornaram-se muito sensíveis a altas concentrações de íons metálicos (NELSON *et al.*, 2000). Em transmissões sinápticas de células neuronais humanas, a V-ATPase acidifica vesículas sinápticas (WIENISCH e KLINGAUF, 2006). Em mamíferos, essas proteínas podem, ainda, ser encontradas na membrana plasmática de células dos rins, osteoclastos, macrófagos, neutrófilos e até mesmo em alguns tipos de tumor (IZUMI *et al.*, 2003).

Em insetos, especialmente *M. sexta*, as V-ATPases são encontradas na membrana apical de células caliciformes. O modelo hipotético da V-ATPase de *M. sexta* é composto por oito subunidades diferentes no complexo citosólico V₁ enquanto quatro subunidades diferentes formam o complexo de membrana V₀ (WIECZOREK *et al.*, 2003) (Figura 37). O epitélio intestinal deste organismo acabou por tornar-se o tecido modelo para estudos de aspectos gerais de V-ATPases, não apenas por ser uma fonte rica para purificação da enzima, mas também porque a V-ATPase apresenta participação central em processos fisiológicos no intestino (WIECZOREK *et al.*, 2000), direcionando o transporte de íons e fazendo o balanceamento iônico. Dependendo da presença de transportadores de íons apicais ou basolaterais, que dependem tanto do gradiente químico quanto elétrico gerado pela V-ATPase, pode-se esperar uma diversidade de processos diferentes, como regulação do pH intracelular, alcalinização do meio extracelular e secreção de K⁺ (WIECZOREK *et al.*, 2003).

Por apresentar uma participação tão importante na fisiologia de eucariotos, especialmente em insetos, a V-ATPase pode vir a ser um alvo de grande interesse para o controle de pragas. O uso de inibidores da enzima talvez não seja a estratégia ideal, já que a proteína é conservada entre várias espécies, incluindo seres humanos. Entretanto, a utilização

de RNAi pode ser uma estratégia a ser utilizada já que uma das características principais do seu mecanismo de ação é a especificidade com que os siRNAs são acoplados aos mRNAs. De fato, essa estratégia foi utilizada para determinar os efeitos do silenciamento de uma V-ATPase de *Diabrotica virgifera* em plantas transgênicas de milho. Ao silenciar o gene da subunidade A, observou-se que as plantas apresentaram uma capacidade muito maior de resistir o ataque dos insetos (BAUM *et al.*, 2007).

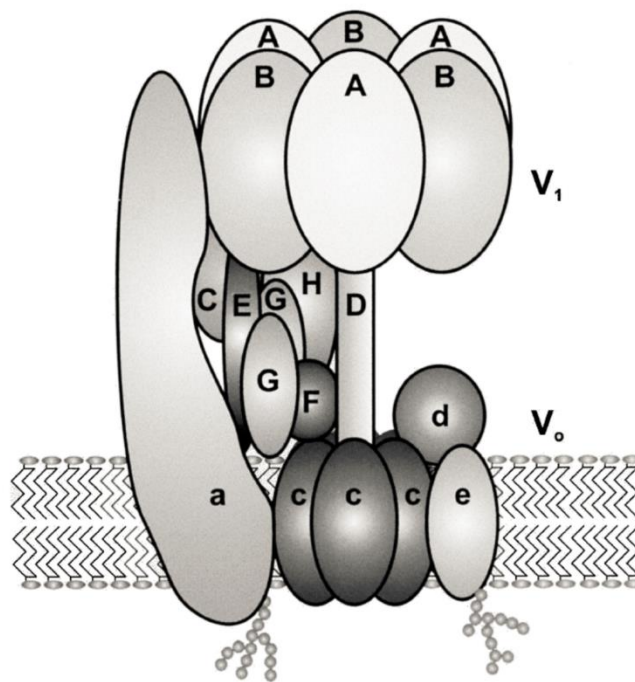


Figura 37. A estrutura do complexo da V-ATPase de *M. sexta* indicando as subunidades citoplasmáticas (V_1) e de membrana (V_0). Adaptado de (WIECZOREK *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo o estabelecimento de protocolos de bioensaios de silenciamento de genes de *T. licus licus* utilizando a ferramenta de RNAi como metodologia e o desenvolvimento de uma técnica biotecnológica alternativa para o controle do inseto-praga. Para analisar a expressão relativa dos genes escolhidos para os bioensaios por qRT-PCR tornou-se necessária a validação de genes de referência, obtidos a partir do transcrito da broca-gigante da cana-de-açúcar, utilizando-se programas computacionais que determinam a estabilidade da expressão de cana gene e indicam a melhor combinação de genes a ser utilizada nos experimentos.

2. Material e Métodos

2.1 Insetos

Os ovos e as larvas de último ínstar foram coletados diretamente de campos de cana-de-açúcar infestados. As lagartas foram mantidas em placas entomológicas a 28 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 : 12 (C : E) e alimentadas com pedaços de colmo de cana. Os ovos foram mantidos sob as mesmas condições até a eclosão das larvas, que foram, então, mantidas isoladas em placas.

2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA total, os insetos imersos em nitrogênio líquido foram pulverizados em almofariz com auxílio de pistilo. O RNA total de ovos e larvas foi extraído diretamente utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração do RNA total de pupas e de adultos foram utilizadas as mesmas adaptações no protocolo citado no capítulo I, seção 2.1. Todo o RNA extraído foi tratado com 2 U de DNase I (Ambion, Life Technologies) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com o protocolo do fabricante. Após o tratamento, a qualidade da extração e a integridade do RNA foram conferidas por eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA teve a sua concentração determinada em um fluorômetro Qubit, utilizando o Kit Quant-iT RNA assay (Invitrogen Life Technologies).

Após o tratamento com DNaseI, 1 µg de RNA total foi utilizado para síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Life Technologies) e Oligo-dT₃₀, seguindo as instruções do fabricante.

2.3 Análise de estabilidade de genes de referência

Para a validação de genes de referência foram utilizadas diferentes fases do ciclo de vida do inseto, incluindo ovos, larvas neonatas, larvas de último ínstar, pupas, machos adultos e fêmeas adultas. Sete genes foram escolhidos, a partir do transcrito obtido para a broca-gigante da cana-de-açúcar, para análise da estabilidade de expressão, que codificam a síntese de β -actina (β -ACT), α -tubulina (α -TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação 1-alfa (EF-1 α), ubiquitina (UBQ), fosforibosil-pirofosfato-sintetase (PRPP) e a subunidade ribossomal 18S (RPS18). Os iniciadores (*primers*) (tabela 9) para cada gene foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer3Plus* (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER *et al.*, 2012) a partir

das sequências de nucleotídeos retiradas do banco de dados do transcrito da broca-gigante da cana-de-açúcar para gerar um fragmento amplificado (*amplicon*) que variou entre 113 a 118 pb, com o intuito de evitar tamanhos muito diferentes a serem utilizados na qRT-PCR. Para todos os iniciadores a temperatura de desnaturação de metade das moléculas foi de 60 °C. Seguem na tabela 9 as sequências dos pares de iniciadores para cada gene. Em cada nome, Fw (do inglês *forward*) designa o iniciador senso e Rv (do inglês *reverse*) designa o iniciador antisenso. Primeiramente foi realizada uma PCR convencional com os cDNAs de todos os estágios do ciclo de vida para testar os iniciadores e a temperatura de anelamento.

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) utilizando iniciadores específicos para cada gene (Tabela 9). Cada reação foi feita em um volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 40 vezes; 5,1 µL de água bidestilada e 0,2 µM de cada iniciador (senso e antisenso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de incubações a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada fragmento amplificado (60-94 °C, a cada 0,5 °C por 1 segundo) foi feita para verificar a possível formação de dímeros dos iniciadores ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras. O número de ciclos foi referido como valor de Cq (*quantification cycle*), em substituição aos nomes para os antigos Ct (*threshold cycle*) ou Cp (*crossing point*), de acordo com as normas RDML (LEFEVER *et al.*, 2009). A eficiência de cada iniciador para cada reação e as Cqs foram calculadas individualmente a partir do *software* qPCR miner (www.miner.ewindup.info) (ZHAO e FERNALD, 2005). A análise da estabilidade do nível de transcrição de cada gene em cada fase do ciclo de vida do inseto foi feita utilizando as ferramentas geNorm^{plus} (Biogazelle Company)(VANDESOMPELE *et al.*, 2002), Normfinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e Bestkeeper (<http://bioinformatics.gene-quantification.info/bestkeeper.html>) (PFAFFL *et al.*, 2004). Bestkeeper usa dados brutos (valores de Cq) e eficiência dos iniciadores na PCR para determinar os genes mais estáveis e os combina em um índice. Os valores de quantidade de expressão transformados em uma escala linear (a quantidade relativa maior para cada gene foi padronizada para 1) foram usados como dados de entrada para o geNorm e NormFinder.

Tabela 9. Iniciadores utilizados neste trabalho para validação de genes de referência.

Gene	Iniciador	Amplicom (pb)	Função
β -Actina (β -act)	FW 5' ATGGTCGGTATGGGTCAGAA 3' RV 5' ATGTCGTCCCAGTTGGTGAT 3'	116	Proteína estrutural do citoesqueleto
Fosforribosil-pirofosfato sintetase (PRPP)	FW 5' ACAGCTATCATGGTGGACGA 3' RV 5' CACACCGTGGGTTGATATTG 3'	115	Proteína que participa do metabolismo celular
Fator de alongação 1- α (EF-1 α)	FW 5' AACATTGTCGTCATCGGACA 3' RV 5' GGCCTCCTTCTCGAACTTCT 3'	114	Alongamento da tradução
Ubiquitina (UBQ)	FW 5' CAATGCAAGTTGTTCGATTCA 3' RV 5' GGTCGTGCTGGTAAACCT 3'	113	Marca proteínas para serem degradadas
Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH)	FW 5' AAAGTAAAGGAGGCCGCTGT 3' RV 5' CAGCAGCATAACGAAGATGGA 3'	116	Participa da glicólise
Proteína Ribossomal S18 (RPS18)	FW 5' ACGGTGAAAATCCAGTTGG 3' RV 5' GGACACGGATTCCAGTAGA 3'	118	Subunidade ribossomal
α -Tubulina (α -tub)	FW 5' ACTTGGTACTCGACCGCATC 3' RV 5' ATGAGGAGGGAGGTGAAACC 3'	115	Constituinte estrutural da célula

2.4 Obtenção e clonagem das sequências dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A

As sequências dos genes da enzima quitina sintase II (CHSB) e da subunidade A (complexo V_0) da enzima V-ATPase foram obtidas por meio de busca no transcrito de *T. licus licus*, a partir de procura por anotação de função.

As sequências foram inicialmente analisadas nos programas BLASTn e BLASTx contra o banco de dados nr do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para busca de sequências homólogas e confirmação da anotação dos genes.

O desenho dos iniciadores foi realizado com o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), que analisa as sequências e indica regiões de maior probabilidade para uso em silenciamento gênico. Para o gene da quitina sintase II foram desenhados dois pares de iniciadores para clonar a sequência com dois tamanhos diferentes (150 pb e 540 pb). Para o gene da V-ATPase A foi escolhida uma região de 150 pb (Tabela 10).

Para a clonagem dos fragmentos foram adicionadas às sequências dos iniciadores as sequências de recombinação ATTB do sistema Gateway® Technology (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 10).

Os fragmentos de DNA foram amplificados por meio de PCR nas seguintes condições: cDNA (1 μ L), tampão de PCR 1X, 0,4 mM de dNTP mix, 3 mM de $MgCl_2$, 0,48 μ M de iniciadores; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase Ludwig Biotec, em um volume final de 20 μ L. Foram utilizados os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de

95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 10. Iniciadores utilizados para clonagem e qRT-PCR dos genes da quitina sintase II e V-ATPase.

Gene	Nome do iniciador	Sequência	Amplicom (pb)	Experimento
Quitina sintase II		FW 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGGAAGCTGGTCTGGACATTGC 3'	540 clonagem via sistema Gateway	
Quitina sintase II		RV 5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCAGCAATAGCGTACACAACC 3'	540 clonagem via sistema Gateway	
Quitina sintase II	TlqsBGTWfw1	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTGCCATTTGAAGGACAAGG 3'	150 clonagem via sistema Gateway	
Quitina sintase II	TlqsBGTWrv1	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCAGGAGGTAAGTGTCTTCTG 3'	150 clonagem via sistema Gateway	
Quitina sintase II	TlqsBqRTfw1	5' ACGATGACTCCCAGGTGAAC 3'	110 qRT-PCR	
Quitina sintase II	TlqsBqRTrv1	5' ATACTTCTTCGGCGACCTCA 3'	110 qRT-PCR	
V-ATPase	TlvpAGTWfw1	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCTTCTGCCGTTCTACAAG 3'	150 clonagem via sistema Gateway	
V-ATPase	TlvpAGTWrv1	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCAGTACAGTATGTTGC 3'	150 clonagem via sistema Gateway	
V-ATPase	TlvpAqRTfw1	5' GCTTCTGCCGTTCTACAAG 3'	115 qRT-PCR	
V-ATPase	TlvpAqRTrv1	5' TTCCACGTGACCTTGTGTGC 3'	115 qRT-PCR	

O produto de PCR foi purificado utilizando o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro. O material purificado foi clonado em vetor pDONRTM utilizando a enzima BP Clonase II (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 20 ng do produto da ligação foi utilizada para transformação de células de *E. coli* OmniMAXTM. Após a transformação foi realizada a extração do DNA plasmidial por meio de lise alcalina (AHN *et al.*, 2000) e uma alíquota enviada para sequenciamento.

Após confirmação das sequências dos genes, os mesmos foram subclonados no vetor L4440-GTW utilizando a enzima LR Clonase II (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante, visando a expressão de dsRNA *in vitro*. Uma alíquota de 20 ng foi utilizada para transformação de células de *E. coli* OmniMAXTM. Após a transformação foi realizada a extração do DNA plasmidial por meio de lise alcalina e uma alíquota enviada para sequenciamento. Após confirmação da sequência de nucleotídeos esses plasmídeos foram utilizados para transformar células *E. coli* HT115 para expressão de dsRNA *in vivo*.

2.5 Expressão de dsRNA para os genes selecionados

Foram utilizados dois protocolos distintos para a expressão de dsRNA, um para expressão *in vitro* e outro para expressão em bactérias. Para a expressão *in vitro*, os dsRNAs foram sintetizados a partir de produtos de PCR flanqueados pela sequência mínima do promotor T7. A síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5 µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL, conforme o protocolo do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C,

seguido por tratamento com DNase I por 15 minutos. Os produtos da reação foram incubados a 70 °C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente para permitir o anelamento das fitas complementares de RNA. Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme descrito no protocolo do fabricante. O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC e a quantificação foi obtida por espectrofotometria. A integridade do dsRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para expressão de dsRNA em bactérias, uma colônia resultante da transformação de cada vetor foi inoculada separadamente em 5 mL de meio LB, acrescentado de 100 mg/mL de ampicilina e mantidas a 37 °C a 200 rpm por 16 horas. A cultura foi diluída 1:100 em meio LB contendo 100 mg/mL de ampicilina e foi então incubada a 37 °C a 200 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm igual a 0,4. Nesse ponto adicionou-se 0,4 mM de IPTG para a indução da atividade da enzima T7 polimerase. A reação foi incubada por 4 horas.

Após a indução da expressão realizou-se a extração do RNA total de uma alíquota de 2 mL da cultura bacteriana da seguinte maneira: a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 6 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 1 M de acetato de amônio e 10 mM de EDTA para um volume final 1:20 do volume inicial de inóculo. Adicionou-se 2,5 mL de TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) e o material foi homogeneizado em vórtice, seguido de incubação a 65 °C por 15 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para novo tubo de microcentrífuga o qual foram adicionados 300 µL de clorofórmio para cada 1 mL de amostra e o material homogeneizado por inversão leve dos tubos. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. A fase superior foi recuperada e então transferida para novo tubo de microcentrífuga, o qual foi adicionado igual volume de isopropanol seguido de incubação a -20 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. Após secagem do material, o precipitado foi ressuscitado em água livre de RNase a 1/100 do volume inicial. A integridade do RNA total e a presença do dsRNA foram conferidas em gel de agarose 1%.

2.6 Bioensaios com a broca-gigante

Para a realização dos bioensaios, foram testadas três maneiras de administração de dsRNA para o inseto: I) microinjeção, II) alimentação forçada e III) aplicação em dieta.

Para a microinjeção, 10 larvas do inseto com 20-30 dias após a eclosão foram previamente mantidas em gelo por 10 minutos para reduzir o seu metabolismo. A microinjeção foi realizada utilizando uma microsseringa (Hamilton Co.), tipo Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10 μL , com agulha de 51 mm, gauge 26S, estilo de ponta 4 e bisel de 12° . Em cada inseto foi aplicado 1 μL de solução aquosa contendo água bidestilada ou o dsRNA nas concentrações de 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 800 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 1.000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ou 5.000 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Inicialmente a injeção na larva foi realizada com auxílio de lupa, na região dos pseudópodes, próxima ao último segmento, tomando cuidado para não deixar extravasar a hemolinfa e para não perfurar o intestino. Devido a uma alta taxa de mortalidade das larvas durante o processo de microinjeção foi necessária uma adaptação do procedimento, que consistiu em realizar a microinjeção na região ventral, próxima ao primeiro segmento do inseto. Após a injeção do dsRNA, as larvas foram mantidas em dieta artificial a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 : 12 (C : E) por um período de 24, 48 ou 72 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Para a alimentação forçada, 1 μL de solução contendo água bidestilada ou dsRNA, na concentração de 1.000 $\text{ng}/\mu\text{L}$, foi diluído em 20 μL de água bidestilada acrescentada de 5% de sacarose. Com auxílio de uma lupa e uma micropipeta Gilson P20 com ponteiros para 10 μL , todo o volume foi aplicado diretamente na boca de 10 larvas de último ínstar visando forçar a sua deglutição. Após a alimentação, as larvas foram mantidas em dieta artificial a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 : 12 (C : E) por um período de 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Para o ensaio com administração de dsRNA em dieta, as larvas com 20 – 30 dias após a eclosão foram mantidas em jejum por 6 horas para deixá-las famintas. A cultura de bactérias que expressou o dsRNA foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos e o precipitado ressuspendido em 1 mL de dieta artificial (Anexo XII). Todo o volume de células foi misturado em 50 mL de dieta enquanto esta apresentou temperatura 40 - 50 $^\circ\text{C}$ e, então, 50 μL foram distribuídos em cada poço de uma placa de 96 poços. Após solidificação da dieta as larvas foram colocadas separadamente em cada poço e as placas mantidas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 : 12 (C : E). O ensaio durou uma semana e

todos os dias as larvas foram transferidas para novas placas com dieta fresca contendo dsRNA ou não (no caso do controle negativo). A cada dois dias, as lagartas foram avaliadas quanto a alterações no comportamento, falta de alimentação e perda de peso. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.7 Teste de inibição da degradação de dsRNAs

Visando encontrar uma maneira de inibir a ação de RNases presentes na hemolinfa e no homogenato intestinal das larvas de *T. licus licus* sobre os dsRNAs, foram realizados ensaios os quais foram testadas diferentes concentrações de EDTA (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM e 50 mM) em dieta líquida.

Foi realizado um teste inicial de inibição da atividade da enzima ribonuclease A (RNase A – Sigma-Aldrich) sobre os dsRNAs. Uma alíquota da enzima na concentração de 10 µg/mL, foi adicionada à solução contendo 1.000 ng da expressão *in vitro* de dsRNA de 540 pb da quitina sintase II, a um volume final de 10 µL. A solução foi incubada a 37 °C por uma hora e em seguida todo o conteúdo foi aplicado em gel de agarose 1% para verificação da integridade do dsRNA por eletroforese.

Após verificada a eficiência do EDTA como agente inibidor da atividade da enzima RNase A, foram realizados testes de inibição da degradação dos dsRNAs quando incubados com a hemolinfa e com o homogenato intestinal de larvas de último ínstar. A hemolinfa foi extraída do vaso dorsal com auxílio da microseringa (Hamilton Co) utilizada nos bioensaios de microinjeção. O suco gástrico foi extraído de larvas alimentadas e de larvas que ficaram em jejum de 24 horas com auxílio de micropipeta após remoção do intestino dos insetos. Os ensaios foram conduzidos aplicando as mesmas concentrações de EDTA citadas anteriormente a uma solução contendo 1.000 ng de dsRNA, 5 µL de hemolinfa ou homogenato intestinal em um volume final de 10 µL. A solução foi incubada a 37 °C por uma hora e em seguida todo o conteúdo foi aplicado em gel de agarose 1% para verificação da integridade do dsRNA.

2.8 Análise do silenciamento gênico

O nível da expressão dos genes da quitina sintase II e da V-ATPase A foi determinado por meio de qRT-PCR. A reação foi realizada utilizando o termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA) com iniciadores específicos para cada gene (Tabela 10), produzindo um amplicon de 110 – 115 pb. Os genes de referência utilizados foram GAPDH e RPS18 de *T.*

licus licus, com os mesmos iniciadores descritos na tabela 9. Cada reação foi preparada em um volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 50 vezes; 5,1 µL de água bidestilada e 0,2 µM de cada iniciador (senso e antisenso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos uma curva de dissociação para cada iniciador (60 – 94°C, a cada 0,5 °C por 1 segundo) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de iniciadores ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras. A eficiência de cada iniciador para cada reação e as Cqs foram calculadas individualmente a partir do *software* qPCR miner (www.miner.ewindup.info) (ZHAO e FERNALD, 2005). A análise da expressão relativa de cada gene do bioensaio foi feita utilizando a ferramenta geNorm (Biogazelle Company) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Seleção das sequências para validação de genes de referência

Um dos objetivos deste trabalho foi a análise da expressão relativa de dois genes envolvidos em processos vitais do inseto, os genes que codificam a enzima quitina sintase II e V-ATPase subunidade A. Uma etapa importante para essa análise é estabelecer quais genes podem ser utilizados como referência para a quantificação relativa da expressão do gene alvo. A confiabilidade de qualquer experimento de análise de expressão relativa por qRT-PCR pode ser maior com a inclusão de genes que funcionem como controles endógenos para corrigir variações na eficiência de amplificação das reações e na quantificação de uma amostra para outra, sendo chamados de genes de referência ou *housekeeping genes*, os quais se presumem que tenham a expressão constitutiva sob diferentes condições experimentais (BUSTIN, 2002; RADONIC *et al.*, 2004; SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Esses genes têm sido escolhidos de duas maneiras: a partir de estudos previamente realizados com os mesmos ou utilizando homólogos de genes amplamente utilizados como referência em outros organismos modelos (TENG *et al.*, 2012). Entretanto, essas escolhas empíricas geralmente não possuem embasamento experimental e podem levar a interpretações errôneas da maioria dos resultados (JIAN *et al.*, 2008).

Dentre os genes de referência mais utilizados na literatura, encontram-se o codificador da subunidade ribossomal 18S (RPS18), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação (EF-1 α), β -actina (β -ACT), α -tubulina (α -TUB) e β -tubulina (β -TUB) (LOURENÇO *et al.*, 2008; MARONICHE *et al.*, 2011; SCHARLAKEN *et al.*, 2008). Existem evidências que sugerem que os genes de referência nem sempre são expressos de maneira estável em diferentes condições. O gene da β -actina, por exemplo, pode ser regulado pelo matrigel, uma matriz gelatinosa repleta de proteínas produzida por alguns tipos de células. Neste trabalho, Selvey e colaboradores (2001), demonstraram por qRT-PCR ao contrário do que foi observado para a expressão de β -actina, que a expressão do gene da subunidade ribossomal 18S apresentou um padrão de expressão mais consistente, com melhor reprodutibilidade e sem sofrer regulação pelo matrigel. Outros genes de referência como α -tubulina e GAPDH foram citados por apresentarem níveis de expressão variados em determinadas circunstâncias como, diferentes tecidos ou estágios de desenvolvimento (BRUNNER; YAKOVLEV; STRAUSS, 2004; DHAR *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2011; LORD *et al.*, 2010; PEI *et al.*, 2007; TRIVEDI e ARASU, 2005; WANG *et al.*, 2010).

Os trabalhos de análise da expressão de genes de insetos começaram muito incipientes, na maioria das vezes os estudos eram realizados utilizando como base os genes de referência já conhecidamente utilizados para outros organismos, porém sem qualquer trabalho de avaliação da estabilidade da expressão dos mesmos. Lourenço e colaboradores (2008) iniciaram a validação de genes de referência de abelhas, em diferentes tecidos e também entre abelhas operárias e abelhas rainhas. Foram analisados os níveis e a estabilidade da expressão dos genes da actina (ACT), proteína ribossomal 49 (RP49), fator de alongação 1-Alfa (EF1- α) e da proteína de associação ao TATA box (TBP-AF) por meio do uso de programas de computador disponíveis na rede mundial como o geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e Bestkeeper (PFAFFL *et al.*, 2004). No mesmo ano, Scharlaken e colaboradores (2008) realizaram a validação de 11 genes de referência de cérebros de abelhas infectadas por *E. coli* utilizando os mesmos programas.

Visando avaliar a expressão diferencial de genes de *T. castaneum*, pesquisadores identificaram diversos genes que vinham sendo rotineiramente utilizados como genes de referência por diferentes autores. Ao analisar a estabilidade da expressão de cada um desses genes, com os programas geNorm e NormFinder, após a infecção do inseto por fungos, eles observaram que a β -actina, α -tubulina e RPS6 não apresentavam estabilidade suficiente para serem usados em qRT-PCR. Os genes mais estáveis foram o genes de proteínas ribossomais RPS13, RPS18 e RPL13a. Além disso, foram identificados outros genes que podem ser utilizados como normalizadores, syntaxina-1, syntaxina-6 e E-caderina (LORD *et al.*, 2010).

Novos trabalhos de validação de genes de referência em insetos têm surgido, a maioria deles utilizam os programas supracitados como uma maneira mais rápida e confiável de determinar a estabilidade e a forma de expressão de genes em diferentes condições fisiológicas e para vários tipos de tecidos (MARONICHE *et al.*, 2011; PAIM *et al.*, 2012; VAN HIEL *et al.*, 2009). Recentemente, foi realizado estudo de validação de genes de referência para quatro lepidópteros, incluindo *Bombyx mori*, *Plutella xylostela*, *Chilo suppressalis* e *Spodoptera exigua* (TENG *et al.*, 2012). Com esses resultados os autores proveem novas oportunidades de aplicação desta metodologia para a caracterização e análise de expressão de genes de insetos considerados importantes pragas da agricultura.

No caso da broca-gigante não existe indicação de genes de referência até o momento. Dessa forma foi realizada uma extensa busca no transcrito desse inseto visando identificar genes utilizados como referência em experimentos de qRT-PCR com outros organismos. Foram selecionados sete genes candidatos que codificam para a síntese de β -actina (β -ACT),

α -tubulina (α -TUB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fator de alongação 1-Alfa (EF-1 α), ubiquitina (UBQ), fosforibosil-pirofosfato-sintetase (PRPP) e para a subunidade ribossomal S18 (RPS18). Os genes foram analisados quanto à sua estabilidade de expressão em diferentes fases do ciclo de vida do inseto como, ovo, larvas neonatas, larvas de último ínstar, pupas e adultos. A análise da estabilidade foi realizada com os programas Bestkeeper, geNorm e NormFinder, que são aqueles que vêm sendo utilizados com maior frequência nos trabalhos científicos.

Há certo tempo existe uma preocupação na comunidade científica internacional em relação às inúmeras fontes de erro inerentes a um experimento de qRT-PCR, desde o desenho do experimento, passando pela integridade e garantia de repetibilidade da extração de RNA e síntese de cDNA, até a PCR propriamente dita e seus métodos de análise (BUSTIN, 2010; FLEIGE e PFAFFL, 2006; FLEIGE *et al.*, 2006; LEFEVER *et al.*, 2009). Apesar de utilizar um método fluorimétrico para quantificar o RNA, a eficiência da síntese de cDNAs não foi quantificada. Para tentar diminuir o erro gerado por uma possível diferença de quantidade de cDNA, todas as amostras foram diluídas previamente 30, 40 e 50 vezes, e uma corrida prévia mostrou que 40 vezes era uma quantidade considerada suficiente para que os valores de C_q se mantivessem entre os ciclos 15 e 30. Assim, todas as corridas foram feitas diluindo o cDNA 40 vezes. As qRT-PCRs realizadas para os sete genes foram feitas colocando todos os cDNAs para um mesmo gene numa mesma placa. Um mesmo cDNA com o mesmo gene foi sempre utilizado como normalizador entre as placas. As análises das curvas de dissociação de cada corrida não apresentaram dímeros de iniciadores nem ampliações inespecíficas.

3.2 Validação dos genes de referência pelo programa Bestkeeper

O Bestkeeper combina candidatos altamente correlacionados em um índice. A partir disso, a correlação de cada gene candidato com este índice é calculada e expressa pelo coeficiente de determinação e pelo *p-value*. O Bestkeeper ainda determina o desvio-padrão e a capacidade de referência de cada gene, cabendo ao usuário selecionar os melhores genes baseado nessas variáveis (PFAFFL *et al.*, 2004).

De acordo com a análise de variações calculadas (SD), o Bestkeeper revelou uma estabilidade de expressão para cada um dos sete genes (SD < 1) diferente para cada fase do ciclo de vida do inseto (Tabela 11). Além disso, os melhores genes candidatos se relacionaram de maneira significativa com o índice do Bestkeeper calculado como a média geométrica dos valores de C_q dos diferentes genes para um determinado cDNA (*p* < 0,05). O

coeficiente de determinação (CD) de cada gene indica a maior estabilidade para cada gene quanto mais perto de 1 for o valor de CD. A variância intrínseca (InVar) desses genes para uma determinada amostra teve baixa variação dos valores de Cq. O Bestkeeper analisou a integridade da amostra através do cálculo de uma variação intrínseca para uma amostra, entre as diferenças nos valores respectivos de Cq e o valor médio de Cq para cada gene de referência (PFAFFL *et al.*, 2004).

Dessa forma, com os dados da tabela 11, os genes mais estáveis, calculados pelo Bestkeeper foram organizados de acordo com cada fase do ciclo de vida. Nos ovos, os genes mais estáveis foram para UBQ, EF-1 α , e RPS18. Nas larvas neonatas, apenas dois genes foram considerados estáveis para uso em qRT-PCR, GAPDH e β -ACT. O restante dos genes nesse tecido ou apresentaram um *p-value* acima de 0,05 ou apresentaram uma variância intrínseca muito alta dentro das amostras. Nas larvas de último ínstar, os genes para UBQ, RPS18 e EF-1 α foram identificados como mais estáveis. No caso das pupas, apenas os genes para α -TUB e UBQ foram considerados estáveis, o restante apresentou um valor de desvio padrão acima de 1, o que é considerado muito ruim e, conforme recomendado por PFAFFL *et al.* (2004), foram descartados do estudo. A análise da expressão dos genes em machos indicou que PRPP e UBQ foram os mais estáveis, sendo que o restante apresentou um *p-value* ou a InVar muito altos. Já para as fêmeas, o programa identificou os genes GAPDH, EF-1 α e PRPP como os melhores. Um resumo geral dos resultados dos melhores genes pode ser visualizado na tabela 12.

Tabela 11. Sumário da análise estatística gerada pela ferramenta Bestkeeper para validação de genes de referência em diferentes fases do ciclo de vida de *T. licus licus*. O Coeficiente de Determinação (CD) indica maior estabilidade quanto mais perto de 1.

Fase do ciclo de vida	Genes de referência candidatos						
	β -act	α -tub	EF-1A	GAPDH	UBQ	PRPP	RPS18
Ovo	-	-	-	-	-	-	-
N	9	9	8	4	8	9	9
MG	18.64	26.08	20.16	24.51	25.67	23.66	21.46
SD	1.17	0.8	0.53	1.01	0.41	0.2	0.92
CD	0	0.13	0.66	-	0.71	0.25	0.65
<i>p</i> -value	0.931	0.337	0.014	-	0.008	0.175	0.009
LP	-	-	-	-	-	-	-
N	8	9	9	9	9	7	9
MG	17.55	19.86	20.46	19.08	22.12	22.21	23.73
SD	1.32	0.27	0.47	0.24	0.29	0.63	0.15
CD	0.71	0	0.13	0.71	0.09	-	0.26
<i>p</i> -value	0.008	1	0.351	0.004	0.439	-	0.16
LG	-	-	-	-	-	-	-
N	9	5	9	8	7	9	8
MG	1.89	23.3	23.31	20.15	25.67	23.66	24.83
SD	1.16	1.39	1.03	0.09	0.95	0.1	0.29
CD	0.65	0.87	0.55	0	0.73	0.14	0.45
<i>p</i> -value	0.008	-	0.022	0.886	0.014	0.32	0.0068
Pupa	-	-	-	-	-	-	-
N	8	9	9	9	8	7	9
MG	20.99	19	22.84	24.19	23.12	28.57	27.19
SD	0.34	0.65	1.54	1.78	0.98	2.12	1.77
CD	0.11	0.9	0.89	0.94	0.87	0.85	0.96
<i>p</i> -value	0.428	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001
Macho	-	-	-	-	-	-	-
N	9	7	5	9	9	9	8
MG	19.52	19.77	22.96	20.97	22.89	25.22	25.11
SD	1.46	0.41	1.17	0.35	0.65	0.49	0.35
CD	0.17	0.1	0.67	0.03	0.52	0.75	0.27
<i>p</i> -value	0.273	0.493	-	0.646	0.027	0.002	0.189
Fêmea	-	-	-	-	-	-	-
N	9	9	8	9	9	9	9
MG	19.65	19.84	21.27	20.5	22.56	25.58	24.61
SD	0.74	0.18	0.27	0.9	0.41	0.66	0.43
CD	0.56	0.41	0.85	0.9	0.29	0.61	0.59
<i>p</i> -value	0.02	0.065	0.001	0.001	0.131	0.013	0.016

Legenda. Número de replicatas (N), Média geométrica (MG), Desvio padrão (SD), Coeficiente de Determinação (CD), Larva neonata (LP), Larva de último ínstar (LG).

3.3 Validação dos genes de referência pelo programa geNorm

Uma das características principais do geNorm é que a taxa de expressão entre dois genes de referência deve ser constante entre as amostras (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Para cada gene candidato, o geNorm calcula o valor de estabilidade M como a variação média no nível dos transcritos entre um gene e todos os outros genes em um dado grupo de amostras, por pares. O valor de estabilidade M é inversamente proporcional à estabilidade. Os genes são, então, classificados de acordo com a estabilidade por um processo de exclusão passo a passo dos genes menos estáveis, gerando o valor de V. Quanto menor este valor, maior a estabilidade e a possibilidade do gene excluído influenciar na expressão relativa de genes-alvo.

No presente estudo, conforme apresentado na figura 38, observou-se que os valores de M para cada fase do ciclo de vida do inseto ficaram abaixo de 1,5. Esse valor, por convenção, indica o limite no qual a expressão dos genes é estável. Os índices observados indicaram que todos os genes apresentam estabilidade de expressão suficiente para serem utilizados como referência, porém, com variações entre cada uma das fases do ciclo de vida.

Apesar de todos os genes terem apresentado boa estabilidade para uso em qRT-PCR, a escolha de pelo menos dois genes de referência não pode ser realizada aleatoriamente, ou seja, não se pode escolher quaisquer dois genes para serem utilizados conjuntamente para análise da expressão relativa. Para isso, o geNorm analisou a influência da adição de um ou mais genes nos experimentos de qRT-PCR e determinou a confiança da combinação dos genes de referência selecionados, de acordo com os valores de V calculados pelo programa.

Os resultados mostraram que, para todas as fases do ciclo de vida do inseto foi possível identificar pelo menos dois genes que podem ser utilizados em conjunto nos experimentos de qRT-PCR, apresentando um valor V abaixo de 0,15; que indica alta estabilidade e confiança nos valores de expressão dos genes (Figura 39).

No caso dos ovos, por exemplo, os genes mais estáveis foram para GAPDH, UBQ e RPS18. De acordo com a figura 39, o uso conjunto de GAPDH e UBQ permite a análise da expressão relativa com grande confiança. Quando o terceiro gene mais estável, no caso RPS18, é adicionado ao estudo, a confiança do estudo diminui. No caso das larvas neonatas, a maior estabilidade foi identificada para GAPDH, RPS18 e UBQ. Nas larvas de último ínstar, os três genes mais estáveis foram PRPP, GAPDH e RPS18. Para as pupas, o geNorm calculou uma maior estabilidade para GAPDH, RPS18 e EF-1 α . Na análise de estabilidade

dos genes nos machos adultos, o programa identificou α -TUB, UBQ e PRPP como os melhores. No caso das fêmeas, os genes identificados foram para α -TUB, EF-1 α e GAPDH. Um resumo geral dos resultados dos melhores genes pode ser visualizado na tabela 12.

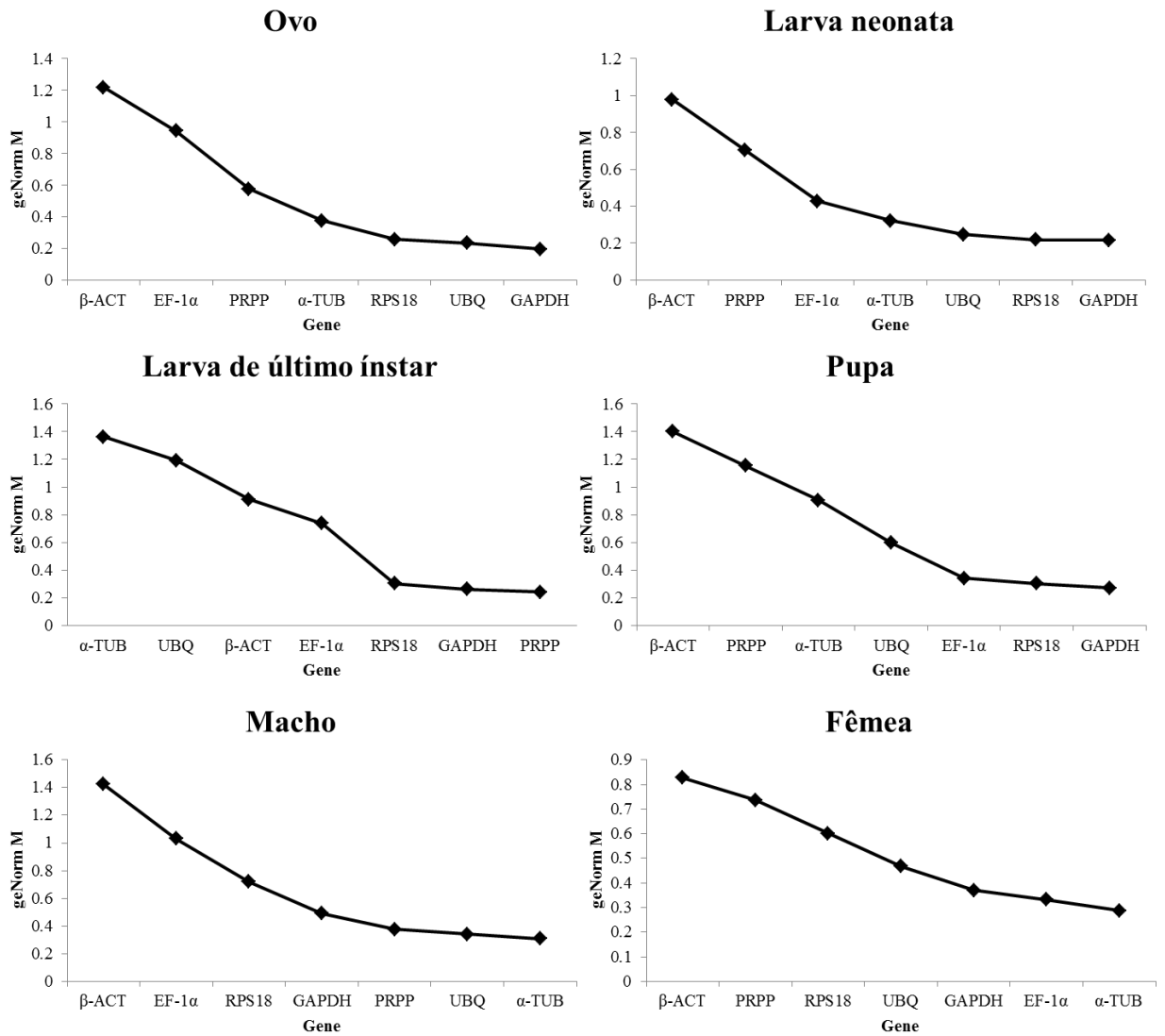


Figura 38. Valores de M após análise de estabilidade pelo geNorm. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

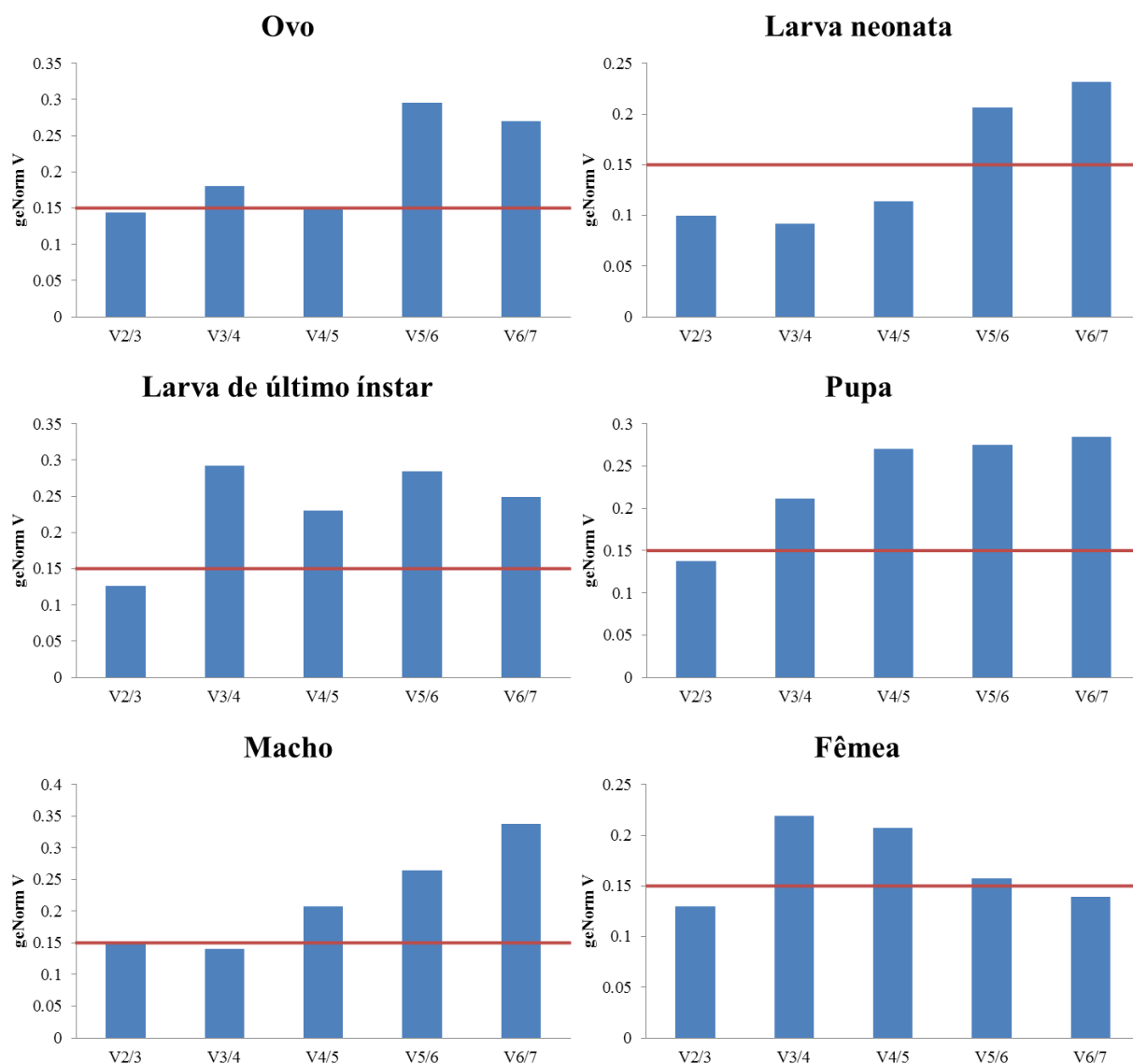


Figura 39. Valores de V após análise de estabilidade pelo geNorm. A combinação de genes mais estável tem valores de V menores que 0,15. Cada barra do gráfico indica a influência na confiança do experimento quando um gene de referência é adicionado à análise.

3.4 Validação dos genes de referência pelo programa NormFinder

O NormFinder é uma ferramenta que permite estimar a variação total dos genes de referência candidatos, mas também estima a variação entre e dentro de subgrupos de amostras. Este processo permite uma medição direta da variação da expressão, permitindo ao usuário avaliar o erro sistêmico introduzido quando utilizar como modelo um determinado gene. Esta abordagem baseada em um modelo é teoricamente menos sensível a uma correção por genes normalizadores que as abordagens do BestKeeper e do geNorm. Da mesma forma que o geNorm, o NormFinder gera um valor de estabilidade M para cada gene, que é a medida direta da variação da expressão estimada. Esta variação na expressão está

diretamente relacionada com o valor M, já que um baixo valor M demonstra menor variação de expressão gênica entre as amostras estudadas (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

Os valores de M obtidos pelo NormFinder estão plotados na figura 40. Os valores de M para todas as fases do ciclo de vida do inseto, que estão abaixo de 1,5; indicam que a expressão de diferentes candidatos é relativamente estável. Entretanto, a estabilidade dos genes foi variável entre as fases do ciclo de vida. Nos ovos, os genes mais estáveis foram UBQ, RPS18 e PRPP. Nas larvas neonatas o programa identificou uma melhor estabilidade na expressão dos genes UBQ, RPS18 e α -TUB. Já para as larvas de último ínstar, os melhores valores de estabilidade foram calculados para EF-1 α , β -ACT e UBQ. No caso das pupas, a expressão mais estável foi determinada para α -TUB, GAPDH e UBQ. Para os dados da expressão dos genes nos machos adultos, o NormFinder calculou os melhores valores de M para PRPP, RPS18 e α -TUB. Por fim, o programa permitiu identificar os genes GAPDH, α -TUB e RPS18 como os que apresentaram a menor variação na expressão em fêmeas adultas. Um resumo geral dos resultados dos melhores genes de referência pode ser visualizado na tabela 12.

Dentre os três programas utilizados para a validação dos genes de referência, o NormFinder é o único que possibilita calcular a estabilidade da expressão entre os grupos de amostras analisadas. Dessa forma foi possível identificar o melhor valor de M entre todos os genes e entre todos os tecidos e a melhor combinação de genes a serem utilizados em conjunto nos experimentos de qRT-PCR. Os resultados mostraram que para as fases do ciclo de vida utilizadas no presente estudo, o gene mais estável foi RPS18, e a melhor combinação de dois genes para UBQ e PRPP, de acordo com os valores de estabilidade presentes no gráfico da figura 41.

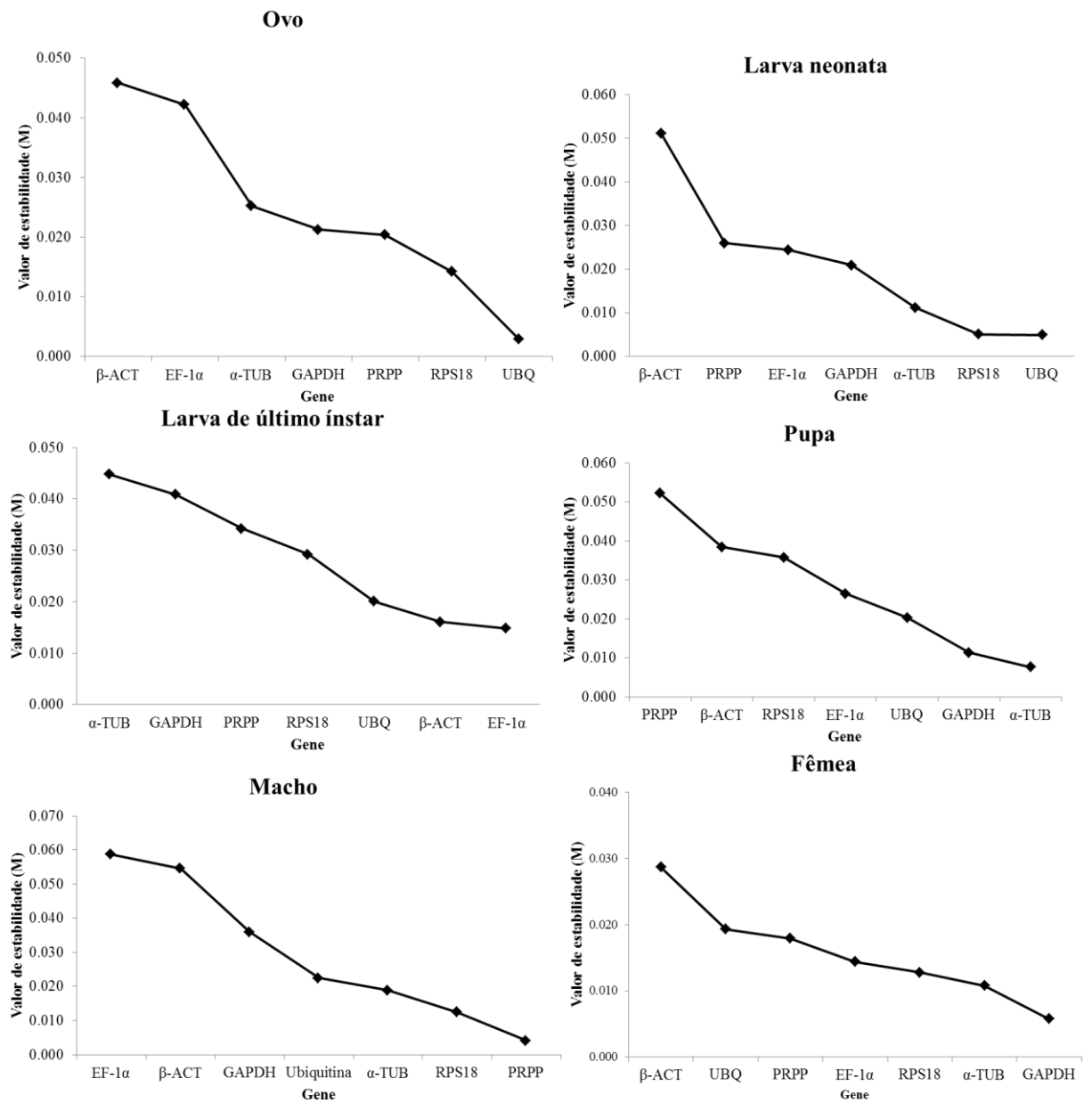


Figura 40. Valores de M após análise de estabilidade pelo NormFinder. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

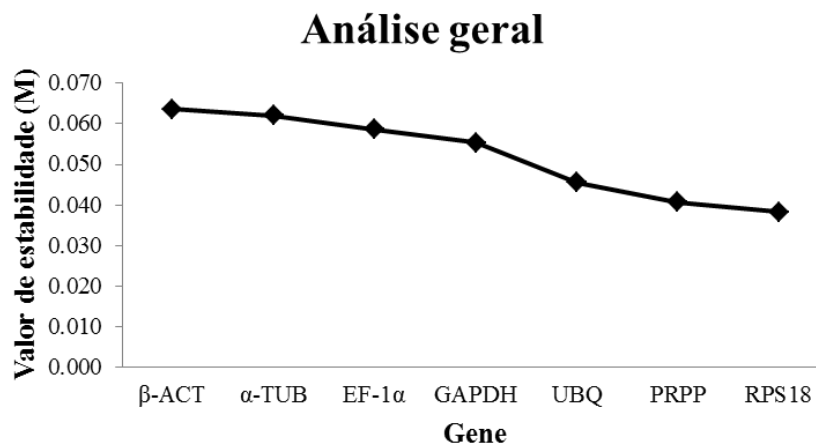


Figura 41. Valores de M após análise de estabilidade geral pelo NormFinder. Os genes mais estáveis têm valores de M menores que 1,5. Quanto mais à direita do gráfico, maior a estabilidade.

3.5 Análise geral dos resultados de validação

As análises dos genes candidatos mostraram uma diferença nos resultados gerados pelas três ferramentas utilizadas. Os genes da β -actina (β -ACT) e fosforribosil-pirofosfato-sintetase (PRPP) foram os menos estáveis, mas em alguns casos específicos podem ser utilizados como referência. Por exemplo, PRPP foi identificado como um bom gene para analisar a expressão relativa de genes em amostras oriundas de machos adultos. O restante dos genes apresentou distribuição homogênea pelas demais amostras. Em uma tentativa de fazer um balanço geral da validação dos genes, os mesmos foram organizados pela ordem de estabilidade para cada programa e pela frequência geral (Tabela 12). Observou-se que os genes que foram identificados mais vezes entre os mais estáveis foram ubiquitina (UBQ), proteína da subunidade ribossomal S18 (RPS18) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). É importante salientar que essa análise não serve para identificar um grupo universal de genes de referência. A escolha de cada um, e mais ainda, a escolha de pelo menos dois genes vai depender de diferentes condições dos experimentos.

Como cada programa gerou uma análise distinta, fica difícil escolher qual deles representa de maneira mais confiável a validação da estabilidade dos genes de referência. Em muitos trabalhos que utilizam os três algoritmos, ocorre uma convergência entre geNorm e NormFinder e uma discrepância destes com BestKeeper. Bestkeeper parece ser o menos utilizado dos três na escolha da validação de genes-alvo, principalmente por ser um programa que faz apenas a análise estatística do perfil de expressão dos genes. NormFinder e geNorm se baseiam em algoritmos parecidos para análise e levam em consideração o uso combinado

de dois ou mais genes nos experimentos e por isso o resultado gerado por eles são os mais considerados por muitos trabalhos científicos.

Genes de referência em estudos de qRT-PCR para muitas espécies foram baseados em consenso e experimentos com outros organismos, sem uma evidência empírica que demonstrasse sua estabilidade. Apesar da escolha dos genes aqui testados ser baseada, principalmente na literatura, os resultados obtidos mostram que a estabilidade da expressão de genes já considerados como referência deve ser verificada para cada tipo de experimento, principalmente se algum tratamento específico vai ser analisado (estresse, interação, alimentação, etc). No mínimo, ao mudar uma condição à qual o organismo será submetido, a estabilidade de um gene já utilizado como referência deve ser confirmada.

No presente estudo, para a análise do perfil de expressão dos genes que codificam as enzimas quitina sintase II e V-ATPase A foram selecionados os genes GAPDH e RPS18 para serem utilizados como referência nos experimentos de qRT-PCR.

Tabela 12. Análise geral da validação dos genes de referência. Para cada programa três genes, quando possível, foram organizados em ordem de estabilidade. A frequência geral apenas indica os genes mais frequentes sem nenhuma relação com estabilidade. Larvas neonatas (LP), larvas de último ínstar (LG).

	geNorm	NormFinder	Bestkeeper	Frequência Geral
Ovo	GAPDH, UBQ, RPS18	UBQ, RPS18, PRPP	UBQ, EF-1 α , RPS18	UBQ, RPS18
LP	GAPDH, RPS18, UBQ	UBQ, RPS18, α -TUB	GAPDH, β -ACT	GAPDH, RPS18, UBQ
LG	PRPP, GAPDH, RPS18	EF-1 α , β -ACT, UBQ	UBQ, RPS18, EF-1 α	RPS18, EF-1 α
Pupa	GAPDH, RPS18, EF-1 α	α -TUB, GAPDH, UBQ	α -TUB, UBQ	GAPDH, α -TUB, UBQ
Macho	α -TUB, UBQ, PRPP	PRPP, RPS18, α -TUB	PRPP, UBQ	PRPP, α -TUB
Fêmea	α -TUB, EF-1 α , GAPDH	GAPDH, α -TUB, RPS18	GAPDH, EF-1 α , PRPP	GAPDH, α -TUB, EF-1 α
Frequência Geral	GAPDH, RPS18, UBQ	UBQ, RPS18, α -TUB	UBQ, EF-1 α , RPS18	UBQ, RPS18, GAPDH

3.6 Análise da expressão dos genes da quitina sintase II e V-ATPase

Antes de iniciar os experimentos de silenciamento de genes da broca-gigante foi realizada a análise do perfil de expressão dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A em cada fase do ciclo de vida do inseto. Essa informação serviu para definir a fase ideal para testar o silenciamento dos genes. Por exemplo, se nas larvas neonatas a expressão de quitina sintase II ou de V-ATPase A forem muito baixas será muito difícil determinar a influência do RNA interferente na redução da expressão desses genes. Porém se os níveis de transcritos se mostrarem altos haverá possibilidade de correlacionar uma determinada variação na redução da expressão com os efeitos do silenciamento.

A análise da expressão relativa dos genes na diferentes fases do ciclo de vida de *T. licus licus* mostrou claramente que o gene da quitina sintase II é expresso principalmente nos estágios larvais. Esses resultados eram esperados, pois são nos estágios larvais em que os insetos mais se alimentam, principalmente, de partículas sólidas. Foi observada uma baixa expressão desse gene nos ovos e nos adultos. Estes últimos se alimentam pouco e de substâncias líquidas que não formam um bolo alimentar e não estimulam a síntese de nova quitina para renovar a membrana peritrófica do intestino. A baixa expressão nos ovos deve-se, provavelmente, ao baixo metabolismo de quitina durante a fase embrionária, uma vez que o inseto não se alimenta de partículas sólidas. Da mesma maneira, um perfil similar pode ser observado na fase de pupa, já que quase todo o metabolismo está direcionado para o consumo das reservas energéticas e para a realização da metamorfose (Figura 42).

A expressão relativa do gene da V-ATPase A mostrou um padrão um pouco mais homogêneo nas diferentes fases do ciclo de vida. Isso pode ser explicado pelo fato de a V-ATPase ser uma bomba de prótons de grande importância para o organismo de insetos em geral. Entretanto foi possível observar que nos estágios larvais houve uma expressão alta do gene quando comparada aos outros estágios do ciclo de vida (Figura 42).

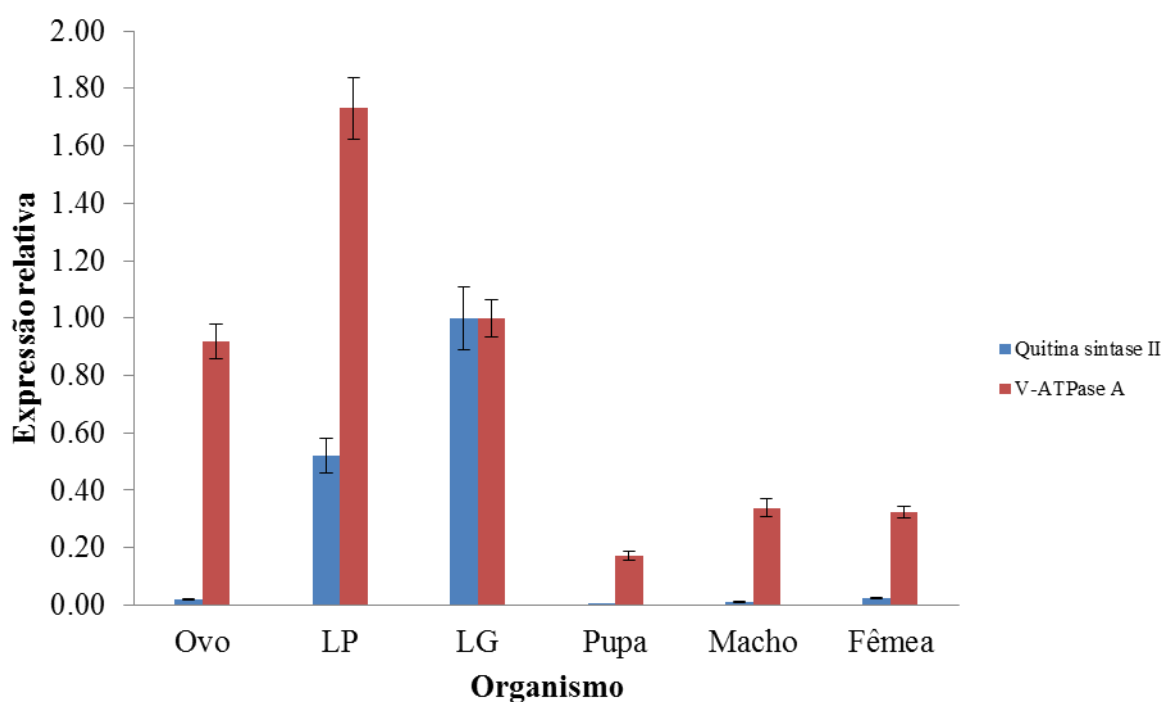


Figura 42. Expressão relativa dos genes de quitina sintase II e V-ATPase A nas diferentes fases do ciclo de vida do inseto. Larvas neonatas (LP), larvas de último ínstar (LG).

3.7 Clonagem dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A

Os genes que codificam as enzimas quitina sintase II e a subunidade A da V-ATPase foram amplificados por PCR, utilizando os iniciadores com os sítios de recombinação do sistema Gateway. Na figura 43A, é mostrado o resultado da amplificação de um fragmento de 540 pb do gene da quitina sintase II. Na figura 43B, é possível observar o resultado da amplificação de fragmentos dos genes da enzima quitina sintase II e da subunidade A da V-ATPase, ambos de 150 pb. Os dois tamanhos diferentes selecionados para o gene da quitina sintase II serviram para comparar se há alguma relação entre o tamanho do dsRNA e a redução na expressão do gene. Após verificar a integridade das amostras em gel de agarose foi possível observar que os fragmentos amplificados ficaram um pouco acima do tamanho esperado, mas isso se deve ao fato de que, a sequência de recombinação ATTB adicionada à sequência do iniciador introduz aproximadamente 60 pares de bases adicionais ao amplicon. Além disso, é muito comum ocorrer a formação de híbridos oriundos de autoanelamento desses iniciadores, observáveis como bandas fracas no gel, mas que não correspondem a amplificação inespecífica ou contaminação da amostra de DNA. Como uma medida de segurança após cada recombinação, seja no vetor de entrada pDONR ou no vetor de destino L4440, as amostras foram submetidas a sequenciamento para confirmação da sequência nucleotídica.

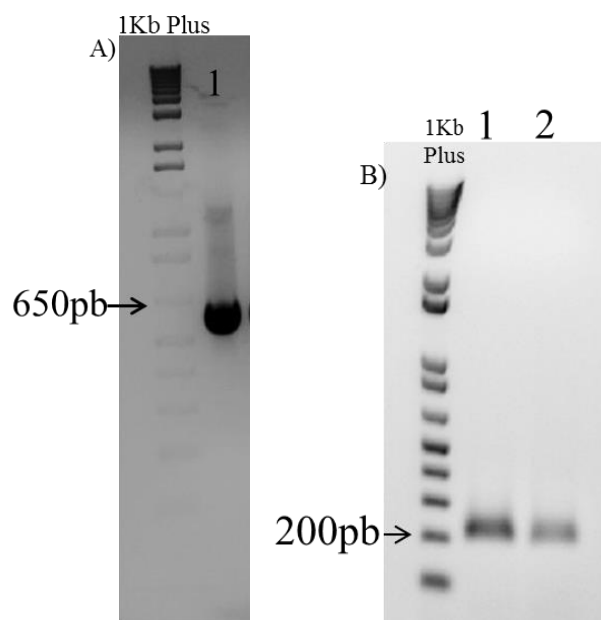


Figura 43. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação dos fragmentos dos genes utilizados nos experimentos de silenciamento gênico. A) Produto da PCR do gene quitina sintase II de 540 pb. É possível verificar a formação de bandas adicionais devido a autoanelamento dos iniciadores. B) Produto da PCR dos genes da V-ATPase A de 150 pb (1) e quitina sintase II de 150 pb (2).

3.8 Avaliação do silenciamento dos genes da quitina sintase II e V-ATPase A

Tendo observado os resultados da expressão de cada gene nas diferentes fases do ciclo de vida da broca-gigante foi possível montar os experimentos de silenciamento gênico. Após a clonagem de todos os fragmentos de DNA no vetor L4440, via sistema Gateway, foi realizada a expressão *in vitro* dos dsRNAs. A figura 44 mostra a integridade e a qualidade do dsRNA para cada gene, obtida após eletroforese um gel de agarose 1%.

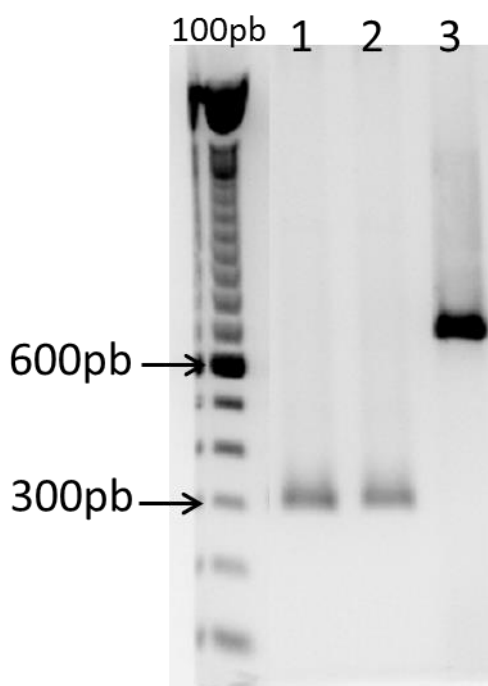


Figura 44. Gel de agarose 1% mostrando a qualidade da síntese *in vitro* de dsRNA. (1) Expressão de dsRNA de quitina sintase II (150 pb), (2) V-ATPase A (150 pb), (3) quitina sintase II (540 pb).

Existem três formas principais de entrega de dsRNA em insetos, uma delas e a mais utilizada é a microinjeção, pois permite que o dsRNA seja entregue diretamente no tecido desejado ou na hemocele que irá levar para diferentes partes do corpo do inseto, através do sistema circulatório. Outra forma de entrega é por meio de imersão (*soaking*), que consiste em colocar o inseto imerso em uma solução contendo dsRNA, que será então absorvido pela cutícula. A terceira forma é através de entrega pela alimentação, sendo que esta última pode ainda ser realizada a partir de expressão *in vitro* e entrega direta na boca do inseto ou misturada com a dieta. Além disso, outra maneira de entrega pela dieta é a expressão de dsRNA em bactérias, especialmente células de *E. coli* HT115, que não sintetizam a enzima RNase III que cliva os dsRNAs. Dessa forma, a adição da bactéria à dieta serve como uma

forma de proteger o dsRNA da ação do sistema digestório do inseto até atingir o local devido. Essa técnica foi utilizada com sucesso em trabalhos anteriores (TIAN *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2011).

O procedimento de microinjeção de dsRNA diretamente na hemolinfa tem sido utilizado predominantemente para a validação funcional de genes de insetos (TURNER *et al.*, 2006). Em *D. melanogaster*, esse método tem sido utilizado com tanto sucesso que transformou a mosca da fruta em um modelo de estudos de função de genes e vem revolucionando diversas áreas como a genética (YU *et al.*, 2012). Outro inseto que tem contribuído bastante para os estudos com RNAi é o *Tribolium castaneum* sendo que a microinjeção tem sido a melhor escolha para os experimentos (NOH; BEEMAN; ARAKANE, 2012). A escolha do método de entrega do dsRNA para o inseto é de grande importância, pois apesar de ser um mecanismo muito conservado em diversos organismos, o RNAi pode ser composto por vias completamente diferentes que utilizam proteínas distintas (HUVENNE e SMAGGHE, 2010).

De acordo com o comportamento de *T. licus licus* na natureza, logo que as larvas eclodem, elas começam a perfurar a base da planta de cana-de-açúcar onde se instalam e passam a se alimentar. Qualquer tentativa de controlar a população desse inseto deve acontecer antes que ele entre na planta ou enquanto as larvas ainda estão muito pequenas, pois assim o inseticida ou qualquer outro método biológico poderão ter maior sucesso. Um dos problemas enfrentados durante os bioensaios de microinjeção de larvas neonatas da broca-gigante foi o fato de elas serem muito sensíveis ao procedimento. Quando a agulha é introduzida nos pseudópodes, próximo ao último segmento, como é feito normalmente para a maioria dos insetos, há um índice de mortalidade muito alto, provavelmente, porque durante a injeção o intestino é perfurado, o que causa o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemolinfa. Visando evitar tais problemas de procedimento foram testados outros locais de injeção aos quais as larvas sofreriam menos injúrias. Todas as tentativas de injeção na região dorsal do inseto resultaram em um ferimento que extravasava muita hemolinfa, causando quase 100% de mortalidade e, portanto, não são recomendadas. A opção que apresentou os melhores resultados foi a microinjeção na região ventral anterior, próxima ao primeiro segmento do corpo do inseto. Dessa maneira a mortalidade foi reduzida para no máximo 10% (Figura 45).

Após a quantificação das amostras, os dsRNAs foram microinjetados nas concentrações de 250 ng/ μ L, 500 ng/ μ L, 800 ng/ μ L, 1.000 ng/ μ L ou 5.000 ng/ μ L em larvas neonatas de *T. licus licus*, de acordo com o procedimento explicado anteriormente. O nível de

mortalidade das larvas devido ao procedimento foi muito baixo, todas aquelas que comprovadamente foram prejudicadas pelo processo de microinjeção foram descartadas da análise. Após a introdução da solução contendo os dsRNAs ou água, as larvas foram observadas durante o período que antecedeu o seu congelamento para identificação de qualquer alteração de comportamento, falta de alimentação e perda de peso.



Figura 45. Detalhe do procedimento de microinjeção na região ventral anterior em larvas de 20-30 dias após eclosão.

Ao microinjetar dsRNA de 540 pb para quitina sintase II nas concentrações de 250 ng/ μ L, 500 ng/ μ L e 800 ng/ μ L, não foi observado nenhum efeito de silenciamento 24 horas após a administração (Figura 46). A injeção de dsRNA de 150 pb para quitina sintase II, nas mesmas concentrações, apresentou redução na expressão dos genes, mas esse efeito não pôde ser repetido na outras replicatas biológicas, portanto não foi possível determinar se a diferença no tamanho dos dsRNAs poderia resultar em um efeito de silenciamento diferente (Figura 47). Também foi analisado se o intervalo de tempo utilizado para a observação dos efeitos do silenciamento era suficiente para alcançar tal objetivo.

Foram testados os intervalos de 24, 48 e 72 horas após a microinjeção de 800 ng de dsRNA e, apesar de ter sido observada uma diminuição no número de transcritos, esse padrão não pôde ser repetido nas replicatas biológicas (Figura 48).

Visando testar uma dosagem alta de dsRNA foram injetados dsRNAs para V-ATPase A nas concentrações de 1.000 ng/ μ L e 5.000 ng/ μ L. Vinte e quatro horas após a injeção, os efeitos do silenciamento não foram observados (Figuras 49 e 50).

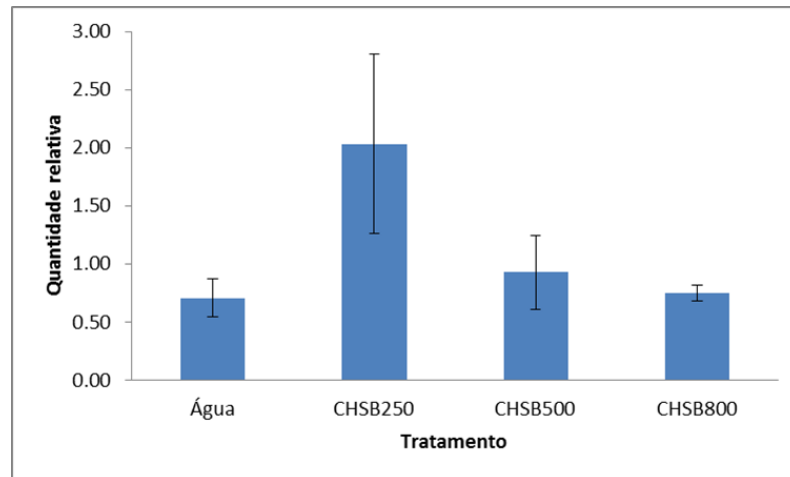


Figura 46. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB). Larvas de *T. licus licus* foram injetadas com água (controle negativo) e com quantidades diferentes de dsRNA de 540 pb para CHSB (250 ng, 500 ng e 800 ng). O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

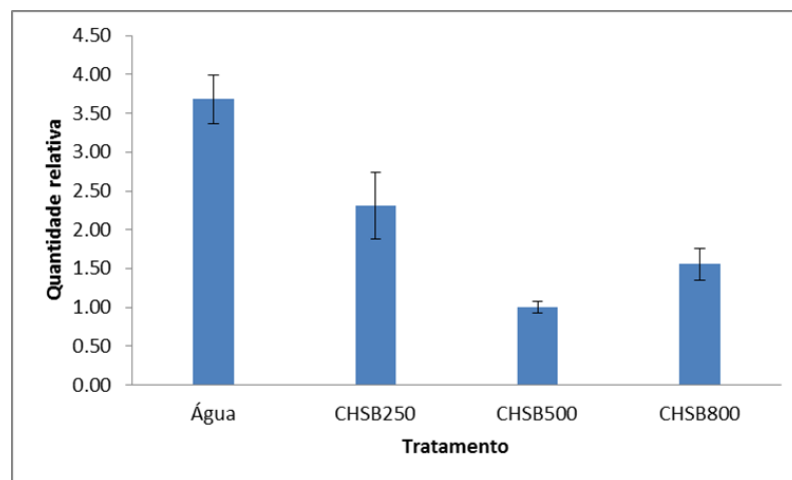


Figura 47. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB). Larvas de *T. licus licus* foram injetadas com água (controle negativo) ou com quantidades diferentes de dsRNA de 150 pb para CHSB (250 ng, 500 ng e 800 ng). O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

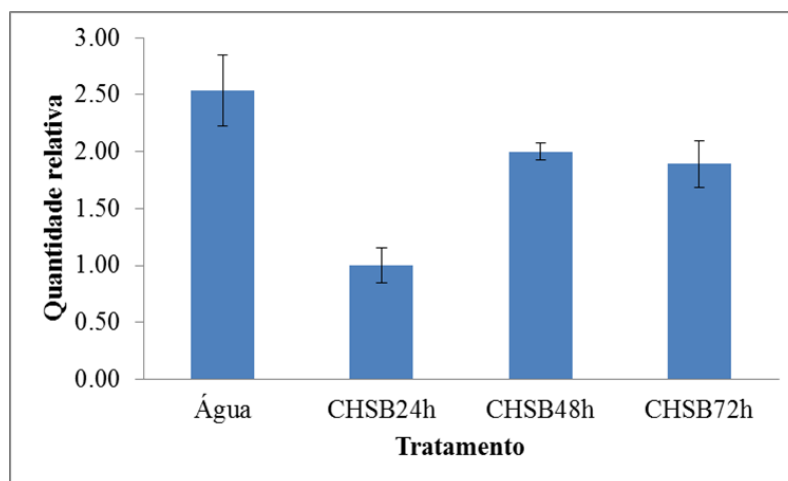


Figura 48. Comparação da quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB) entre os insetos injetados com água (controle negativo) e injetados com 800 ng de dsRNA (150 pb) para CHSB. A avaliação dos efeitos do silenciamento foi realizada em 24, 48 e 72 horas após a injeção. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

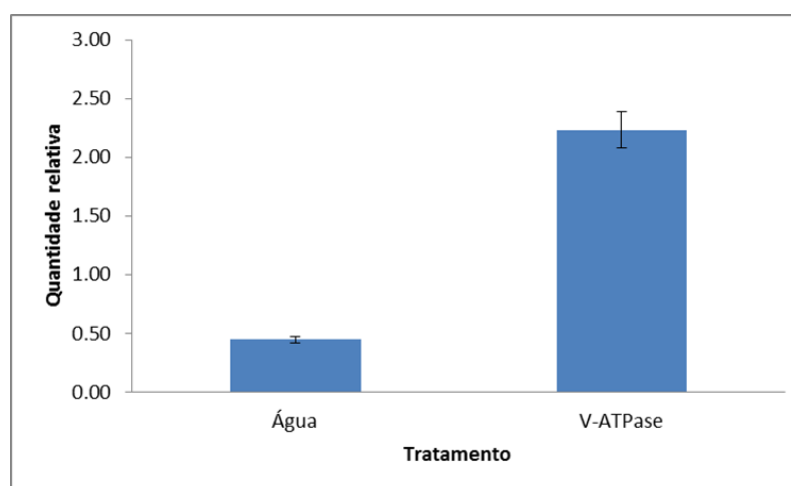


Figura 49. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de V-ATPase A entre os insetos injetados com água (controle negativo) e injetados com 1.000 ng de dsRNA (150 pb) para V-ATPase A. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

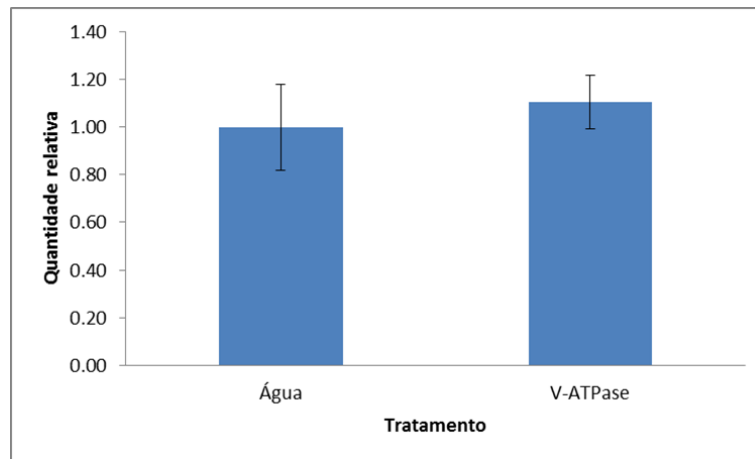


Figura 50. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de V-ATPase A entre os insetos injetados com água (controle negativo) e injetados com 5.000 ng de dsRNA (150 pb) para V-ATPase A. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

De acordo com os resultados obtidos com os experimentos de microinjeção, há a indicação de que os genes escolhidos não sejam ideais para a realização dos experimentos de silenciamento gênico, pois dependendo do seu número de cópia no genoma pode haver efeito compensatório da expressão dos mesmos. Em geral, tem-se observado que há apenas uma cópia do gene que codifica a síntese da quitina sintase II no genoma de insetos (ARAKANE *et al.*, 2004), mas para a broca-gigante essa informação ainda precisa ser determinada. No caso das V-ATPases não foram encontrados trabalhos que discutam a determinação do número de cópias do gene em qualquer organismo.

Outra explicação para as dificuldades encontradas nos experimentos de silenciamento de genes da broca-gigante é a possibilidade de que os dsRNAs não estão conseguindo chegar até o alvo, seja por vias diferentes de absorção de dsRNAs, seja por degradação dessas moléculas pela ação de RNases, ou até mesmo por problemas com a técnica de microinjeção. O método de entrega oral já foi utilizado com sucesso para *Diatraea saccharalis*, *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* e é considerado por alguns autores como o método mais adequado, pois além de não ser invasivo, reproduz em parte como o inseto se comportaria ao entrar em contato com o dsRNA na natureza (BAUTISTA *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-CABRERA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010). A expressão de dsRNA em plantas transgênicas também conseguiu mostrar bons resultados para o silenciamento de genes de *Helicoverpa armigera* e *Nilaparvata lugens* (MAO *et al.*, 2007; ZHA *et al.*, 2011).

Dessa forma foi testada a entrega oral para larvas de *T. licus licus* de 20-30 dias, mas o que se descobriu é que, diferentemente de *D. saccharalis*, *P. xylostella* e *S. frugiperda*,

a broca-gigante não se alimenta espontaneamente da gota de dieta contendo o dsRNA (*droplet feeding*), nem se forem deixadas sem se alimentar por 24 horas. Dessa forma, foi testada a entrega do dsRNA aplicando a solução diretamente na boca do inseto e forçando-o a engolir. Para isso foi necessário utilizar as larvas de último ínstar já que as larvas menores, além de serem muito sensíveis, eram pequenas demais para a aplicação da solução com micropipetas. Da mesma forma, 24 horas após a administração de dsRNAs para CHSB na concentração de 1.000 ng/ μ L, não houve qualquer indicação de que o silenciamento estivesse ocorrendo (Figura 51).

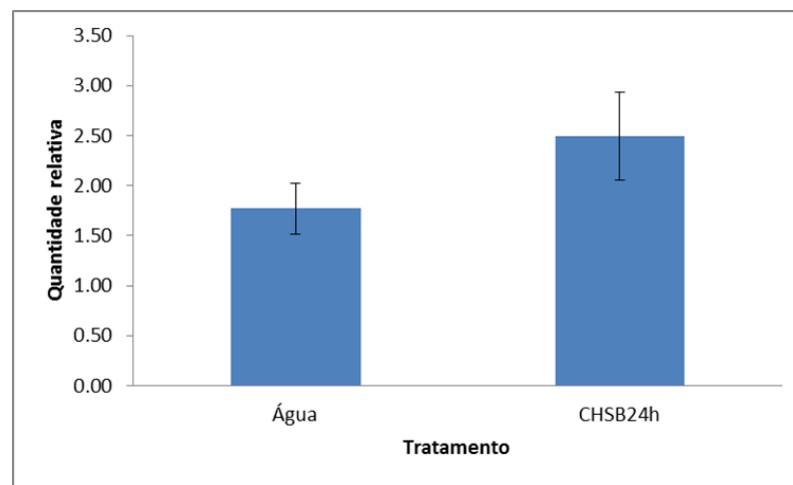


Figura 51. Análise da quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB) por qRT-PCR 24 horas após a alimentação forçada de larvas de último ínstar de *T. licus licus* com 1.000 ng de dsRNA. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

Para determinar se os dsRNAs poderiam ter sido degradados no organismo do inseto, foi realizada a extração da hemolinfa e do homogenato intestinal de larvas de último ínstar. O material foi incubado em soluções contendo 1.000 ng de dsRNA por 1 hora a 37 °C. O que foi possível perceber é que em ambos os casos os dsRNAs foram totalmente degradados. Essas mesmas características foram observadas em *S. frugiperda*, e contornadas ao utilizar um tampão contendo EDTA, um agente quelante, o que protegeu a síntese *in vitro* da ação das enzimas presentes no suco gástrico (RODRIGUEZ-CABRERA *et al.*, 2010). Outro fator importante observado por esses autores foi a diferença na degradação do dsRNA dependendo do estado fisiológico, ou seja, o suco gástrico de insetos que se alimentaram normalmente apresentou taxas de degradação muito maiores do que o de insetos que estavam em jejum.

Foram preparados ensaios iniciais de degradação enzimática do dsRNAs utilizando uma solução contendo diferentes concentrações de EDTA. A síntese *in vitro* do dsRNA de 540 pb da quitina sintase II foi incubada junto com RNaseA (10 µg/mL) por 1 hora a 37 °C para determinar se havia algum efeito de degradação e em qual concentração o EDTA seria capaz de inibir a ação enzimática sobre o dsRNA. Apesar de a enzima RNaseA clivar preferencialmente RNAs de fita simples, o seu efeito sobre dsRNAs também pode ser observado (YAKOVLEV *et al.*, 1995). Os resultados indicaram que, a uma concentração de 50 mM o EDTA foi capaz de inibir a degradação do dsRNA (Figura 52). Dessa forma, foi testado o efeito de degradação de dsRNA com a hemolinfa e o suco gástrico de insetos alimentados e não alimentados. Em todos os ensaios, a hemolinfa degradou completamente o dsRNA, mesmo utilizando a concentração de 50 mM de EDTA (Figura 53). Nos ensaios com o suco gástrico, observou-se que há diferenças de degradação dependendo do estado fisiológico do inseto. Quando o dsRNA foi incubado junto com o homogenato intestinal de larvas que haviam sido alimentadas, houve degradação do dsRNA em todas as concentrações de EDTA testadas. Ao incubar o dsRNA com o homogenato intestinal de larvas que estavam em jejum houve inibição da degradação a partir de 0,5 mM de EDTA (Figura 54).

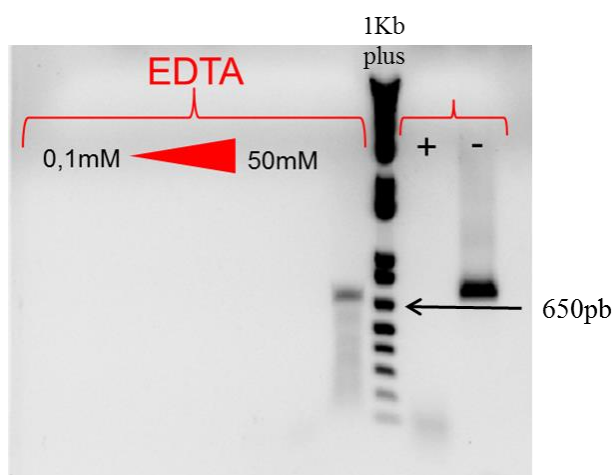


Figura 52. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA por RNAaseA . As concentrações de EDTA utilizadas foram: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 50 mM. Controle positivo sem EDTA (+). Controle negativo sem RNAaseA (-).

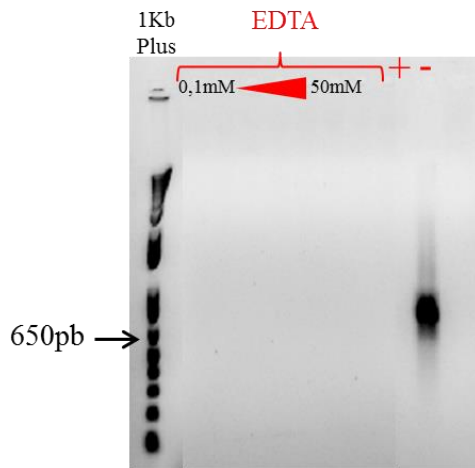


Figura 53. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA pela hemolinfa. As concentrações de EDTA utilizadas foram: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 50 mM. Controle positivo sem EDTA (+). Controle negativo sem hemolinfa (-).

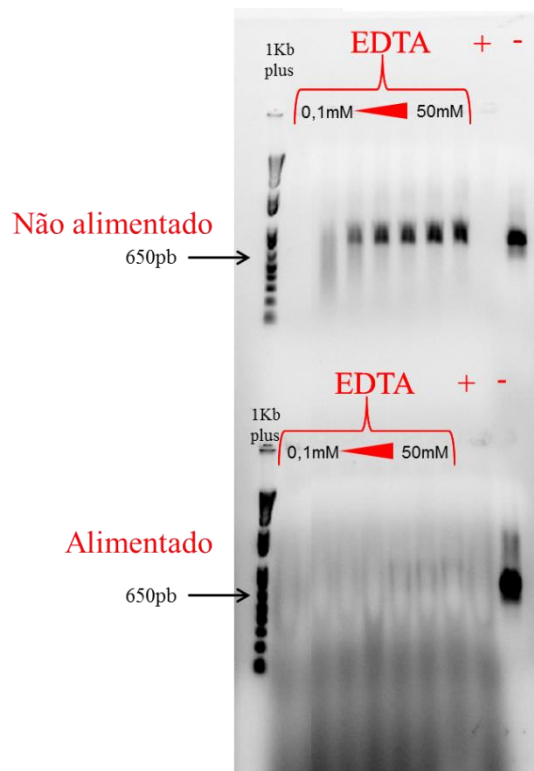


Figura 54. Gel de agarose 1% mostrando o resultado do teste de inibição da degradação de dsRNA pelo homogenato intestinal de larvas alimentadas e não alimentadas. As concentrações de EDTA utilizadas foram: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 50 mM. Controle positivo sem EDTA (+). Controle negativo sem homogenato intestinal (-).

Com esses resultados foi possível observar que a microinjeção do dsRNA na hemolinfa do inseto pode não ser a melhor estratégia, pois há uma taxa muito alta de degradação dos dsRNAs. Os resultados dos testes de inibição da degradação no homogenato intestinal sugerem que o uso de EDTA a uma concentração de 1 mM pode ser suficiente para evitar a ação enzimática das RNases, quando as larvas são deixadas previamente em jejum. Em uma tentativa de inibir a ação de RNases *in vivo* foi preparada uma solução contendo 1.000 ng de dsRNA para CHSB, 1 mM EDTA e 5% de sacarose, a qual foi novamente entregue às larvas por meio de alimentação forçada. Mesmo sob essas condições, o silenciamento não pôde ser observado (Figura 55).

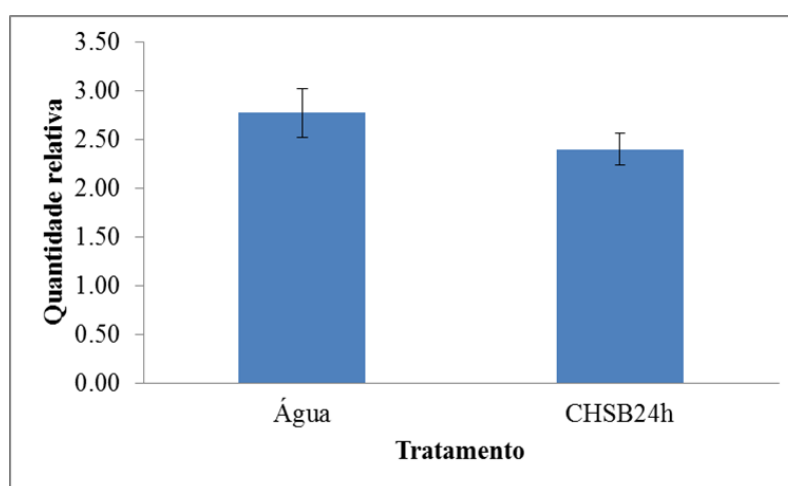


Figura 55. Comparação entre a quantidade relativa de transcritos de quitina sintase II (CHSB) realizada por qRT-PCR, 24 horas após a alimentação forçada de larvas de último ínstar de *T. licus licus* com uma solução contendo 1.000 ng de dsRNA e 1 mM EDTA. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

Com o intuito de testar uma forma alternativa de entrega do dsRNA para larvas de *T. licus licus* foi utilizada a administração de bactérias na dieta do inseto. Após expressão dos dsRNAs em células HT115, uma alíquota foi reservada para extração de RNA total e checagem da expressão da dupla fita (Figura 56). Após uma semana se alimentando da dieta contendo as bactérias que expressaram os dsRNAs, a análise da expressão dos genes por meio de qRT-PCR, não mostrou nenhum efeito de silenciamento para quitina sintase II (Figura 57), nem para V-ATPase A (Figura 58).

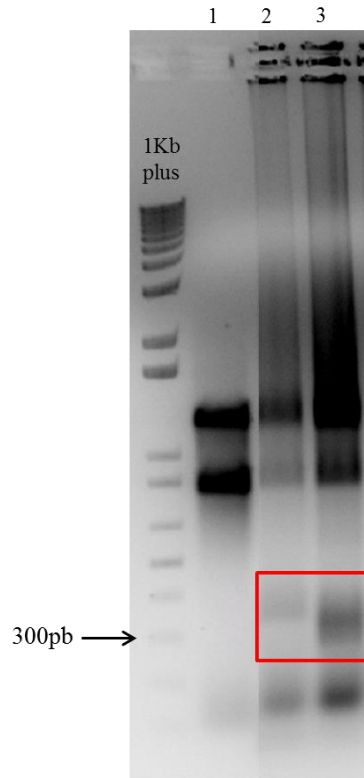


Figura 56. Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras de RNA total extraídas de células bacterianas HT115 após a indução da expressão de dsRNA. (1) RNA total da célula selvagem, (2) RNA total da célula transformada com o plasmídeo contendo o gene de quitina sintase II, (3) RNA total da célula transformada com o plasmídeo contendo o gene de V-ATPase A. Em vermelho está indicada a banda correspondente ao dsRNA.

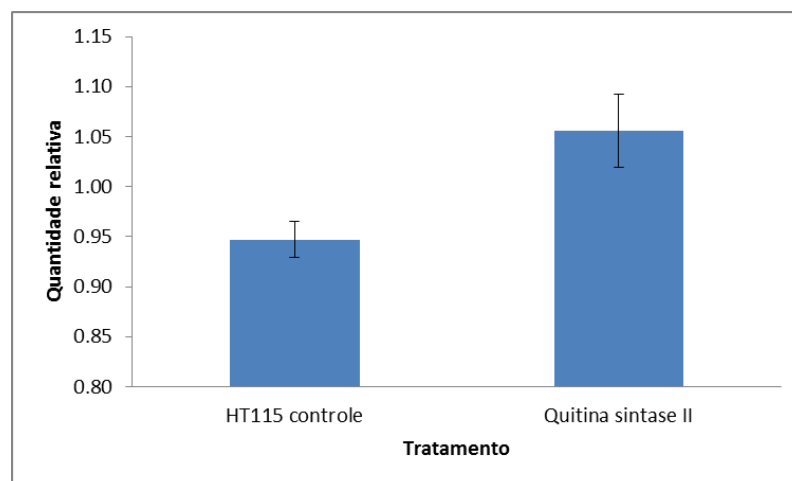


Figura 57. Determinação da quantidade relativa de transcrits de quitina sintase II realizada por qRT-PCR após administração de células HT115 selvagens ou expressando dsRNA para quitina sintase II à dieta de *T. licus licus*. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

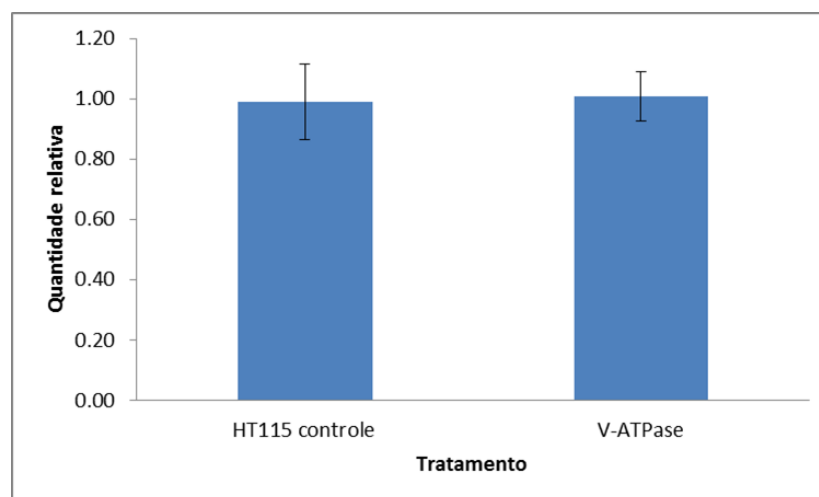


Figura 58. Determinação da quantidade relativa de transcritos de V-ATPase realizada por qRT-PCR após administração de células HT115 selvagens ou expressando dsRNA para V-ATPase A à dieta de *T. licus licus*. O desvio padrão foi calculado entre as triplicatas experimentais para mostrar a variação dos ensaios.

O silenciamento de genes utilizando RNAi vem revolucionando os estudos de genômica funcional em diversos organismos, principalmente em insetos modelo como *Drosophila melanogaster* (Diptera) e *Tribolium castaneum* (Coleoptera). Existem diversos trabalhos de silenciamento de genes em lepidópteros, como *B. mori*, os quais a técnica de RNAi foi realizada com sucesso utilizando diferentes formas de administração dos dsRNAs. As dificuldades encontradas para realizar os experimentos de silenciamento de genes de *T. licus licus* foram de encontro aos resultados obtidos para outros lepidópteros. Como normalmente os grupos de pesquisa não publicam resultados negativos, é difícil determinar se os problemas encontrados nesse trabalho também foram observados para outros insetos da ordem *Lepidoptera*. Ao revisar os trabalhos de silenciamento de genes de lepidópteros, Terenius e colaboradores (2011) discutem sobre os resultados positivos e, principalmente, os resultados negativos de diversos grupos de pesquisa. Neste trabalho os autores relatam que a técnica de RNAi nem sempre gera os resultados esperados. Os motivos pelos quais isso acontece não são exatamente claros, acredita-se que a maquinaria utilizada nesses organismos seja uma causa provável, já que ainda não foram caracterizados nesses organismos homólogos funcionais dos genes de RdRP (RNA polimerase dependente de RNA) e do transportador sid-1, responsáveis pela amplificação do sinal de silenciamento e pela resposta sistêmica do RNAi, respectivamente (TERENIUS *et al.*, 2011). Outra explicação seria a existência de uma

barreira no modo de entrega do dsRNA para as células. O modo como isso acontece ainda é discutido, mas sabe-se que em *Drosophila*, por exemplo, não existe o gene *sid-1* e que há uma relação específica e direta entre a resposta de RNAi e o processo de endocitose. Nesses insetos, o RNAi parou de funcionar quando foi feita a interrupção do processo de endocitose pela ação de agentes químicos (HUVENNE e SMAGGHE, 2010). A ação de nucleases na hemolinfa e no suco gástrico pode ser outro fator que causa a degradação dos dsRNAs no organismo (ARIMATSU *et al.*, 2007).

De acordo com Terenius e colaboradores (2011), vários aspectos devem ser considerados quando há necessidade de realizar experimentos de RNAi, especialmente em lepidópteros: o tecido em que os dsRNAs irão atuar; se os genes alvo fazem parte do processo imunológico; a quantidade de dsRNA a ser utilizada, a forma de entrega e se eles interferem em outras vias, como as vias de miRNAs. Ainda assim, a taxa de silenciamento em lepidópteros permanece muito baixa e somente com o estudo completo das vias de RNAi nesses organismos é que se saberá a real condição da aplicação dessa técnica nesse grupo de insetos.

4. Conclusões

Foram realizados estudos para tentar compreender a fisiologia e a biologia molecular de *T. licus licus*. Para isso foi necessário um trabalho de validação de genes de referência para serem utilizados em análises de expressão por meio de qRT-PCR em diversas fases do ciclo de vida do inseto. O processo de validação dos genes por meio dos programas geNorm, NormFinder e Bestkeeper permitiu identificar quais os genes apresentaram maior estabilidade e que podem ser utilizados como referência em estudos de quantificação relativa. Em cada fase do ciclo de vida de *T. licus licus* foi determinada uma estabilidade diferente entre os genes de referência. Se em algum momento houver a necessidade de analisar a expressão de genes em tecidos específicos, aconselha-se que um novo trabalho de validação de genes de referência seja realizado.

Os ensaios de RNAi não foram totalmente esclarecedores. Foram testadas diversas formas de introdução dos dsRNAs nos insetos, assim como diferentes alvos, diferentes tamanhos e diferentes concentrações de dsRNAs. Os resultados obtidos fazem parte de um extenso debate que existe na comunidade científica sobre o mecanismo de funcionamento de RNAi em lepidópteros, porém ainda não excluem a possibilidade de o silenciamento ocorrer de maneira diferente. Os dados não permitem concluir se os dsRNAs estão conseguindo atingir o alvo desejado ou se são degradados no organismo dos insetos. Outro fator limitante desta técnica diz respeito à constância com que as larvas ingeriram o dsRNA, é possível que seja necessário um tempo maior para que os efeitos do silenciamento apareçam. Além disso, ainda há dúvidas sobre a eficiência da técnica de microinjeção, já que foram utilizadas larvas muito pequenas, o que pode inviabilizar a análise dos dados. Estudos de microinjeção utilizando microscopia podem contribuir para o aperfeiçoamento da técnica.

Outra maneira de estudar o efeito do RNAi a partir de captação constante e por um tempo prolongado é a utilização de plantas transgênicas e esse deverá ser o próximo passo do estudo de RNAi em *T. licus licus*.

Capítulo IV – Transformação genética de cana-de-açúcar

1. Introdução

1.1 Melhoramento genético e Transformação de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta de grande interesse econômico, pois dela podem ser obtidos diversos produtos. Toda a planta pode ser utilizada em processos industriais, pois sua biomassa contém grande quantidade de açúcares, lignina, celulose e hemiceluloses. Hoje a cana-de-açúcar serve para produção de alimento, farmacêuticos e de energia. O setor sucroalcooleiro vem ganhando amplo espaço tanto nacional como internacionalmente, graças à necessidade e à constante busca de novas fontes de energia, principalmente energia renovável. Até o momento, o etanol produzido de cana ainda é obtido através de fermentação do caldo, mas agora as pesquisas estão evoluindo para o desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração a partir da degradação de componentes do bagaço como a celulose (GOEBEL e SALLAM, 2011).

Mesmo apresentando o sistema de produção de açúcar e etanol mais eficiente do mundo, o crescimento da demanda por esses produtos no Brasil exige uma expansão da área cultivável e aumento da produtividade. Com isso crescem as preocupações quanto à demanda de água, a poluição do solo e do ar e também quanto a fatores que afetam a produção, como a imprevisibilidade do clima, fatores abióticos e o ataque de doenças e pragas.

Existem mais de 1500 espécies de insetos que atacam as lavouras de cana-de-açúcar em todo o mundo (BOX, 1953). No Brasil, a broca da cana *D. saccharalis* tem sido a praga mais devastadora durante muitos anos, mas o uso do controle biológico vem sendo realizado com sucesso para manter a população deste inseto em níveis baixos. Entretanto, após relatos da presença da broca-gigante em canaviais do estado de São Paulo surgiu uma grande preocupação, pois este inseto não possui nenhum inimigo natural conhecido e o uso de pesticidas químicos tem sido ineficaz (BOTELHO; GARCIA; MACEDO, 2006). Dessa maneira a identificação de formas alternativas para o seu controle torna-se uma exigência.

Apesar de ser a forma principal de obter novas cultivares, o melhoramento genético convencional por meio de cruzamentos é um processo laborioso, que consome tempo e que depende de fatores como época de florescimento, viabilidade do pólen da variedade doadora, incompatibilidade genética ou citoplasmática, entre outros (CESNIK e MIOCQUE, 2004). No caso da cana-de-açúcar essa inviabilidade torna-se ainda mais evidente devido à falta de germoplasmas que possam ser utilizados para a introgressão de resistência ao ataque de insetos (WENG *et al.*, 2011).

O uso de transgenia em cana-de-açúcar tem sido uma estratégia amplamente estudada e utilizada para a introdução de características de interesse. Atualmente existem plantas transgênicas de cana-de-açúcar com diversas características de interesse comercial, como plantas contendo o gene *nptII* (ARENCEBIA *et al.*, 1998; BOWER *et al.*, 1996; ELLIOTT *et al.*, 1998; GAMBLEY; FORD; SMITH, 1993), resistentes a herbicidas (CHOWDHURY e VASIL, 1993; GALLO-MEAGHER e IRVINE, 1996; MANICKAVASAGAM *et al.*, 2004), ao vírus do mosaico (BUTTERFIELD *et al.*, 2002; INGELBRECHT; IRVINE; MIRKOV, 1999), ao vírus Fiji (MCQUALTER *et al.*, 2004), à bactéria causadora da escaldadura das folhas (ZHANG; XU; BIRCH, 1999), ao estresse hídrico (MOLINARI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006) e com alterações metabólicas (ENRÍQUEZ *et al.*, 2000; MCQUALTER *et al.*, 2005; SANTOSA *et al.*, 2004; VICKERS *et al.*, 2005).

Foram obtidas também, plantas transgênicas resistentes a insetos expressando uma toxina Cry1Ab (BRAGA *et al.*, 2003), uma toxina Cry1Ab truncada (ARENCEBIA *et al.*, 1999; ARENCIBIA *et al.*, 1997), uma toxina Cry1Ac (WENG *et al.*, 2011), expressando inibidores de proteases (CHRISTY *et al.*, 2009; FALCO e SILVA-FILHO, 2003) e expressando lectinas (SETAMOU *et al.*, 2002). Esses dados são animadores e indicam que a identificação e expressão de moléculas tóxicas contra a broca-gigante em plantas transgênicas de cana-de-açúcar podem levar à diminuição dos ataques do inseto nas lavouras.

Para a transformação de plantas de cana-de-açúcar, os métodos mais utilizados são o uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e da biobalística. A transformação mediada por agrobactéria produz linhagens transgênicas com baixo número de cópias do DNA transferido (T-DNA), permite transferir longas cadeias de DNA com risco pequeno de quebra durante a inserção e permite maior estabilidade de integração do DNA no genoma ao longo das gerações. Porém no caso da cana-de-açúcar e de monocotiledôneas em geral, o uso desta ferramenta é restringido a algumas poucas variedades e com baixa eficiência (JACKSON; ANDERSON; BIRCH, 2013).

Atualmente, o método de biobalística tem sido o mais utilizado para o desenvolvimento de eventos de cana-de-açúcar transgênica. O uso desta ferramenta para a introdução do DNA no genoma da planta não depende do genótipo a ser utilizado, mas necessita, principalmente, do desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos e de regeneração de plantas, as quais já vêm sendo aperfeiçoadas em trabalhos recentes (BASNAYAKE; MOYLE; BIRCH, 2011; IJAZ *et al.*, 2012). Contudo, uma limitação inerente a essa ferramenta deve-se à chance maior de inserções múltiplas do transgene,

resultando em silenciamento ou instabilidade da integração no genoma das plantas (LESSARD *et al.*, 2002), além de apresentar um risco de inserção de partes do *backbone* do vetor de transformação. Ao transformar calos embriogênicos de cana por meio de agrobactéria e biobalística, Jackson e colaboradores (2013) avaliaram a eficiência, a estabilidade da inserção e o número de cópias do gene repórter da enzima luciferase. Ao transformar células da variedade Q117 utilizando diferentes concentrações do vetor inteiro e também diferentes concentrações apenas do cassete de expressão, os autores observaram que o uso de baixas concentrações (cerca de 6 ng) do cassete de expressão pode melhorar a qualidade dos eventos obtidos.

Assim, com o desenvolvimento ou atualização de ferramentas para a transformação de plantas, associados à identificação de variedades mais responsivas à cultura de tecidos e à regeneração, espera-se que o tempo de obtenção de novas cultivares seja reduzido bem como abrirá a possibilidade de introdução de características que não são encontradas naturalmente nos germoplasmas de cana (JAIN *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho é o de transformar calos embriogênicos de cana-de-açúcar, visando a obtenção de plantas resistentes ao ataque de *T. licus licus*, contendo construções gênicas que permitam a expressão de toxinas Cry, estudadas no capítulo II deste estudo e de dsRNAs, estudados no capítulo III, visando uma estratégia alternativa de administração ds dupla fita de RNA para larvas neonatas da broca-gigante.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Plantas de cana-de-açúcar, variedade RB855156, com 6 a 9 meses de cultivo foram utilizadas para os estudos. Esta variedade foi escolhida por apresentar as características como precocidade, alta produtividade, riqueza e por ser uma das variedades mais cultivadas no país. Além disso, estudos anteriores mostraram que essa variedade apresentou grande capacidade para produção de calos embriogênicos *in vitro* assim como boa resposta de regeneração de plantas em cultura de tecidos.

2.2 Fonte de explantes e cultura de tecidos

O ponteiro da cana, que consiste na porção apical da planta e que contém a região meristemática foi cortado de plantas cultivadas no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após a retirada das folhas mais externas, os ponteiros foram cortados em cilindros de aproximadamente 2 x 10 cm. Em seguida o material foi desinfestado durante 1 minuto em etanol 70% (v/v), lavado em água corrente com esponja e detergente, e novamente desinfestado por 1 minuto em etanol 70% (v/v). Os ponteiros foram então submetidos a tratamento com hipoclorito de sódio 2 – 2,5% (v/v) por 20 minutos com agitação e enxaguados cinco vezes em água destilada autoclavada. Foi realizada a remoção de duas a três folhas externas em fluxo laminar para a exposição do palmito, segmento de folhas imaturas que envolvem o meristema apical. Segmentos transversais de 2-3 mm foram cortados e em seguida inoculados em frascos de vidro contendo meio MS₃C, que consiste no meio MS basal (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 2,4D 3 mg/L, ácido cítrico 50 mg/L e água de coco 50 ml/L. As culturas foram mantidas no escuro a 25±2 °C por 4 – 6 semanas. Os calos embriogênicos que surgiram nos explantes foram individualizados e transferidos para meio MS₃C. Foram realizados 3 a 5 subcultivos em intervalos de 15 dias para promover o rápido crescimento dos calos embriogênicos e também facilitar a eliminação dos calos não embriogênicos.

2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar

Para a transformação, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS₃C fresco dois dias antes dos experimentos. Isso permitiu renovar os nutrientes e fortalecer as células para garantir uma melhor recuperação do material após a transformação.

Previamente aos disparos das micropartículas, os calos foram incubados em meio osmótico (Anexo XIII) por quatro horas, de acordo com VAIN e colaboradores (1993).

A suspensão de micropartículas foi preparada de acordo com SANFORD; SMITH; RUSSELL (1993), utilizando 83 µL de suspensão de partículas (60 mg/mL); 8,3 µL do vetor (1 µg/µL); 83 µL CaCl₂ (2,5 M) e 33 µL de espermidina (0,1 M). Após a precipitação das partículas contendo o DNA, as mesmas foram lavadas uma vez em etanol 70%, uma vez em etanol absoluto e eluídas em 58 µL de etanol absoluto. Cinco microlitros da suspensão de micropartículas foram distribuídos em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel. Partículas de tungstênio M-10 foram utilizadas para os experimentos. O acelerador de micropartículas (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) foi utilizado com pressão de vácuo de 27 polegadas de Hg. A pressão de ruptura de disco usada e distância da prateleira (distância percorrida pela micropartícula até atingir os calos) foram de 1.200 psi e 90 mm, respectivamente. Imediatamente após os disparos, os calos foram mantidos em meio osmótico por quatro horas, em seguida foram transferidos para meio MS₃C e incubados no escuro a 25±2 °C por dois dias.

Após a recuperação dos calos, os mesmos foram transferidos para meio MRP contendo 1,5 M de glufosinato de amônio, BAP e ANA para estimular a regeneração das plantas (Anexo XIV). O material foi mantido a 25±2 °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹. Plantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas para copos de 200 mL contendo 2 partes de terra e 1 parte de substrato comercial (PlantmaxTM) e cobertas com uma película plástica por 1 semana para estimular e acelerar o processo de aclimatação. Em seguida as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

2.4 Vetores para transformação

Para a transformação de plantas de cana-de-açúcar foram escolhidas regiões de 150 pb do gene da quitina sintase II e V-ATPase A da broca-gigante visando desenvolver uma forma alternativa de entrega de dsRNAs para as lagartas. Além disso, também foi escolhido o gene que codifica a toxina Cry2Aa. Apesar de ter apresentado menor atividade, se comparada às toxinas da família Cry1A (Cap. II, seção 3.2), essa toxina ainda apresentou uma alta taxa de mortalidade de larvas neonatas de *T. licus licus*. Desta forma, como ainda não existem relatos de cana-de-açúcar transformada com toxinas da classe Cry2 o referido gene foi selecionado para caracterização de sua atividade *in vivo* contra o inseto.

A sequência dos genes, incluindo sítios de enzimas de restrição (*Sfi*I, *Kpn*I, *Nco*I, *Eco*RV, *Pst*I e *Xho*I) para facilitar subclonagens, promotor de actina de arroz (*OsAct-1*),

terminador T35S e íntron (RGA2 – para a formação do grampo dos dsRNAs) foram sintetizadas pela empresa Epoch Biolabs, INC (Missouri city – TX) tendo como base o cassete de expressão dos vetores pIPKb003 e pIPKb008 (HIMMELBACH *et al.*, 2007). Foram sintetizadas quatro construções, uma contendo a sequência de 150 pb do gene da quitina sintase II, outra contendo a sequência de 150 pb do gene da V-ATPase A, uma construção contendo as duas sequências de 150 pb para ambos os genes e uma construção contendo o gene da toxina Cry2Aa (Figura 59). As sequências para expressão de dsRNAs foram obtidas a partir de *contigs* obtidos do transcrito da broca-gigante, enquanto o gene *cry2Aa*, correspondente à região da toxina ativa, foi obtido do *GenBank* (Número de acesso: AF273218) (Anexo XV). O material sintetizado foi clonado no sítio de *Sfi*I do vetor de transformação de plantas p7iU (DNA Cloning Service – <http://www.dna-cloning.com/>) (Figura 60), que contém o gene de seleção (*pat/bar*) de resistência ao herbicida glufosinato de amônio, sob a regulação do promotor de ubiquitina de milho (Ubi-1) (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996).

Para confirmação da clonagem dos genes foi realizada PCR utilizando os iniciadores da tabela 13. As condições da reação foram: 20 ng de cada plasmídeo, tampão de PCR [1X], dNTP mix [0,4 mM], MgCl₂ [3 mM], iniciadores [0,48 µM], *Taq* DNA polimerase Ludwig Biotec [2,5 U] em um volume final de 20 µL. Foram utilizados os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Tabela 13. Iniciadores utilizados para a confirmação da presença dos genes nos cassetes de expressão.

Iniciador	Sequência (nt)
cry2AaSacfw1	5' CCTGTTCCCTTATCAATAAC 3'
cry2AaSacrv1	5' AGGGAAGGTAATAGAAAGCC 3'
OsAct1fw1	5' CCTCAGCATTGTTTCATCGGT 3'
RGA2rv1	5' CAGTATGAAGATACTATCC 3'

Detalhes: Iniciadores cry2AaSacfw1 e rv1 foram utilizados para amplificação do gene *cry2Aa*. Os iniciadores OsAct1fw e RGA2rv1 foram utilizados para amplificação da região entre o promotor e o íntron dos cassetes de expressão contendo as sequências para síntese de dsRNAs.

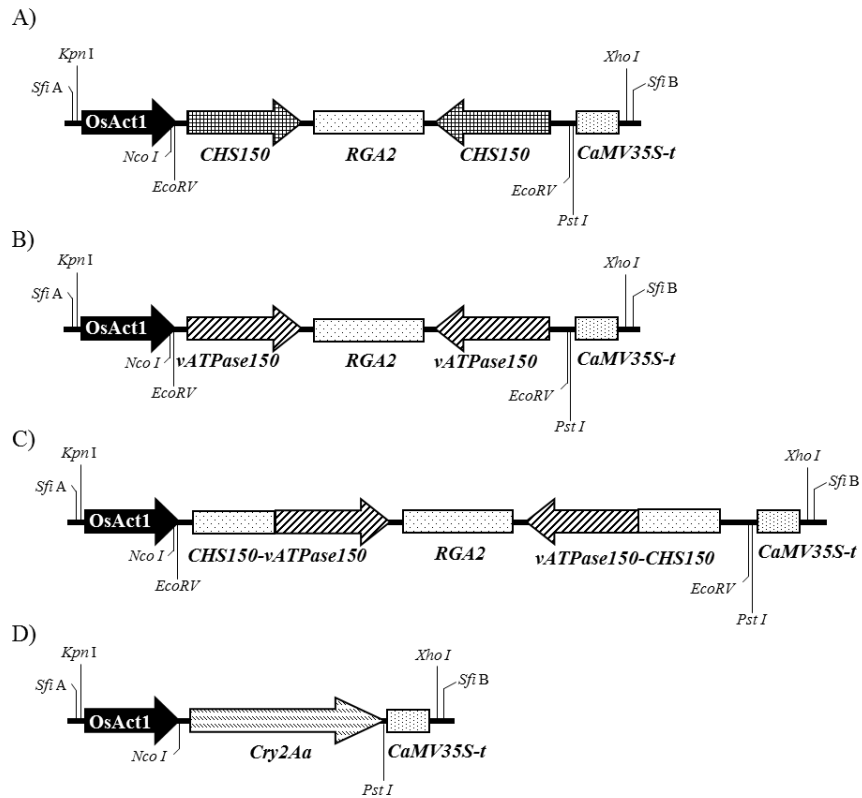


Figura 59. Cassetes de expressão para transformação de cana-de-açúcar. A) Construção contendo a sequência do gene da quitina sintase II para expressão de dsRNA. B) Sequência do gene da VATPase A para expressão de dsRNA. C) Sequência contendo os genes da quitina sintase II e VATPase A para expressão de dsRNA. D) Construção contendo o gene da toxina Cry2Aa.

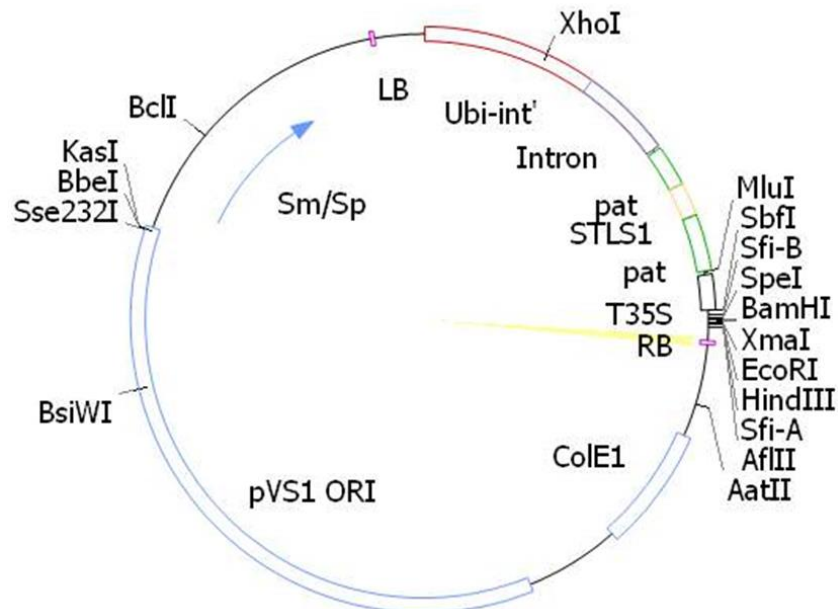


Figura 60. Mapa do vetor p7iU utilizado para transformação de cana-de-açúcar. O cassete de seleção ao herbicida glufosinato de amônio consiste do promotor de ubiquitina de milho (Ubi-int), gene que codifica a enzima fosfotricina acetiltransferase (*pat*) e terminador (T35S).

2.5 Ensaio histoquímico

Foram realizados ensaios histoquímicos de GUS para avaliar a eficiência dos protocolos de precipitação e disparo de micropartículas. O vetor pAHC25 (CHRISTENSEN e QUAIL, 1996) foi utilizado para transformar folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), cotilédones e embriões de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e calos embriogênicos de cana variedade RB855156. Quatro horas após os disparos, o material foi incubado em solução de X-GLUC por 24 horas a 37 °C, de acordo com BRASILEIRO; CARNEIRO (1998) a fim de identificar os pontos indicativos da atividade da enzima β -glucuronidase.

2.6 Teste de resistência das plantas ao herbicida Finale®

O material vegetal acondicionado em casa de vegetação foi mantido a uma temperatura constante de 25 °C. Após duas semanas, foi realizada a pulverização das plantas com o herbicida Finale® diluído a 1% do agente ativo glufosinato de amônio. Após o tratamento as plantas escape que apresentaram sinais claros dos efeitos do herbicida foram descartadas. Aquelas que sobreviveram foram selecionadas para confirmação da transformação por meio de PCR e Southern blot.

2.7 Análise da presença do transgene no genoma da planta

O DNA genômico foi extraído de 50 mg de folhas das plantas transformadas e não transformadas (variedade RB855156) utilizando-se o *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da presença do transgene no genoma das plantas foi realizada inicialmente por meio de PCR onde, 100 ng de DNA genômico foram adicionados à reação contendo: tampão de PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTP 0,2 mM, iniciador senso (5' – CCTGTTTCCTTTATCAATAAC – 3', para a construção contendo o gene *cry2Aa*) ou (5' – CCTCAGCATTGTTCATCGGT -3', para as construções contendo o fragmento gênico da quitina sintase II e da V-ATPase A) 0,2 μ M, iniciador antisense (5' – AGGGAAGGTAATAGAAAGCC – 3', para construções contendo o gene *cry2Aa*) ou (5' – CAGTATGAAGATACACTATCC - 3'), para a construção contendo o fragmento gênico da quitina sintase II e da V-ATPase) 0,2 μ M; 0,1 U *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e água bidestilada para um volume final de 10 μ L. As condições da reação foram: 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Obtenção dos calos embriogênicos

Calos de cana da variedade RB855156 foram obtidos de segmentos transversais de folhas imaturas inoculados em meio MS₃C (HEINZ e MEE, 1969). Após um período de 4 - 6 semanas foi realizada inspeção visual com auxílio de um microscópio estereoscópico (Stemi SV6 Carl Zeiss) para a identificação e seleção de calos embriogênicos com características morfológicas específicas tais como, calo nodular, não mucilaginoso, friável, compacto e branco-amarelado. Os calos embriogênicos foram subcultivados por mais 45 - 75 dias e então utilizados para transformação *via* biobalística (Figura 61).

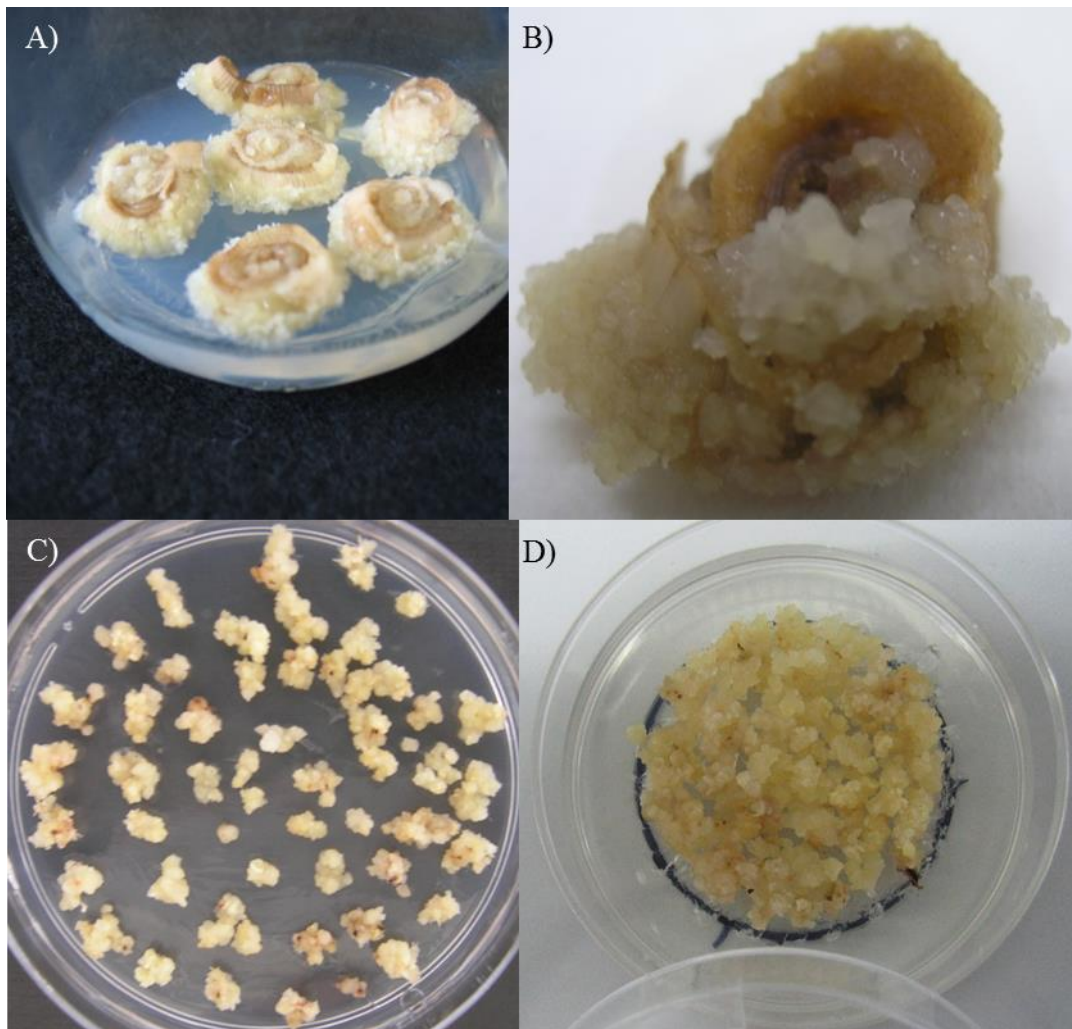


Figura 61. Cultura de tecidos de cana-de-açúcar. A) Discos foliares desenvolvendo calos após incubação por 4 - 6 semanas em meio MS₃C. B) Observação de características morfológicas como cor, forma e consistência. C) Seleção e subcultivo de calos embriogênicos. D) Calos embriogênicos inoculados em meio osmótico previamente aos disparos das micropartículas.

3.2 Teste do protocolo de precipitação e de transformação

Os ensaios histoquímicos de GUS permitiram observar que todos os tecidos apresentaram expressão da enzima β -glucuronidase 24 horas após os tiros, mesmo utilizando um vetor construído com o gene repórter sob o controle do promotor de ubiquitina de milho, que possui atividade mais acentuada em monocotiledôneas (Figura 62). Esses dados mostraram que os protocolos de precipitação e de disparo de micropartículas eram adequados para a transformação de calos de cana da variedade RB855156.

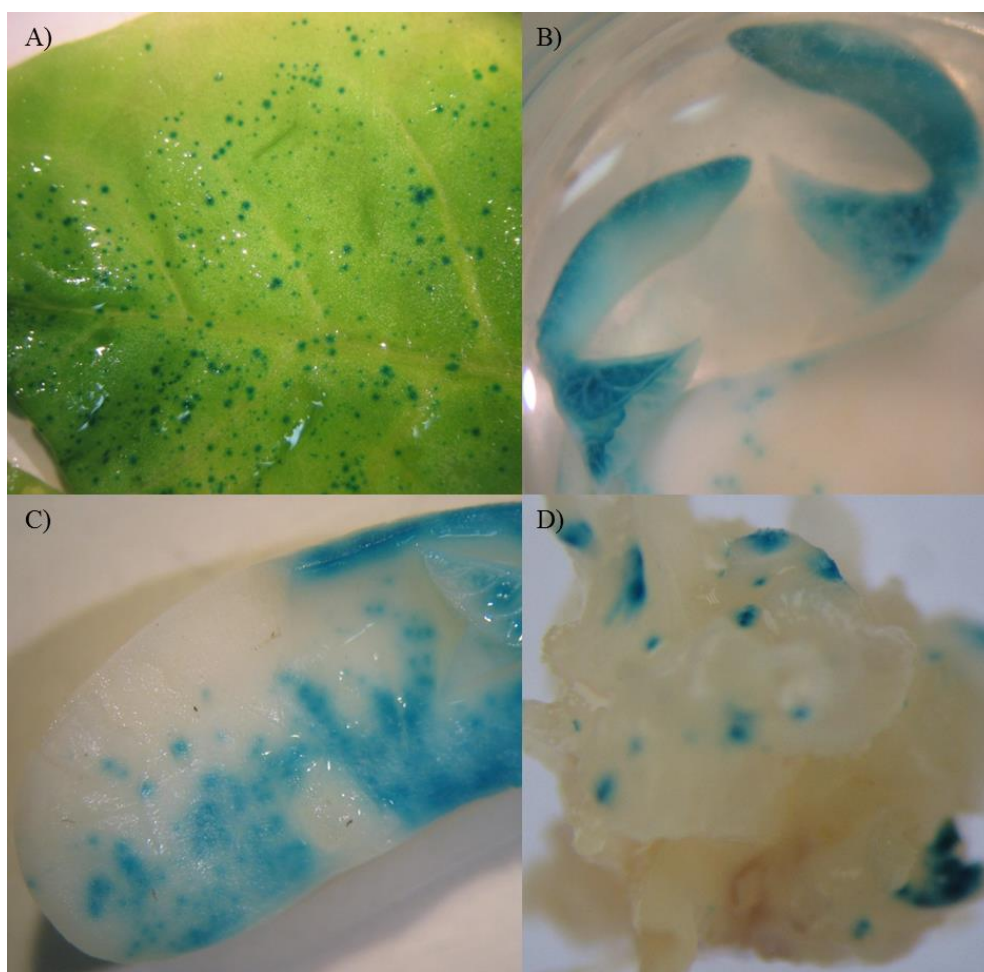


Figura 62. Ensaio histoquímico da atividade da enzima β -glucuronidase em: A) Folhas de tabaco. B) Embriões de feijão. C) Cotilédones de feijão e D) Calos embriogênicos de cana.

3.3 Construção dos vetores

Após a síntese dos cassetes de expressão e da subclonagem no vetor p7iU foi realizada uma PCR utilizando os primers da tabela 13 para confirmação da presença dos genes. Além disso, foi realizada a digestão dos vetores com a enzima *Sfi*I para a liberação e

confirmação do tamanho dos cassetes de expressão. De acordo com os resultados da PCR, todos os fragmentos apresentaram o tamanho esperado, de 272 pb para P7iU-CHSB e P7iU-VATPase, de 422 pb para P7iU-CHSB-VATPase e de 543 pb para p7iU-Cry2Aa (Figura 63). De acordo com os resultados da digestão com *Sfi*I, os cassetes de expressão também apresentaram os tamanhos esperados, que eram de 2243 pb para P7iU-CHSB e P7iU-VATPase, de 2543 pb para P7iU-CHSB-VATPase e de 3353 pb para P7iU-Cry2Aa (Figura 64).

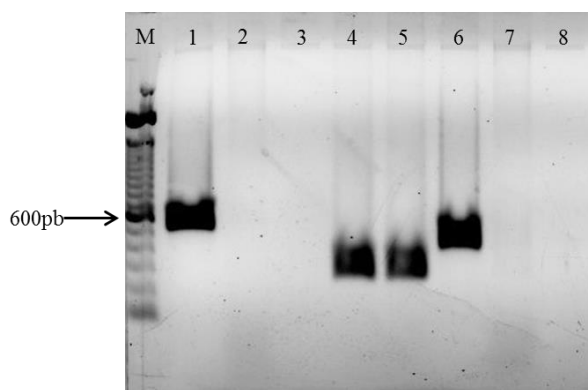


Figura 63. Alíquota de PCR submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da presença dos genes nos vetores de transformação de cana. (M) 100 pb DNA ladder. 1) P7iU-Cry2Aa. 2) DNA genômico de cana variedade RB855156 não transformada. 3) Controle negativo H₂O. 4) P7iU-CHSB. 5) P7iU-VATPase. 6) P7iU-CHSB-VATPase. 7) DNA genômico de cana variedade RB855156 não transformada. 8) Controle negativo H₂O. Reações 1-3 (iniciadores 29 - 30). Reações 4 - 8 (iniciadores 39 - 40).

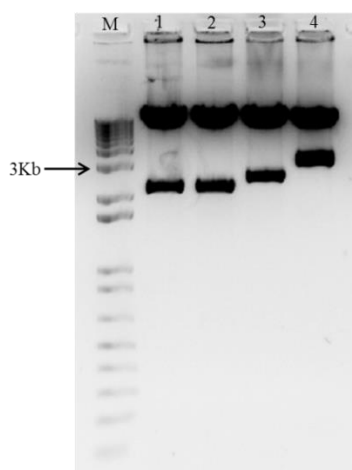


Figura 64. Alíquota da digestão dos vetores com *Sfi*I submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação dos tamanhos dos cassetes de expressão. (M) 1 Kb Plus DNA ladder. 1) P7iU-CHSB. 2) P7iU-VATPase. 3) P7iU-CHSB-VATPase. 4) P7iU-Cry2Aa.

3.4 Transformação de calos e regeneração de plantas

Foram realizados 10 disparos de micropartículas para cada construção contra calos embriogênicos de cana variedade RB855156, totalizando 40 tiros. Cada placa continha cerca de 60 calos embriogênicos. As células foram inoculadas em meio MRP para permitir a seleção e regeneração das plantas resistentes ao herbicida. O esquema de obtenção das plantas transformadas após os disparos pode ser observado na figura 65.

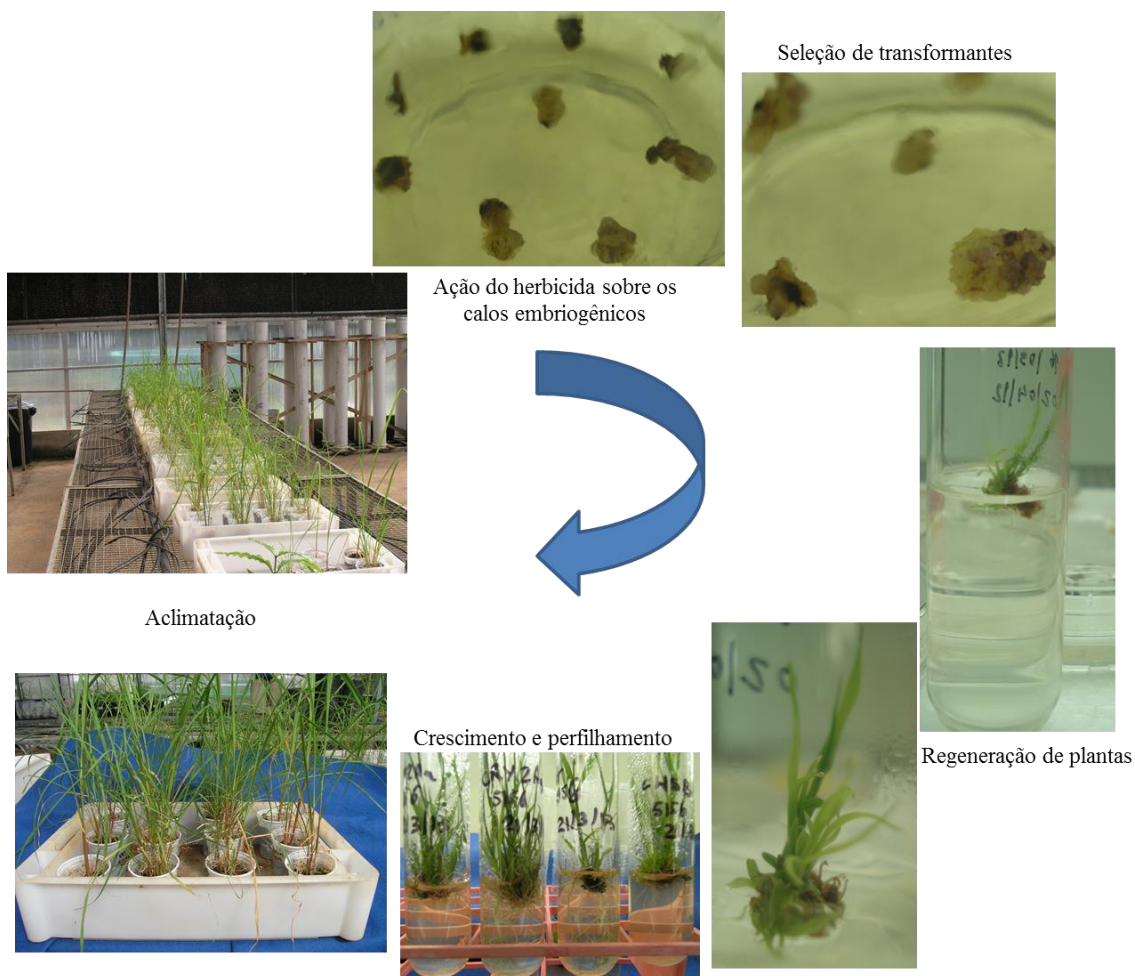


Figura 65. Esquema da seleção dos calos resistentes ao herbicida glufosinato de amônio e regeneração das plantas.

3.5 Teste de resistência à aplicação de herbicida

As plantas mantidas em casa de vegetação foram pulverizadas com uma diluição do herbicida Finale®. Após uma semana, foi possível observar os efeitos sobre as plantas que não haviam sido transformadas. As folhas começaram a apresentar manchas arroxeadas e, em seguida, começaram a secar levando o material susceptível à morte (Figura 66). As plantas que aparentemente não sofreram os efeitos do herbicida foram selecionadas para a confirmação da transformação. De cerca de 130 plantas pulverizadas 14 sobreviveram, sendo quatro contendo a construção P7iU-CHSB, duas contendo a construção P7iU-VATPase e oito contendo a construção P7iU-Cry2Aa.

3.6 Análise dos transformantes por PCR

O material genético das plantas que sobreviveram à aplicação do herbicida foi extraído e utilizado em PCR para determinação da presença do transgene no genoma. Resultados preliminares mostraram que a transformação de calos embriogênicos de cana-de-açúcar por biobalística foi realizada com sucesso (Figura 67). No momento ainda estão sendo realizados os experimentos de extração de DNA genômico do restante das plantas que, ainda encontram-se muito pequenas. Logo que todo o material seja obtido em quantidades suficientes serão realizados os experimentos de PCR e *Southern blot* para determinar a presença do transgene e o número de cópias dos mesmos.

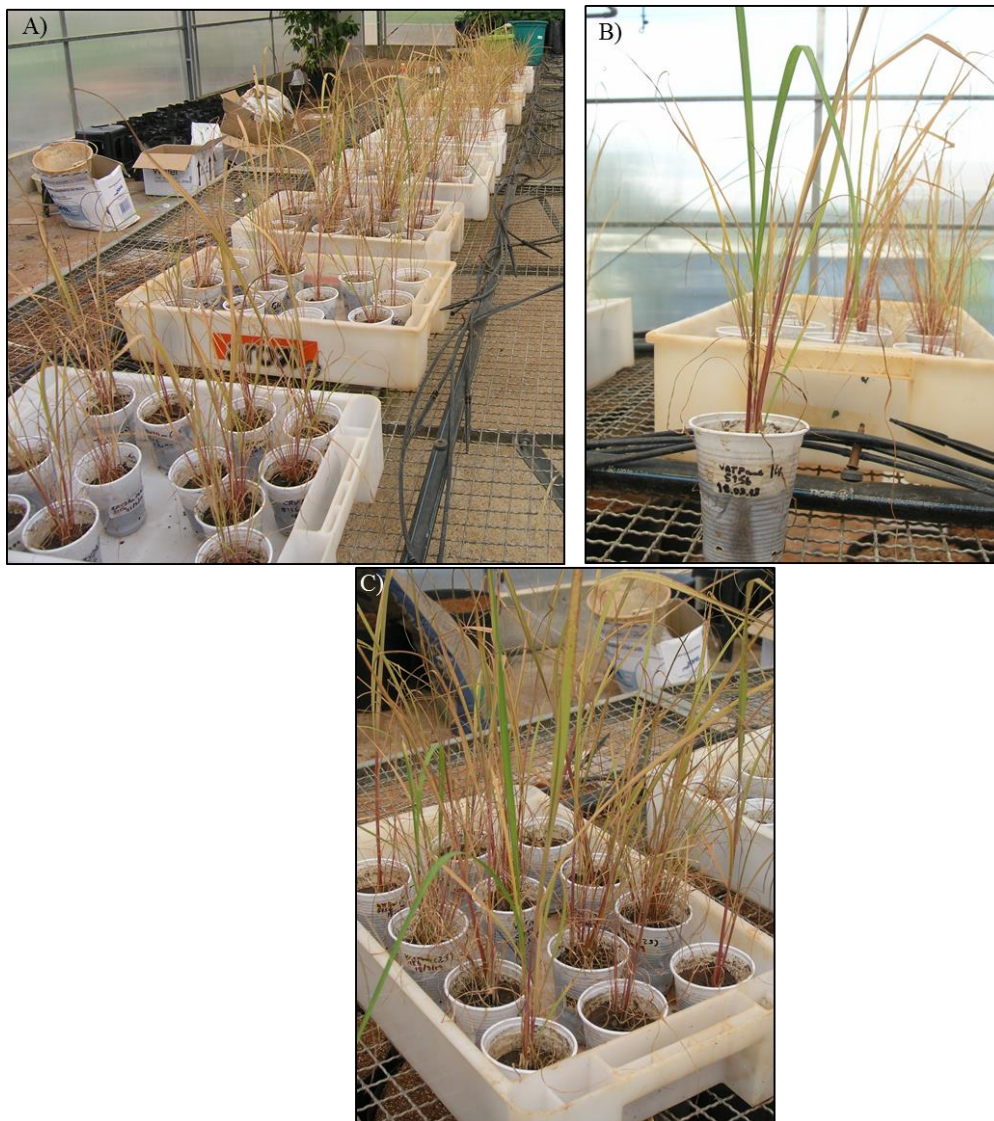


Figura 66. Efeito da pulverização do herbicida sobre plantas transformadas. A) Cento e trinta e duas plantas foram tratadas com o herbicida Finale®. B) Detalhe de uma planta pulverizada que não sofreu os efeitos do herbicida. C) Foram obtidas 14 plantas que sobreviveram ao tratamento.

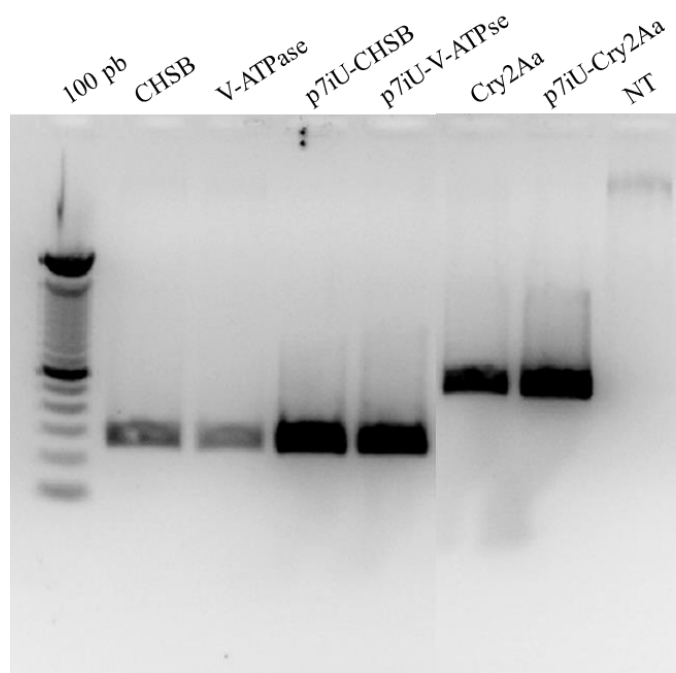


Figura 67. Gel de agarose 1% contendo uma alíquota do produto de PCR submetido à eletroforese para análise da presença do transgene no genoma das plantas de cana-de-açúcar transformadas por biobalística. Quitina sintase II (CHSB), V-ATPase A e Cry2Aa. p7iU-CHSB, p7iU-V-ATPase e p7iU-Cry2Aa correspondem aos plasmídeos utilizados para transformação das plantas e que foram utilizados na PCR como controle positivo. Planta não transformada (NT). Marcador de peso molecular (100 pb).

4. Conclusões

Visando desenvolver uma forma alternativa de oferecer moléculas potencialmente tóxicas às larvas da broca-gigante foram realizados experimentos de transformação genética de plantas de cana-de-açúcar para a expressão de dsRNA e da toxina Cry2Aa. A construção para expressão de dsRNA *in planta* difere da utilizada no capítulo III do presente estudo por permitir a síntese de uma dupla fita de RNA contendo um grampo (*hairpin*). Esse grampo pode auxiliar na proteção do dsRNA contra a ação das RNases presentes no homogenato intestinal da broca-gigante. O material transformado encontra-se em processo de análise quanto à presença do transgene do genoma das plantas. As plantas que apresentaram folhas grandes o suficiente foram utilizadas para extração de DNA genômico e análise da presença do transgene por PCR. Até o momento foram obtidas três plantas transgênicas, uma para cada construção (p7iU-CHSB, p7iU-V-ATPase e p7iU-Cry2Aa). Tão logo seja confirmada a presença dos transgenes nas plantas restantes será realizado estudo para determinar o número de cópias do transgene no genoma das plantas por Southern blot. As plantas transgênicas serão utilizadas em bioensaios com larvas neonatas de *T. licus licus* para avaliação dos efeitos das moléculas sobre o desenvolvimento do inseto.

Conclusões gerais

- Um novo banco de dados de sequências de cDNA de *T. licus licus* de alta qualidade e representatividade foi gerado. Cerca de 24.000 *contigs* enriquecerão o banco de dados que contém apenas 109 sequências de DNA mitocondrial;
- Foram identificadas três sequências de aminopeptidases N que podem participar do mecanismo de ação de toxinas Cry em lepidópteros;
- Foi desenvolvida uma nova metodologia de criação de larvas em laboratório. Este trabalho encontra-se em processo de patente;
- A atividade de quatro toxinas Cry foi determinada em bioensaios com larvas neonatas de *T. licus licus* e sua LC₅₀ determinada;
- Estudos de dinâmica molecular e *docking* molecular mostraram que a APN4T1 apresentou potencial para atuar como receptor de toxinas Cry;
- Foram realizados estudos de validação de genes de referência para ensaios de análise de expressão de genes por qRT-PCR;
- O silenciamento de genes por meio de RNAi é uma técnica que ainda deverá ser aperfeiçoada para estudos de expressão de genes em *T. licus licus*;
- Foram iniciados experimentos de transformação de plantas de cana-de-açúcar, visando desenvolver uma forma alternativa de controle do inseto.

Referências bibliográficas

ABBOTT, W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of economic entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F.; GEORGE, R. A.; LEWIS, S. E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S. N.; SUTTON, G. G.; WORTMAN, J. R.; YANDELL, M. D.; ZHANG, Q.; CHEN, L. X.; BRANDON, R. C.; ROGERS, Y. H.; BLAZEJ, R. G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B. D.; WAN, K. H.; DOYLE, C.; BAXTER, E. G.; HELT, G.; NELSON, C. R.; GABOR, G. L.; ABRIL, J. F.; AGBAYANI, A.; AN, H. J.; ANDREWS-PFANNKOCHE, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R. M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E. M.; BEESON, K. Y.; BENOS, P. V.; BERMAN, B. P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M. R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K. C.; BUSAM, D. A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J. M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L. B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A. D.; DEW, I.; DIETZ, S. M.; DODSON, K.; DOUP, L. E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B. C.; DUNN, P.; DURBIN, K. J.; EVANGELISTA, C. C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A. E.; GARG, N. S.; GELBART, W. M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J. H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T. J.; HERNANDEZ, J. R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K. A.; HOWLAND, T. J.; WEI, M. H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G. H.; KE, Z.; KENNISON, J. A.; KETCHUM, K. A.; KIMMEL, B. E.; KODIRA, C. D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A. A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T. C.; MCLEOD, M. P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N. V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S. M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D. M.; NELSON, D. L.; NELSON, D. R.; NELSON, K. A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D. R.; PACLEB, J. M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G. S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M. G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R. D.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE, B. C.; SIDENKIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M. P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A. C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A. H.; WANG, X.; WANG, Z. Y.; WASSARMAN, D. A.; WEINSTOCK, G. M.; WEISSENBACH, J.; WILLIAMS, S. M.; WOODAGET; WORLEY, K. C.; WU, D.; YANG, S.; YAO, Q. A.; YE, J.; YEH, R. F.; ZAVERI, J. S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X. H.; ZHONG, F. N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H. O.; GIBBS, R. A.; MYERS, E. W.; RUBIN, G. M.; VENTER, J. C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.

AGRAWAL, N.; DASARADHI, P. V.; MOHMMED, A.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K.; MUKHERJEE, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, n. 4, p. 657-85, 2003.

AHN, S. C.; BAEK, B. S.; OH, T.; SONG, C. S.; CHATTERJEE, B. Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. **BioTechniques**, v. 29, n. 3, p. 466-468, 2000.

AHN, S. M.; KIM, T. H.; LEE, S.; KIM, D.; GHANG, H.; KIM, D. S.; KIM, B. C.; KIM, S. Y.; KIM, W. Y.; KIM, C.; PARK, D.; LEE, Y. S.; KIM, S.; REJA, R.; JHO, S.; KIM, C. G.; CHA, J. Y.; KIM, K. H.; LEE, B.; BHAK, J.; KIM, S. J. The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1622-1629, 2009.

ALMIRA, E. C.; PANAYOTOVA, N.; FARMERIE, W. G. Capillary DNA sequencing: maximizing the sequence output. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 14, n. 4, p. 270-277, 2003.

ALVES, A. P.; LORENZEN, M. D.; BEEMAN, R. W.; FOSTER, J. E.; SIEGFRIED, B. D. RNA interference as a method for target-site screening in the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-16, 2010.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

ARAKANE, Y.; HOGENKAMP, D. G.; ZHU, Y. C.; KRAMER, K. J.; SPECHT, C. A.; BEEMAN, R. W.; KANOST, M. R.; MUTHUKRISHNAN, S. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 291-304, 2004.

ARAKANE, Y.; SPECHT, C. A.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R. W. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 10, p. 959-62, 2008.

ARANTES, O.; LERECLUS, D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, v. 108, n. 1, p. 115-119, 1991.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GOMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12497-12503, 2010.

ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; CORNIDE, M.; CASTIGLIONE, S.; O'RELLY, J.; CHINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, v. 8, n. 5, p. 349-360, 1999.

ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; TELLEZ, P.; CHAN, M.-T.; YU, S.-M.; TRUJILLO, L.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1998.

ARENCIBIA, A.; VÁZQUEZ, R.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E.; COEGO, A.; HERNÁNDEZ, L.; DE LA RIVA, G.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 4, p. 247-255, 1997.

ARENSBURGER, P.; MEGY, K.; WATERHOUSE, R. M.; ABRUDAN, J.; AMEDEO, P.; ANTELO, B.; BARTHOLOMAY, L.; BIDWELL, S.; CALER, E.; CAMARA, F.; CAMPBELL, C. L.; CAMPBELL, K. S.; CASOLA, C.; CASTRO, M. T.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHAPMAN, S. B.; CHRISTLEY, S.; COSTAS, J.; EISENSTADT, E.; FESCHOTTE, C.; FRASER-LIGGETT, C.; GUIGO, R.; HAAS, B.; HAMMOND, M.; HANSSON, B. S.; HEMINGWAY, J.; HILL, S. R.; HOWARTH, C.; IGNELL, R.; KENNEDY, R. C.; KODIRA, C. D.; LOBO, N. F.; MAO, C.; MAYHEW, G.; MICHEL, K.; MORI, A.; LIU, N.; NAVEIRA, H.; NENE, V.; NGUYEN, N.; PEARSON, M. D.; PRITHAM, E. J.; PUIU, D.; QI, Y.; RANSON, H.; RIBEIRO, J. M.; ROBERSTON, H. M.; SEVERSON, D. W.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STRAUSBERG, R. L.; SUN, C.; SUTTON, G.; TU, Z. J.; TUBIO, J. M.; UNGER, M. F.; VANLANDINGHAM, D. L.; VILELLA, A. J.; WHITE, O.; WHITE, J. R.; WONDJI, C. S.; WORTMAN, J.; ZDOBNOV, E. M.; BIRREN, B.; CHRISTENSEN, B. M.; COLLINS, F. H.; CORNEL, A.; DIMOPOULOS, G.; HANNICK, L. I.; HIGGS, S.; LANZARO, G. C.; LAWSON, D.; LEE, N. H.; MUSKAVITCH, M. A.; RAIKHEL, A. S.; ATKINSON, P. W. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 86-8, 2010.

ARIMATSU, Y.; KOTANI, E.; SUGIMURA, Y.; FURUSAWA, T. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 176-183, 2007.

ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, A.; HERNANDEZ, C.; IOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Web Server issue, p. 597-603, 2012.

ATSUMI, S.; INOUE, Y.; ISHIZAKA, T.; MIZUNO, E.; YOSHIZAWA, Y.; KITAMI, M.; SATO, R. Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 19, p. 4913-4926, 2008.

ATSUMI, S.; MIZUNO, E.; HARA, H.; NAKANISHI, K.; KITAMI, M.; MIURA, N.; TABUNOKI, H.; WATANABE, A.; SATO, R. Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3966-3977, 2005.

BAI, X.; MAMIDALA, P.; RAJARAPU, S. P.; JONES, S. C.; MITTAPALLI, O. Transcriptomics of the Bed Bug (*Cimex lectularius*). **Plos One**, v. 6, n. 1, p. e16336, 2011.

BAI, X.; ZHANG, W.; ORANTES, L.; JUN, T.-H.; MITTAPALLI, O.; MIAN, M. A. R.; MICHEL, A. P. Combining Next-Generation Sequencing Strategies for Rapid Molecular Resource Development from an Invasive Aphid Species, *Aphis glycines*. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. e11370, 2010.

BASNAYAKE, S. W.; MOYLE, R.; BIRCH, R. G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Report**, v. 30, n. 3, p. 439-448, 2011.

BASS, C.; HEBSGAARD, M. B.; HUGHES, J. Genomic resources for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Transcriptome pyrosequencing and microarray design. **Insect Science**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2012.

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

BAUTISTA, M. A. M.; MIYATA, T.; MIURA, K.; TANAKA, T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 38-46, 2009.

BELLES, X. Beyond Drosophila: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111-128, 2010.

BENINTENDE, G.; MÁRQUEZ, A. M. Bacterias entomopatogenas. In: LECUONA, R. E. (Ed.). **Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga**, 1996. p.338.

BERENDSEN, H.; GRIGERA, J.; STRAATSMA, T. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269-6271, 1987.

BERENDSEN, H. J.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of chemical physics**, v. 81, p. 3684, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES: 316 p. 2008.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 129-135, 2002.

BOISSIERE, A.; TCHIOFFO, M. T.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; NSANGO, S. E.; SHAHBAZKIA, H. R.; AWONO-AMBENE, P. H.; LEVASHINA, E. A.; CHRISTEN, R.; MORLAIS, I. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002742, 2012.

BOLOGNESI, R.; ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 11, p. 1249-1259, 2005.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.

BOONSERM, P.; MO, M.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; LESCAR, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, May 2006.

BOTELHO, P. S. M.; GARCIA, J. F.; MACEDO, L. P. M. Outras lagartas que atacam a cana-de-açúcar. In: PINTO, A. D. S. (Ed.). **Controle de Pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho - SP: BIOCONTROL, 2006. p.25-28.

BOWER, R.; ELLIOTT, A.; POTIER, B. M.; BIRCH, R. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 239-249, 1996.

BOX, H. E. **List of sugar-cane insects: a synonymic catalogue of the sugar-cane insects and mites of the world and of their insect parasites and predators, arranged systematically**. London: Commonwealth Institute of Entomology, 1953. 100p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, D. P. V.; ARRIGONI, E. D. B.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v. 5, n. 2-3, p. 209-221, 2003.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. D. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Serviço de Produção de Informação-SPI, 1998.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 9, p. 2793-2801, 1997.

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

BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, n. 3, p. 237-246, 1992.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GOMEZ, I.; SOBERON, 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**, v. 1562, n. 1-2, p. 63-69, 2002.

BRISCENO, S. H. R. **Informações sobre: lepidopteros da família Castiniidae - Distribuição geográfica das espécies conhecidas na América tropical e subtropical e importância econômica da *Castnia licus* Drury, 1773 no nordeste do Brasil.** Cooperativa regional dos produtores de açúcar e álcool de Alagoas. Maceió, AL, p.20. 2008

BROEHAN, G.; ARAKANE, Y.; BEEMAN, R. W.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H. Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: a role in molting revealed by RNA interference. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 3, p. 274-283, 2010.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 1-7, 2004.

BUCHELI, C.; DRY, I.; ROBINSON, S. Isolation of a full-length cDNA encoding polyphenol oxidase from sugarcane, a C4 grass. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 6, p. 1233-1238, 1996.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. S68-S74, 2013.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 217-226, 2010.

BUTTERFIELD, K.; IRVINE, E.; VALDEZ GARZA, M.; MIRKOV, E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 5, p. 797-803, 2002.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.

CHAPMAN, J. A.; KIRKNESS, E. F.; SIMAKOV, O.; HAMPSON, S. E.; MITROS, T.; WEINMAIER, T.; RATTEI, T.; BALASUBRAMANIAN, P. G.; BORMAN, J.; BUSAM, D.; DISBENNETT, K.; PFANNKUCH, C.; SUMIN, N.; SUTTON, G. G.; VISWANATHAN, L. D.; WALENZ, B.; GOODSTEIN, D. M.; HELSTEN,

U.; KAWASHIMA, T.; PROCHNIK, S. E.; PUTNAM, N. H.; SHU, S.; BLUMBERG, B.; DANA, C. E.; GEE, L.; KIBLER, D. F.; LAW, L.; LINDGENS, D.; MARTINEZ, D. E.; PENG, J.; WIGGE, P. A.; BERTULAT, B.; GUDER, C.; NAKAMURA, Y.; OZBEK, S.; WATANABE, H.; KHALTURIN, K.; HEMMRICH, G.; FRANKE, A.; AUGUSTIN, R.; FRAUNE, S.; HAYAKAWA, E.; HAYAKAWA, S.; HIROSE, M.; HWANG, J. S.; IKEO, K.; NISHIMIYA-FUJISAWA, C.; OGURA, A.; TAKAHASHI, T.; STEINMETZ, P. R. H.; ZHANG, X.; AUFSCHNAITER, R.; EDER, M.-K.; GORNY, A.-K.; SALVENMOSER, W.; HEIMBERG, A. M.; WHEELER, B. M.; PETERSON, K. J.; BOTTGER, A.; TISCHLER, P.; WOLF, A.; GOJOBORI, T.; REMINGTON, K. A.; STRAUSBERG, R. L.; VENTER, J. C.; TECHNAN, U.; HOBMAYER, B.; BOSCH, T. C. G.; HOLSTEIN, T. W.; FUJISAWA, T.; BODE, H. R.; DAVID, C. N.; ROKHSAR, D. S.; STEELE, R. E. The dynamic genome of Hydra. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 592-596, 2010.

CHEN, J.; ZHANG, D.; YAO, Q.; ZHANG, J.; DONG, X.; TIAN, H.; ZHANG, W. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 777-786, 2010.

CHEN, X.; TIAN, H.; ZOU, L.; TANG, B.; HU, J.; ZHANG, W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 6, p. 613-619, 2008.

CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; DRIESEL, A. J.; MULLER, W. E.; WETTER, T.; SUHAI, S. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1147-1159, 2004.

CHILANA, P.; SHARMA, A.; RAI, A. Insect genomic resources: status, availability and future. **Current science**, v. 102, n. 4, p. 571-580, 2012.

CHOWDHURY, M. K. U.; VASIL, I. K. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, n. 2-3, p. 181-188, 1993.

CHRISTENSEN, A.; QUAIL, P. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 302-308, 2006.

CHRISTY, L. A.; ARVINTH, S.; SARAVANAKUMAR, M.; KANCHANA, M.; MUKUNTHAN, N.; SRIKANTH, J.; THOMAS, G.; SUBRAMONIAN, N. Engineering sugarcane cultivars with bovine pancreatic trypsin inhibitor (aprotinin) gene for protection against top borer (*Scirpophaga excerptalis* Walker). **Plant Cell Report**, v. 28, n. 2, p. 175-184, 2009.

COLLINS, F. S.; GREEN, E. D.; GUTTMACHER, A. E.; GUYER, M. S. A vision for the future of genomics research. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 835-847, 2003.

COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W96-9, 2004.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar safra 2012/2013, segundo levantamento**. Brasília: Conab - Companhia Nacional de Abastecimento: 18 p. 2012.

CONESA, A.; GOTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1-12, 2008.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

CONSORTIUM, T. I. S. G. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 12, p. 1036-1045, 2008.

COOPER, M. A.; CARROLL, J.; TRAVIS, E. R.; WILLIAMS, D. H.; ELLAR, D. J. Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. **The Biochemical Journal**, v. 333 (Pt 3), p. 677-683, 1998.

CRAVEIRO, K. I. C.; GOMES JUNIOR, J. E.; SILVA, M. C. M.; MACEDO, L. L. P.; LUCENA, W. A.; SILVA, M. S.; ANTONINO DE SOUZA JUNIOR, J. D.; OLIVEIRA, G. R.; QUEZADO DE MAGALHAES, M. T.; SANTIAGO, A. D.; GROSSI-DE-SA, M. F. Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 3, p. 215-221, 2010.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement**. Amsterdam Elsevier, 1987. cap. 2, p.7-84.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, v. 98, p. 10089, 1993.

DAY, M. F.; WATERHOUSE, D. F. **Functions of the alimentary system**. New York: John Wiley, 1953.

DE GROOT, B. L.; GRUBMÜLLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2353-2357, 2001.

DE MAAGD, R. A.; BAKKER, P. L.; MASSON, L.; ADANG, M. J.; SANGADALA, S.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 463-471, 1999.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R. A.; KWA, M. S.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J. M.; STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1537-1543, 1996.

DE MAAGD, R. A.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1559-1563, 2000.

DERBYSHIRE, D. J.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 57, n. Pt 12, p. 1938-1944, 2001.

DHAR, A. K.; BOWERS, R. M.; LICON, K. S.; VEAZEY, G.; READ, B. Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 8-9, p. 1688-1695, 2009.

DONG, L.; SUI, C.; LIU, Y.; YANG, Y.; WEI, J. Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum chinense*. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 8, p. 5017-5023, 2011.

EATON, B. A.; FETTER, R. D.; DAVIS, G. W. Dynactin is necessary for synapse stabilization. **Neuron**, v. 34, n. 5, p. 729-7241, 2002.

ELLIOTT, A. R.; CAMPBELL, J. A.; BRETTELL, R. I. S.; GROF, C. P. L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Functional Plant Biology**, v. 25, n. 6, p. 739-743, 1998.

ENRÍQUEZ, G. A.; TRUJILLO, L. E.; MENÉNDEZ, C.; VAZQUEZ, R. I.; TIEL, K.; DAFHNIS, F.; ARRIETA, J.; SELMAN, G.; HERNÁNDEZ, L. Sugarcane (*Saccharum hybrid*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Production of transgenic plants expressing proteins with agronomic and industrial value. In: ARIEL, D. A. (Ed.). **Developments in Plant Genetics and Breeding**: Elsevier, v. Volume 5, 2000. p.76-81.

EWEN-CAMPEN, B.; SHANER, N.; PANFILIO, K. A.; SUZUKI, Y.; ROTH, S.; EXTAVOUR, C. G. The maternal and early embryonic transcriptome of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. **Bmc Genomics**, v. 12, p. 1-22, 2011.

FADROSH, D. W.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; WILLIAMSON, S. J. Separation of single-stranded DNA, double-stranded DNA and RNA from an environmental viral community using hydroxyapatite chromatography. **Journal of Visualized Experiments**, n. 55, p. e3146, 2011.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. Disponível em: < <http://faostat.fao.org> >. Acesso em: 19/02/2013.

FEDERICI, B. A.; PARK, H.-W.; BIDESHI, D. K. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. **The Open Toxinology Journal**, v. 3, p. 83-100, 2010.

FERNANDEZ-BALLESTER, G.; SERRANO, L. Prediction of protein-protein interaction based on structure. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Protein Design**. USA: Springer, v.340, 2006. cap. 10, p.207-234. (Methods in Molecular Biology).

FIERS, W.; CONTRERAS, R.; DUERINCK, F.; HAEGEMAN, G.; ISERENTANT, D.; MERREGAERT, J.; MIN JOU, W.; MOLEMANS, F.; RAEYMAEKERS, A.; VAN DEN BERGHE, A.; VOLCKAERT, G.; YSEBAERT, M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. **Nature**, v. 260, n. 5551, p. 500-507, 1976.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FISER, A.; SALLI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 461-91, 2003.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006.

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1601-1613, 2006.

FROHMAN, M. A. RACE: rapid amplification of cDNA ends. **PCR protocols: A guide to methods and applications**, p. 28-38, 1990.

GALITSKY, N.; CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J. R.; PANGBORN, W.; ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 57, n. Pt 8, p. 1101-1109, 2001.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide Resistant Transgenic Sugarcane Plants Containing the bar Gene. **Crop Science**, v. 36, n. 5, p. 1367-1374, 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba - SP: FEALQ, 2002. 920p.

GAMBLEY, R.; FORD, R.; SMITH, G. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -Glucuronidase. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 6, p. 343-346, 1993.

GATEHOUSE, A. M.; GATEHOUSE, J. A.; BHARATHI, M.; SPENCE, J.; POWELL, K. S. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 7-8, p. 529-539, 1998.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94-108, 2009.

GILBERT, W.; MAXAM, A. The nucleotide sequence of the lac operator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3581-3584, 1973.

GILLILAND, A.; CHAMBERS, C. E.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1509-1515, 2002.

GOEBEL, F.-R.; SALLAM, N. New pest threats for sugarcane in the new bioeconomy and how to manage them. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 3, n. 1-2, p. 81-89, 2011.

GOMES JÚNIOR, J. E. **Toxinas Cry: Potencial uso no controle da broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*)**. 2012. 122p. (Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília - DF.

GOMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RIOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, R.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

GOMEZ, I.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, v. 513, n. 2-3, p. 242-246, 2002.

GORDON, K. H.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, 2007.

GRIMMELIKHUIJZEN, C. J.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; HAUSER, F. The promise of insect genomics. **Pest Management Science**, v. 63, n. 5, p. 413-416, 2007.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 122-127, 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**, v. 254, n. 3, p. 447-464, 1995.

GROSSI-DE-SA, M. F.; QUEZADO DE MAGALHAES, M.; SILVA, M. S.; SILVA, S. M.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y.; BRUNETTA, P. S.; OLIVEIRA, G. R.; NETO, O. B.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, R.; 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. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 773-82, 2007.

GUO, S.; YE, S.; LIU, Y.; WEI, L.; XUE, J.; WU, H.; SONG, F.; ZHANG, J.; WU, X.; HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. **Journal of Structural Biology**, v. 168, n. 2, p. 259-266, 2009.

HAHN, D. A.; RAGLAND, G. J.; SHOEMAKER, D. D.; DENLINGER, D. L. Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. **Bmc Genomics**, v. 10, p. 1-9, 2009.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 593-608, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMOND, S. M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5822-5829, 2005.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A., *et al* (Ed.). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**: Springer, 2000. p.524p.

HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. Bacterial insecticides. **Bacteriological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 266-288, 1960.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop science**, v. 9, n. 3, p. 346-348, 1969.

HENSON, J.; TISCHLER, G.; NING, Z. Next-generation sequencing and large genome assemblies. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 8, p. 901-915, 2012.

HERMAN, R. A.; SCHERER, P. N.; YOUNG, D. L.; MIHALIAK, C. A.; MEADE, T.; WOODSWORTH, A. T.; STOCKHOFF, B. A.; NARVA, K. E. Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 3, p. 635-639, 2002.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; VAN VLIET, A.; BAUTSOENS, N.; VAN RIE, J.; FERRE, J. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7654-7659, 2008.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J.; FRAAIJE, J. G. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

HIMMELBACH, A.; ZIEROLD, U.; HENSEL, G.; RIECHEN, J.; DOUCHKOV, D.; SCHWEIZER, P.; KUMLEHN, J. A set of modular binary vectors for transformation of cereals. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 1192-1200, 2007.

HO, N. H.; BAISAKH, N.; OLIVA, N.; DATTA, K.; FRUTOS, R.; DATTA, S. K. Translational Fusion Hybrid Bt Genes Confer Resistance against Yellow Stem Borer in Transgenic Elite Vietnamese Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. **Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 781-789, 2006.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HOLT, R. A.; SUBRAMANIAN, G. M.; HALPERN, A.; SUTTON, G. G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D. R.; WINCKER, P.; CLARK, A. G.; RIBEIRO, J. M.; WIDES, R.; SALZBERG, S. L.; LOFTUS, B.; YANDELL, M.; MAJOROS, W. H.; RUSCH, D. B.; LAI, Z.; KRAFT, C. L.; ABRIL, J. F.; ANTHOUARD, V.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BADEN, H.; DE BERARDINIS, V.; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, R.; BOSCU, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATURVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRYSTAL, M. A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C. A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBBER-FREIMOSER, A.; FRIEDLI, L.; GU, Z.; GUAN, P.; GUIGO, R.; HILLENMEYER, M. E.; HLADUN, S. L.; HOGAN, J. R.; HONG, Y. S.; HOOVER, J.; JAILLON, O.; KE, Z.; KODIRA, C.; KOKOZA, E.; KOUTSOS, A.; LETUNIC, I.; LEVITSKY, A.; LIANG, Y.; LIN, J. J.; LOBO, N. F.; LOPEZ, J. R.; MALEK, J. A.; MCINTOSH, T. C.; MEISTER, S.; MILLER, J.; MOBARRY, C.; MONGIN, E.; MURPHY, S. D.; O'BROCHTA, D. A.; PFANNKOCH, C.; QI, R.; REGIER, M. A.; REMINGTON, K.; SHAO, H.; SHARAKHOVA, M. V.; SITTER, C. D.; SHETTY, J.; SMITH, T. J.; STRONG, R.; SUN, J.; THOMASOVA, D.; TON, L. Q.; TOPALIS, P.; TU, Z.; UNGER, M. F.; WALENZ, B.; WANG, A.; WANG, J.; WANG, M.;

WANG, X.; WOODFORD, K. J.; WORTMAN, J. R.; WU, M.; YAO, A.; ZDOBNOV, E. M.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHAO, S.; ZHU, S. C.; ZHIMULEV, I.; COLUZZI, M.; DELLA TORRE, A.; ROTH, C. W.; LOUIS, C.; KALUSH, F.; MURAL, R. J.; MYERS, E. W.; ADAMS, M. D.; SMITH, H. O.; BRODER, S.; GARDNER, M. J.; FRASER, C. M.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BREY, P. T.; VENTER, J. C.; WEISSENBACH, J.; KAFATOS, F. C.; COLLINS, F. H.; HOFFMAN, S. L. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HONEE, G.; VRIEZEN, W.; VISSER, B. A Translation Fusion Product of Two Different Insecticidal Crystal Protein Genes of *Bacillus thuringiensis* Exhibits an Enlarged Insecticidal Spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 823-5, 1990.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v. 354, n. 1, p. 1-6, 1994.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227-235, 2010.

IAA/PLANALSUCAR. **Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba - SP: 1977. 29p.

IJAZ, S.; RANA, I. A.; KHAN, I. A.; SALEEM, M. Establishment of an in vitro regeneration system for genetic transformation of selected sugarcane genotypes. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 512-530, 2012.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1187-1198, 1999.

ISKANDAR, H.; SIMPSON, R.; CASU, R.; BONNETT, G.; MACLEAN, D.; MANNERS, J. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.

IZUMI, H.; TORIGOE, T.; ISHIGUCHI, H.; URAMOTO, H.; YOSHIDA, Y.; TANABE, M.; ISE, T.; MURAKAMI, T.; YOSHIDA, T.; NOMOTO, M.; KOHNO, K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 6, p. 541-549, 2003.

JACKSON, M.; ANDERSON, D.; BIRCH, R. Comparison of Agrobacterium and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. **Transgenic Research**, v. 22, n. 1, p. 143-151, 2013.

JAIN, M.; CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO, M. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. **Plant Cell Report**, v. 26, n. 5, p. 581-590, 2007.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:2011**. Ithaca - NY, p.1-32. 2011

JIAN, B.; LIU, B.; BI, Y.; HOU, W.; WU, C.; HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 1-14, 2008.

JORGENSEN, R.; CLUSTER, P.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 5, p. 957-973, 1996.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 3, p. 166-171, 2006.

KARATOLOS, N.; PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; CHAUHAN, R.; DENHOLM, I.; GORMAN, K.; NELSON, D. R.; BASS, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; WILLIAMSON, M. S. Pyrosequencing the transcriptome of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* reveals multiple transcripts encoding insecticide targets and detoxifying enzymes. **Bmc Genomics**, v. 12, p. 1-14, 2011.

KASHYAP, S.; SINGH, B. D.; AMLA, D. V. Computational tridimensional protein modeling of Cry1Ab19 toxin from *Bacillus thuringiensis* BtX-2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 788-792, 2012.

KIM, J. I.; JU, Y. S.; PARK, H.; KIM, S.; LEE, S.; YI, J. H.; MUDGE, J.; MILLER, N. A.; HONG, D.; BELL, C. J.; KIM, H. S.; CHUNG, I. S.; LEE, W. C.; LEE, J. S.; SEO, S. H.; YUN, J. Y.; WOO, H. N.; LEE, H.; SUH, D.; KIM, H. J.; YAVARTANOO, M.; KWAK, M.; ZHENG, Y.; LEE, M. K.; KIM, J. Y.; GOKCUMEN, O.; MILLS, R. E.; ZARANEK, A. W.; THAKURIA, J.; WU, X.; KIM, R. W.; HUNTLEY, J. J.; LUO, S.; SCHROTH, G. P.; WU, T. D.; KIM, H.; YANG, K. S.; PARK, W. Y.; CHURCH, G. M.; LEE, C.; KINGSMORE, S. F.; SEO, J. S. A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual. **Nature**, v. 460, n. 7258, p. 1011-1015, 2009.

KNAAK, N.; FRANZ, A. R.; SANTOS, G. F.; FIUZA, L. M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, 2010.

KRAMER, K. J.; HOPKINS, T. L.; SCHAEFER, J. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 10, p. 1067-1080, 1995.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K.; GROF, C. P.; BONNETT, G.; SMITH, G. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.;

TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKESEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S. P.; YEH, R. F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LASKOWSKI, R. A.; HUTCHINSON, E. G.; MICHIE, A. D.; WALLACE, A. C.; JONES, M. L.; THORNTON, J. M. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 488-490, 1997.

LAUSTSEN, P. G.; VANG, S.; KRISTENSEN, T. Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 98-104, 2001.

LEFEVER, S.; HELLEMANS, J.; PATTYN, F.; PRZYBYLSKI, D. R.; TAYLOR, C.; GEURTS, R.; UNTERGASSER, A.; VANDESOMPELE, J. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 7, p. 2065-2069, 2009.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 525-550, 1997.

LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. **Metabolic Engineering**, v. 4, n. 1, p. 67-79, 2002.

LEY, T. J.; MARDIS, E. R.; DING, L.; FULTON, B.; MCLELLAN, M. D.; CHEN, K.; DOOLING, D.; DUNFORD-SHORE, B. H.; MCGRATH, S.; HICKENBOTHAM, M.; COOK, L.; ABBOTT, R.; LARSON, D. E.; KOBOLDT, D. C.; POHL, C.; SMITH, S.; HAWKINS, A.; ABBOTT, S.; LOCKE, D.; HILLIER, L. W.; MINER, T.; FULTON, L.; MAGRINI, V.; WYLIE, T.; GLASSCOCK, J.; CONYERS, J.; SANDER, N.; SHI, X.; OSBORNE, J. R.; MINX, P.; GORDON, D.; CHINWALLA, A.; ZHAO, Y.; RIES, R. E.; PAYTON, J. E.; WESTERVELT, P.; TOMASSON, M. H.; WATSON, M.; BATY, J.; IVANOVICH, J.; HEATH, S.; SHANNON, W. D.; NAGARAJAN, R.; WALTER, M. J.; LINK, D. C.; GRAUBERT, T. A.; DIPERSIO, J. F.; WILSON, R. K. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 66-72, 2008.

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

- LI, X.; ZHANG, M.; ZHANG, H. RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. e17788, 2011.
- LILLEY, C. J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W. L.; URWIN, P. E. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 701-711, 2007.
- LOCKE, M. Insect epidermal cells. In: BINNINGTON, K. e RETNAKARAN, A. (Ed.). **Physiology of the Insect Epidermis**. Melbourne: CRISCO, v.11, 1991. p.1-22.
- LORD, J. C.; HARTZER, K.; TOUTGES, M.; OPPERT, B. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 219-221, 2010.
- LOURENÇO, A., PEDRO; MACKERT, A.; DOS SANTOS CRISTINO, A.; SIMÕES, Z., LUZ PAULINO. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie**, v. 39, n. 3, p. 372-385, 2008.
- LU, Y. J.; ADANG, M. J. Conversion of *Bacillus thuringiensis* cryIAC-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33-40, 1996.
- LUAN, Y.; XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 639-647, 2007.
- MACEDO, I. D. C. **A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. São Paulo: UNICA, 2005. 237p.
- MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Report**, v. 23, n. 3, p. 134-143, 2004.
- MAO, Y.-B.; CAI, W.-J.; WANG, J.-W.; HONG, G.-J.; TAO, X.-Y.; WANG, L.-J.; HUANG, Y.-P.; CHEN, X.-Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.
- MARONICHE, G. A.; SAGADIN, M.; MONGELLI, V. C.; TRUOL, G. A.; DEL VAS, M. Reference gene selection for gene expression studies using RT-qPCR in virus-infected planthoppers. **Virology Journal**, v. 8, p. 1-8, 2011.
- MASOUDI-NEJAD, A.; TONOMURA, K.; KAWASHIMA, S.; MORIYA, Y.; SUZUKI, M.; ITOH, M.; KANEHISA, M.; ENDO, T.; GOTO, S. EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server issue, p. 459-462, 2006.

MASSON, L.; LU, Y. J.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M. J. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20309-20315, 1995.

MAZO, A. M.; MASHKOVA, T. D.; AVDONINA, T. A.; AMBARTSUMYAN, N. S.; KISSELEV, L. L. An improved rapid enzymatic method of RNA sequencing using chemical modification. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 8, p. 2469-2482, 1979.

MCQUALTER, R. B.; CHONG, B. F.; MEYER, K.; VAN DYK, D. E.; O'SHEA, M. G.; WALTON, N. J.; VIITANEN, P. V.; BRUMBLEY, S. M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 29-41, 2005.

MCQUALTER, R. B.; DALE, J. L.; HARDING, R. M.; MCMAHON, J. A.; SMITH, G. R. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a *Fiji disease virus* (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 2, p. 139-145, 2004.

MENDONÇA, A. F., VIVEIROS, A.J.A., SAMPAIO, F.F., A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: *Castniidae*). In: MENDONÇA, A. F. (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar. Insetos, Cia. Maceió**, 1996. p.133-167.

MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. Pt 24, p. 4393-4412, 2003.

METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1767-1776, 2005.

MIN JOU, W.; HAEGEMAN, G.; YSEBAERT, M.; FIERS, W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. **Nature**, v. 237, n. 5350, p. 82-88, 1972.

MING, R.; LIU, S. C.; LIN, Y. R.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T. F.; WU, K. K.; MOORE, P. H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M. E.; IRVINE, J. E.; PATERSON, A. H. Detailed alignment of saccharum and sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1663-1682, 1998.

MITTAPALLI, O.; BAI, X.; MAMIDALA, P.; RAJARAPU, S. P.; BONELLO, P.; HERMS, D. A. Tissue-Specific Transcriptomics of the Exotic Invasive Insect Pest Emerald Ash Borer (*Agrilus planipennis*). **Plos One**, v. 5, n. 10, p. e13708, 2010.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; DE CAMPOS, M. K. F.; DE CARVALHO, J. F. R. P.; FILHO, J. C. B.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 159-62, 1999.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, v. 9, n. 5, p. 409-417, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIMOV, S.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; DUKIANDJIEV, S.; DE MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5328-5330, 2001.

NAIR, M. S.; DEAN, D. H. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26324-26331, 2008.

NAKANISHI, K.; YAOI, K.; NAGINO, Y.; HARA, H.; KITAMI, M.; ATSUMI, S.; MIURA, N.; SATO, R. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. **FEBS Letters**, v. 519, n. 1-3, p. 215-220, 2002.

NAKANISHI, K.; YAOI, K.; SHIMADA, N.; KADOTANI, T.; SATO, R. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, n. 1, p. 57-63, 1999.

NAKASU, E. Y. T.; FIRMINO, A. A. P.; DIAS, S. C.; ROCHA, T. L.; RAMOS, H. B.; OLIVEIRA, G. R.; LUCENA, W.; CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 3, p. 227-230, 2010.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NELSON, N.; PERZOV, N.; COHEN, A.; HAGAI, K.; PADLER, V.; NELSON, H. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. Pt 1, p. 89-95, 2000.

NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z. J.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, P.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y. H.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE, O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Sistema agroindustrial da cana: cenários e agenda estratégica. **Economia Aplicada**, v. 11, p. 587-604, 2007.

NÓBREGA, J. C. M. D.; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e Melhoramento da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba - SP: CP2, 2006. p.39-56.

NOH, M. Y.; BEEMAN, R. W.; ARAKANE, Y. RNAi-based functional genomics in *Tribolium castaneum* and possible application for controlling insect pests. **Entomological Research**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2012.

OHYA, Y.; UMEMOTO, N.; TANIDA, I.; OHTA, A.; IIDA, H.; ANRAKU, Y. Calcium-sensitive cls mutants of *Saccharomyces cerevisiae* showing a Pet- phenotype are ascribable to defects of vacuolar membrane H(+)-ATPase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 13971-13977, 1991.

OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C.; LUCENA, W. A.; NAKASU, E. Y.; FIRMINO, A. A.; BENEVENTI, M. A.; SOUZA, D. S.; GOMES, J. E., JR.; DE SOUZA, J. D., JR.; RIGDEN, D. J.; RAMOS, H. B.; SOCCOL, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 85, 2011.

PACHECO, S.; GOMEZ, I.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 47, p. 32750-32757, 2009.

PAIM, R. M.; PEREIRA, M. H.; DI PONZIO, R.; RODRIGUES, J. O.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, N. F.; ARAUJO, R. N. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 1-11, 2012.

PAPANICOLAOU, A.; GEBAUER-JUNG, S.; BLAXTER, M. L.; OWEN MCMILLAN, W.; JIGGINS, C. D. ButterflyBase: a platform for lepidopteran genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. 582-587, 2008.

PAPANICOLAOU, A.; STIERLI, R.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; HECKEL, D. G. Next generation transcriptomes for next generation genomes using est2assembly. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1-16, 2009.

PARDO-LOPEZ, L.; GOMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10329-10336, 2006.

PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VAN MUNSTER, M.; AUGUSTIN, S.; PAURON, D.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 5-6, p. 403-413, 2009.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VOGEL, H.; NELSON, D. R.; REYNOLDS, S. E.; HECKEL, D. G.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 61-75, 2010.

PEI, D. S.; SUN, Y. H.; CHEN, S. P.; WANG, Y. P.; HU, W.; ZHU, Z. Y. Zebrafish GAPDH can be used as a reference gene for expression analysis in cross-subfamily cloned embryos. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 291-293, 2007.

PENG, X.; ZHA, W.; HE, R.; LU, T.; ZHU, L.; HAN, B.; HE, G. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 745-762, 2011.

PETERS, W. **Peritrophic membranes**. Springer-Verlag, 1992.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2008.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PINTO, A. D. S. **Controle de Pagas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho - SP: BIOCONTROL, 2006. 64p.

PINTO, A. D. S.; GARCIA, J. F.; OLIVEIRA, H. N. D. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba - SP: CP2, 2006. p.257-280.

PITTENDRIGH, B. R.; CLARK, J. M.; JOHNSTON, J. S.; LEE, S. H.; ROMERO-SEVERSON, J.; DASCH, G. A. Sequencing of a new target genome: the *Pediculus humanus humanus* (Phthiraptera: Pediculidae) genome project. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1103-1111, 2006.

POP, M.; SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 3, p. 142-149, 2008.

PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.

PUTNAM, N. H.; BUTTS, T.; FERRIER, D. E.; FURLONG, R. F.; HELLSTEN, U.; KAWASHIMA, T.; ROBINSON-RECHAVI, M.; SHOGUCHI, E.; TERRY, A.; YU, J. K.; BENITO-GUTIERREZ, E. L.; DUBCHAK, I.; GARCIA-FERNANDEZ, J.; GIBSON-BROWN, J. J.; GRIGORIEV, I. V.; HORTON, A. C.; DE JONG, P. J.; JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHARA, Y.; KUROKI, Y.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; OSOEGAWA, K.; PENNACCHIO, L. A.; SALAMOV, A. A.; SATOU, Y.; SAUKA-SPENGLER, T.; SCHMUTZ, J.; SHIN, I. T.; TOYODA, A.; BRONNER-FRASER, M.; FUJIYAMA, A.; HOLLAND, L. Z.; HOLLAND, P. W.; SATOH, N.; ROKHSAR, D. S. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1064-1071, 2008.

RABINOVITCH, L.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**: Embrapa Meio Ambiente, v.2, 2000. p.17-85.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. Academic Press, 2003.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; GERARDO, N. M. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **PLoS Biol**, v. 8, n. 2, p. e1000313, 2010.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BROWN, S. J.; DENELL, R.; BEEMAN, R. W.; GIBBS, R.; BUCHER, G.; FRIEDRICH, M.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J.; KLINGLER, M.; LORENZEN, M.; ROTH, S.; SCHRODER, R.; TAUTZ, D.; ZDOBNOV, E. M.; MUZNY, D.; ATTAWAY, T.; BELL, S.; BUHAY, C. J.; CHANDRABOSE, M. N.; CHAVEZ, D.; CLERK-BLANKENBURG, K. P.; CREE, A.; DAO, M.; DAVIS, C.; CHACKO, J.; DINH, H.; DUGAN-ROCHA, S.; FOWLER, G.; GARNER, T. T.; GARNES, J.; GNIRKE, A.; HAWES, A.; HERNANDEZ, J.; HINES, S.; HOLDER, M.; HUME, J.; JHANGIANI, S. N.; JOSHI, V.; KHAN, Z. M.; JACKSON, L.; KOVAR, C.; KOWIS, A.; LEE, S.; LEWIS, L. R.; MARGOLIS, J.; MORGAN, M.; NAZARETH, L. V.; NGUYEN, N.; OKWUONU, G.; PARKER, D.; RUIZ, S. J.; SANTIBANEZ, J.; SAVARD, J.; SCHERER, S. E.; SCHNEIDER, B.; SODERGREN, E.; VATTAHIL, S.; VILLASANA, D.; WHITE, C. S.; WRIGHT, R.; PARK, Y.; LORD, J.; OPPERT, B.; BROWN, S.; WANG, L.; WEINSTOCK, G.; LIU, Y.; WORLEY, K.; ELSIK, C. G.; REESE, J. T.; ELHAIK, E.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BEIDLER, J.; DEMUTH, J. P.; DRURY, D. W.; DU, Y. Z.; FUJIWARA, H.; MASELLI, V.; OSANAI, M.; ROBERTSON, H. M.; TU, Z.; WANG, J. J.; WANG, S.; SONG, H.; ZHANG, L.; WERNER, D.; STANKE, M.; MORGENSTERN, B.; SOLOVYEV, V.; KOSAREV, P.; BROWN, G.; CHEN, H. C.; ERMOLAEVA, O.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SOUVOROV, A.; MACKAY, A. J.; WATERHOUSE, R. M.; WYDER, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KADOWAKI, T.; BORK, P.; ARANDA, M.; BAO, R.; BEERMANN, A.; BERNS, N.; BOLOGNESI, R.; BONNETON, F.; BOPP, D.; BUTTS, T.; CHAUMOT, A.; DENELL, R. E.; FERRIER, D. E.; GORDON, C. M.; JINDRA, M.; LAN, Q.; LATTORFF, H. M.; LAUDET, V.; VON LEVETSOW, C.; LIU, Z.; LUTZ, R.; LYNCH, J. A.; DA FONSECA, R. N.; POSNIEN, N.; REUTER, R.; SCHINKO, J. B.; SCHMITT, C.; SCHOPPMEIER, M.; SHIPPY, T. D.; SIMONNET, F.; MARQUES-SOUZA, H.; TOMOYASU, Y.; TRAUNER, J.; VAN DER ZEE, M.; VERVOORT, M.; WITTKOPP, N.; WIMMER, E. A.; YANG, X.; JONES, A. K.; SATTELLE, D. B.; EBERT, P. R.; NELSON, D.; SCOTT, J. G.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; ARAKANE, Y.; ZHU, Q.; HOGENKAMP, D.; DIXIT, R.; JIANG, H.; ZOU, Z.; MARSHALL, J.; ELPIDINA, E.; VINOKUROV, K.; OPPERT, C.; EVANS, J.; LU, Z.; ZHAO, P.; SUMATHIPALA, N.; ALTINCICEK, B.; VILCINSKAS, A.; WILLIAMS, M.; HULTMARK, D.; HETRU, C.; HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; LI, B.; TANAKA, Y.; PREDEL, R.; NEUPERT, S.; SCHACHTNER, J.; VERLEYEN, P.; RAIBLE, F.; WALDEN, K. K.; ANGELI, S.; FORET, S.; SCHUETZ, S.; MALESZKA, R.; MILLER, S. C.; GROSSMANN, D. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949-955, 2008.

RODRIGUEZ-CABRERA, L.; TRUJILLO-BACALLAO, D.; BORRAS-HIDALGO, O.; WRIGHT, D. J.; AYRA-PARDO, C. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 2894-2903, 2010.

ROMANO, E.; BEAUCLAIR, E. G. F. D.; FERRO, J.; MENOSSI, M.; MATSUOKA, S. Guia da cana-de-açúcar: avanço beneficia o país. 2009. Disponível em: < <http://cib.org.br/> >.

RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETERSSON, B.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. **Analytical Biochemistry**, v. 242, n. 1, p. 84-89, 1996.

RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363-365, 1998.

RÖTHER, S.; MEISTER, G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1905-1915, 2011.

- SAMISH, I.; GU, J.; KLEIN, M. L. Protein Motion: Simulation. In: GU, J. e BOURNE, P. E. (Ed.). **Structural Bioinformatics**. 2 ed. USA: John Wiley & Sons, v.44, 2009. cap. 37, p.907-936.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, v. 217, p. 483-509, 1993.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. D. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003.
- SANTOSA, D. A.; HENDROKO, R.; FAROUK, A.; GREINER, R. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. **Molecular Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 113-119, 2004.
- SCHARLAKEN, B.; DE GRAAF, D. C.; GOOSSENS, K.; BRUNAIN, M.; PEELMAN, L. J.; JACOBS, F. J. Reference Gene Selection for Insect Expression Studies Using Quantitative Real-Time PCR: The Head of the Honeybee, *Apis mellifera*, After a Bacterial Challenge. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 33, p. 1-10, 2008.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SEGATO, S. V.; PINTO, A. D. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA., J. C. M. D. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: CP 2, 2006. 415 p.
- SELVEY, S.; THOMPSON, E. W.; MATTHAEI, K.; LEA, R. A.; IRVING, M. G.; GRIFFITHS, L. R. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 5, p. 307-311, 2001.
- SEMENZA, G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. **Annual Review of Cell Biology**, v. 2, p. 255-313, 1986.
- SETAMOU, M.; BERNAL, J. S.; LEGASPI, J. C.; MIRKOV, T. E.; LEGASPI, B. C., JR. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 2, p. 469-477, 2002.
- SHANKAR, P.; MANJUNATH, N.; LIEBERMAN, J. The prospect of silencing disease using RNA interference. **The journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 11, p. 1367-1373, 2005.
- SHEN, M. Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507-2524, 2006.
- SIOMI, H.; SIOMI, M. C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 396-404, 2009.

SOBERÓN, M.; PARDO, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore formation by Cry toxins. In: ANDERLUH, G. e LAKEY, J. (Ed.). **Proteins Membrane Binding and Pore Formation**: Springer New York, v.677, 2010. cap. 11, p.127-142. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

STEPHENS, E.; SUGARS, J.; MASLEN, S. L.; WILLIAMS, D. H.; PACKMAN, L. C.; ELLAR, D. J. The N-linked oligosaccharides of aminopeptidase N from *Manduca sexta*: site localization and identification of novel N-glycan structures. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 21, p. 4241-4258, 2004.

TAJNE, S.; SANAM, R.; GUNDLA, R.; GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L.; BODDUPALLY, D.; VUDEM, D. R.; KHAREEDU, V. R. Molecular modeling of Bt Cry1Ac (DI-DII)-ASAL (*Allium sativum* lectin)-fusion protein and its interaction with aminopeptidase N (APN) receptor of *Manduca sexta*. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 33, p. 61-76, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, p. 2731-2739, 2011.

TELLAM, R. L.; VUOCOLO, T.; JOHNSON, S. E.; JARMEY, J.; PEARSON, R. D. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 19, p. 6025-6043, 2000.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.

TENG, X.; ZHANG, Z.; HE, G.; YANG, L.; LI, F. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects. **Journal of Insect Science**, v. 12, p. 1-17, 2012.

TERENIUS, O.; PAPANICOLAOU, A.; GARBUTT, J. S.; ELEFThERIANOS, I.; HUVENNE, H.; KANGINAKUDRU, S.; ALBRECHTSEN, M.; AN, C.; AYMERIC, J.-L.; BARTHEL, A.; BEBAS, P.; BITRA, K.; BRAVO, A.; CHEVALIERI, F.; COLLINGE, D. P.; CRAVA, C. M.; DE MAAGD, R. A.; DUVIC, B.; ERLANDSON, M.; FAYE, I.; FELFOELDI, G.; FUJIWARA, H.; FUTAHASHI, R.; GANDHE, A. S.; GATEHOUSE, H. S.; GATEHOUSE, L. N.; GIEBULTOWICZ, J. M.; GOMEZ, I.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P.; GROOT, A. T.; HAUSER, F.; HECKEL, D. G.; HEGEDUS, D. D.; HRYCAJ, S.; HUANG, L.; HULL, J. J.; IATROU, K.; IGA, M.; KANOST, M. R.; KOTWICA, J.; LI, C.; LI, J.; LIU, J.; LUNDMARK, M.; MATSUMOTO, S.; MEYERING-VOS, M.; MILLICHAP, P. J.; MONTEIRO, A.; MRINAL, N.; NIIMI, T.; NOWARA, D.; OHNISHI, A.; OOSTRA, V.; OZAKI, K.; PAPAKONSTANTINO, M.; POPADIC, A.; RAJAM, M. V.; SAENKO, S.; SIMPSON, R. M.; SOBERON, M.; STRAND, M. R.; TOMITA, S.; TOPRAK, U.; WANG, P.; WEE, C. W.; WHYARD, S.; ZHANG, W.; NAGARAJU, J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; HERRERO, S.; GORDON, K.; SWELTERS, L.; SMAGGHE, G. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 4, p. 675-734, 1988.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. **Comp BioChem Physiol**, v. 109B, n. 1, p. 1-62, 1994.

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

TIAN, H.; PENG, H.; YAO, Q.; CHEN, H.; XIE, Q.; TANG, B.; ZHANG, W. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. **Plos One**, v. 4, n. 7, p. e6225, 2009.

TIEWSIRI, K.; WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 14037-14042, 2011.

TIMMONS, L.; COURT, D. L.; FIRE, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 103-112, 2001.

TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.

TRIVEDI, S.; ARASU, P. Evaluation of endogenous reference genes for real-time PCR quantification of gene expression in *Ancylostoma caninum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 241-244, 2005.

TURNER, C. T.; DAVY, M. W.; MACDIARMID, R. M.; PLUMMER, K. M.; BIRCH, N. P.; NEWCOMB, R. D. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 383-391, 2006.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

UPADHYAY, S.; SINGH, P. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 10, p. 2027-2036, 2011.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33-37, 1987.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.; FINER, J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 2, p. 84-88, 1993.

VAN GUNSTEREN, W. F. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide**. Bimos ; Zürich, 1996.

VAN HIEL, M.; VAN WIELENDAELE, P.; TEMMERMAN, L.; VAN SOEST, S.; VUERINCKX, K.; HUYBRECHTS, R.; BROECK, J.; SIMONET, G. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, 2001.

VENTER, J. C.; LEVY, S.; STOCKWELL, T.; REMINGTON, K.; HALPERN, A. Massive parallelism, randomness and genomic advances. **Nature Genetics**, v. 33 Suppl, p. 219-227, 2003.

VENTER, J. C.; SMITH, H. O.; HOOD, L. A new strategy for genome sequencing. **Nature**, v. 381, n. 6581, p. 364-366, 1996.

VERA, J. C.; WHEAT, C. W.; FESCEMYER, H. W.; FRILANDER, M. J.; CRAWFORD, D. L.; HANSKI, I.; MARDEN, J. H. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 7, p. 1636-1647, 2008.

VICKERS, J. E.; GROF, C. P. L.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; KNIGHT, D. P.; ROBERTS, S. E.; ROBINSON, S. P. Overexpression of Polyphenol Oxidase in Transgenic Sugarcane Results in Darker Juice and Raw Sugar This research was part funded by the CSIRO Tropical Agri-exports Multi-Divisional Program and the Sugar Research and Development Corporation. **Crop Science**, v. 45, n. 1, p. 354-362, 2005.

VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B.; PRABHAKAR, S.; ZHUZHNIKOV, D. P.; DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 145, n. 2, p. 126-137, 2006.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 8, p. 449-459, 2001.

WALSHE, D. P.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J.; HAINES, L. R. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 11-19, 2009.

WANG, J.; WANG, W.; LI, R.; LI, Y.; TIAN, G.; GOODMAN, L.; FAN, W.; ZHANG, J.; LI, J.; GUO, Y.; FENG, B.; LI, H.; LU, Y.; FANG, X.; LIANG, H.; DU, Z.; LI, D.; ZHAO, Y.; HU, Y.; YANG, Z.; ZHENG, H.; HELLMANN, I.; INOUE, M.; POOL, J.; YI, X.; ZHAO, J.; DUAN, J.; ZHOU, Y.; QIN, J.; MA, L.; LI, G.; ZHANG, G.; YANG, B.; YU, C.; LIANG, F.; LI, W.; LI, S.; NI, P.; RUAN, J.; LI, Q.; ZHU, H.; LIU, D.; LU, Z.; LI, N.; GUO, G.; YE, J.; FANG, L.; HAO, Q.; CHEN, Q.; LIANG, Y.; SU, Y.; SAN, A.; PING, C.; YANG, S.; CHEN, F.; LI, L.; ZHOU, K.; REN, Y.; YANG, L.; GAO, Y.; YANG, G.; LI, Z.; FENG, X.; KRISTIANSEN, K.; WONG, G. K.; NIELSEN, R.; DURBIN, R.; BOLUND, L.; ZHANG, X.; YANG, H. The diploid genome sequence of an Asian individual. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 60-65, 2008.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 6977-6982, 1997.

WANG, Y.; HAN, Z.; YAN, S.; MAO, A.; WANG, B.; REN, H.; CHI, Y. Evaluation of suitable reference gene for real-time PCR in human umbilical cord mesenchymal stem cells with long-term in vitro expansion. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 46, n. 7, p. 595-599, 2010.

WARR, E.; AGUILAR, R.; DONG, Y.; MAHAIRAKI, V.; DIMOPOULOS, G. Spatial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptome. **Bmc Genomics**, v. 8, p. 1-11, 2007.

WATERHOUSE, P. M.; WANG, M.-B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v. 411, p. 834-842, 2001.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 123-131, 1953.

WEI, J. Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S. C.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WEINSTOCK, G. M.; ROBINSON, G. E.; GIBBS, R. A. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 931-949, 2006.

WENG, L. X.; DENG, H. H.; XU, J. L.; LI, Q.; ZHANG, Y. Q.; JIANG, Z. D.; LI, Q. W.; CHEN, J. W.; ZHANG, L. H. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research**, v. 20, n. 4, p. 759-772, 2011.

WERREN, J. H.; RICHARDS, S.; DESJARDINS, C. A.; NIEHUIS, O.; GADAU, J.; COLBOURNE, J. K.; BEUKEBOOM, L. W.; DESPLAN, C.; ELSIK, C. G.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. J.; KITTS, P.; LYNCH, J. A.; MURPHY, T.; OLIVEIRA, D. C.; SMITH, C. D.; VAN DE ZANDE, L.; WORLEY, K. C.; ZDOBNOV, E.

M.; AERTS, M.; ALBERT, S.; ANAYA, V. H.; ANZOLA, J. M.; BARCHUK, A. R.; BEHURA, S. K.; BERA, A. N.; BERENBAUM, M. R.; BERTOSSA, R. C.; BITONDI, M. M.; BORDENSTEIN, S. R.; BORK, P.; BORNBERG-BAUER, E.; BRUNAIN, M.; CAZZAMALI, G.; CHABOUB, L.; CHACKO, J.; CHAVEZ, D.; CHILDERS, C. P.; CHOI, J. H.; CLARK, M. E.; CLAUDIANOS, C.; CLINTON, R. A.; CREE, A. G.; CRISTINO, A. S.; DANG, P. M.; DARBY, A. C.; DE GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; DINH, H. H.; EDWARDS, R.; ELANGO, N.; ELHAIK, E.; ERMOLAEVA, O.; EVANS, J. D.; FORET, S.; FOWLER, G. R.; GERLACH, D.; GIBSON, J. D.; GILBERT, D. G.; GRAUR, D.; GRUNDER, S.; HAGEN, D. E.; HAN, Y.; HAUSER, F.; HULTMARK, D.; HUNTER, H. C. T.; HURST, G. D.; JHANGIAN, S. N.; JIANG, H.; JOHNSON, R. M.; JONES, A. K.; JUNIER, T.; KADOWAKI, T.; KAMPING, A.; KAPUSTIN, Y.; KECHAVARZI, B.; KIM, J.; KIRYUTIN, B.; KOEVOETS, T.; KOVAR, C. L.; KRIVENTSEVA, E. V.; KUCHARSKI, R.; LEE, H.; LEE, S. L.; LEES, K.; LEWIS, L. R.; LOEHLIN, D. W.; LOGSDON, J. M., JR.; LOPEZ, J. A.; LOZADO, R. J.; MAGLOTT, D.; MALESZKA, R.; MAYAMPURATH, A.; MAZUR, D. J.; MCCLURE, M. A.; MOORE, A. D.; MORGAN, M. B.; MULLER, J.; MUNOZ-TORRES, M. C.; MUZNY, D. M.; NAZARETH, L. V.; NEUPERT, S.; NGUYEN, N. B.; NUNES, F. M.; OAKESHOTT, J. G.; OKWUONU, G. O.; PANNEBAKKER, B. A.; PEJAVER, V. R.; PENG, Z.; PRATT, S. C.; PREDEL, R.; PU, L. L.; RANSON, H.; RAYCHOUDHURY, R.; RECHTSTEINER, A.; REESE, J. T.; REID, J. G.; RIDDLE, M.; ROBERTSON, H. M.; ROMERO-SEVERSON, J.; ROSENBERG, M.; SACKTON, T. B.; SATTELLE, D. B.; SCHLUNS, H.; SCHMITT, T.; SCHNEIDER, M.; SCHULER, A.; SCHURKO, A. M.; SHUKER, D. M.; SIMOES, Z. L.; SINHA, S.; SMITH, Z.; SOLOVYEV, V.; SOUVOROV, A.; SPRINGAUF, A.; STAFFLINGER, E.; STAGE, D. E.; STANKE, M.; TANAKA, Y.; TELSCHOW, A.; TRENT, C.; VATTATHIL, S.; VERHULST, E. C.; VILJAKAINEN, L.; WANNER, K. W.; WATERHOUSE, R. M.; WHITFIELD, J. B.; WILKES, T. E.; WILLIAMSON, M.; WILLIS, J. H.; WOLSCHIN, F.; WYDER, S.; YAMADA, T.; YI, S. V.; ZECHER, C. N.; ZHANG, L.; GIBBS, R. A. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 343-348, 2010.

WHEELER, D. A.; SRINIVASAN, M.; EGHOLM, M.; SHEN, Y.; CHEN, L.; MCGUIRE, A.; HE, W.; CHEN, Y. J.; MAKHIJANI, V.; ROTH, G. T.; GOMES, X.; TARTARO, K.; NIAZI, F.; TURCOTTE, C. L.; IRZYK, G. P.; LUPSKI, J. R.; CHINAULT, C.; SONG, X. Z.; LIU, Y.; YUAN, Y.; NAZARETH, L.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; MARGULIES, M.; WEINSTOCK, G. M.; GIBBS, R. A.; ROTHBERG, J. M. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 872-877, 2008.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 824-832, 2009.

WICKER, T.; SCHLAGENHAUF, E.; GRANER, A.; CLOSE, T. J.; KELLER, B.; STEIN, N. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley. **Bmc Genomics**, v. 7, p. 1-11, 2006.

WIECZOREK, H.; BEYENBACH, K. W.; HUSS, M.; VITAVSKA, O. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. Pt 11, p. 1611-1619, 2009.

WIECZOREK, H.; GRBER, G.; HARVEY, W. R.; HUSS, M.; MERZENDORFER, H.; ZEISKE, W. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁽⁺⁾V-ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. Pt 1, p. 127-135, 2000.

WIECZOREK, H.; HUSS, M.; MERZENDORFER, H.; REINEKE, S.; VITAVSKA, O.; ZEISKE, W. The insect plasma membrane H⁺ V-ATPase: intra-, inter-, and supramolecular aspects. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 35, n. 4, p. 359-366, 2003.

WIENISCH, M.; KLINGAUF, J. Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 8, p. 1019-1027, 2006.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. Methuen, 1950.

WINNEBECK, E. C.; MILLAR, C. D.; WARMAN, G. R. Why does insect RNA look degraded? **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 1-7, 2010.

WU, X.; ROGERS LEONARD, B.; ZHU, Y. C.; ABEL, C. A.; HEAD, G. P.; HUANG, F. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 1, p. 29-34, 2009.

XIN-MIN, Z.; LI-QIU, X.; XUE-ZHI, D.; FA-XIANG, W. The theoretical three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* Cry5Aa and its biological implications. **Protein Journal**, v. 28, n. 2, p. 104-110, 2009.

XU, Q.; LU, A.; XIAO, G.; YANG, B.; ZHANG, J.; LI, X.; GUAN, J.; SHAO, Q.; BEERNTSEN, B. T.; ZHANG, P.; WANG, C.; LING, E. Transcriptional profiling of midgut immunity response and degeneration in the wandering silkworm, *Bombyx mori*. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. e43769, 2012.

YAKOVLEV, G. I.; SORRENTINO, S.; MOISEYEV, G. P.; LIBONATI, M. Double-stranded RNA: the variables controlling its degradation by RNases. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 33, p. 106-108, 1995.

YAMEY, G. Scientists unveil first draft of human genome. **BMJ**, v. 321, n. 7252, p. 7, 2000.

YANG, Y.; ZHU, Y. C.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, B. R.; ABEL, C.; HUANG, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 8, p. 592-603, 2010.

YEUNG, M. L.; BENNASSER, Y.; LE, S. Y.; JEANG, K. T. siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. **Cell Research**, v. 15, n. 11-12, p. 935-46, 2005.

YU, N.; CHRISTIAENS, O.; LIU, J.; NIU, J.; CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, p. 1-11, 2012.

ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. **Plos One**, v. 6, n. 5, p. e20504, 2011.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1021-1024, 1999.

ZHANG, S.-Z.; YANG, B.-P.; FENG, C.-L.; CHEN, R.-K.; LUO, J.-P.; CAI, W.-W.; LIU, F.-H. Expression of the *Grifola frondosa* Trehalose Synthase Gene and Improvement of Drought-Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 4, p. 453-459, 2006.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA, L. 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 & Differentiation**, v. 12, n. 11, p. 1407-1416, 2005.

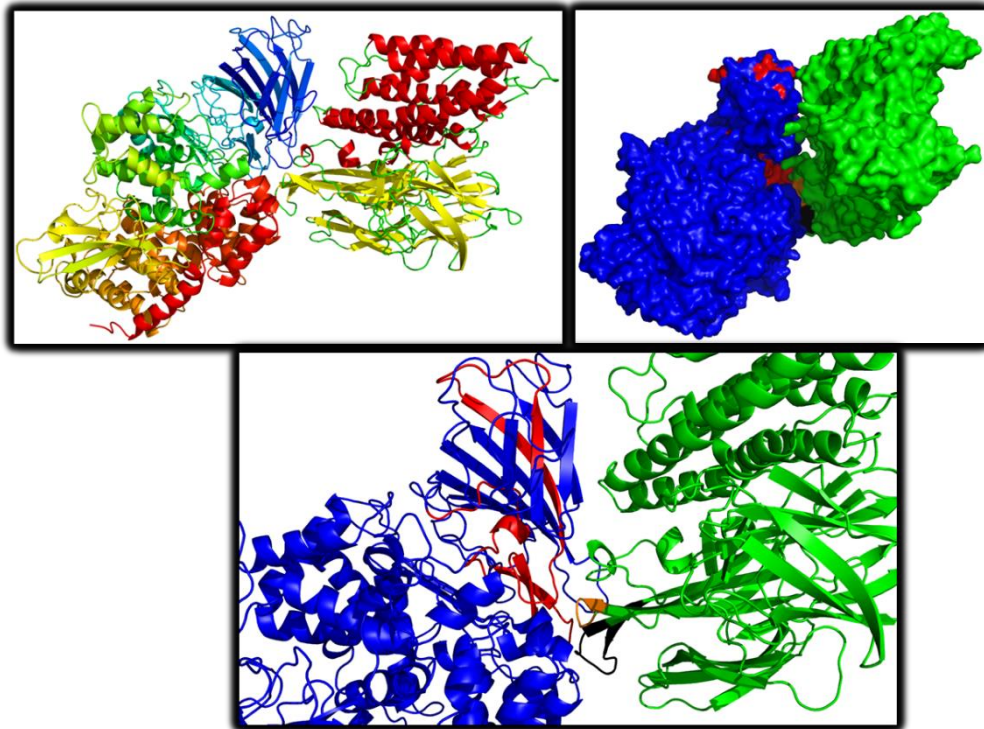
ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005.

ZHOU, X.; WHEELER, M. M.; OI, F. M.; SCHARF, M. E. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 8, p. 805-815, 2008.

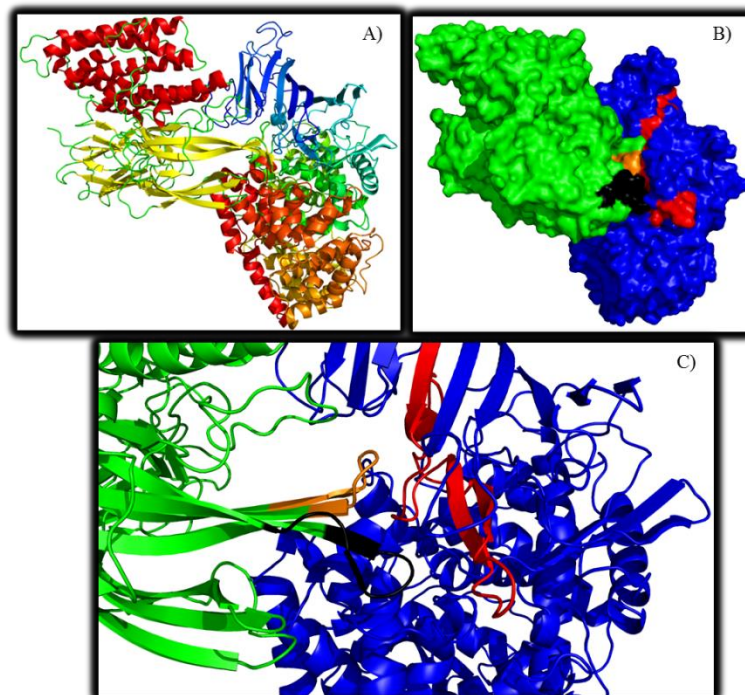
ZHU, F.; XU, J.; PALLI, R.; FERGUSON, J.; PALLI, S. R. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 2, p. 175-182, 2011.

ZHULIDOV, P. A.; BOGDANOVA, E. A.; SHCHEGLOV, A. S.; VAGNER, L. L.; KHASPEKOV, G. L.; KOZHEMYAKO, V. B.; MATZ, M. V.; MELESHKEVITCH, E.; MOROZ, L. L.; LUKYANOV, S. A.; SHAGIN, D. A. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 1-8, 2004.

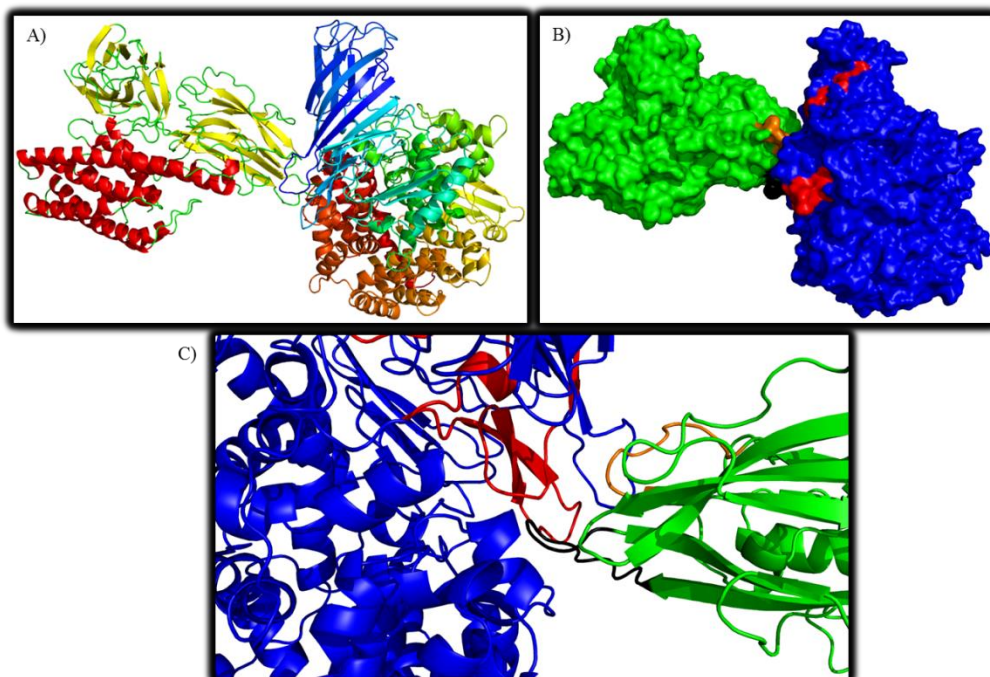
Apêndices



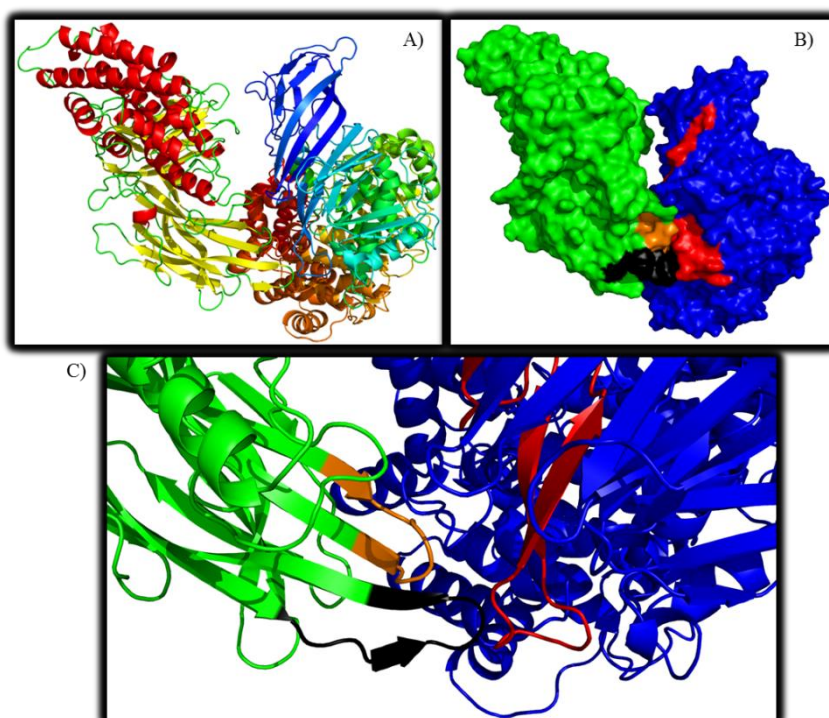
Apêndice I. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Aa à APN1TI. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem representada pela superfície das proteínas (azul: APN1TI; verde: Cry1Aa; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.



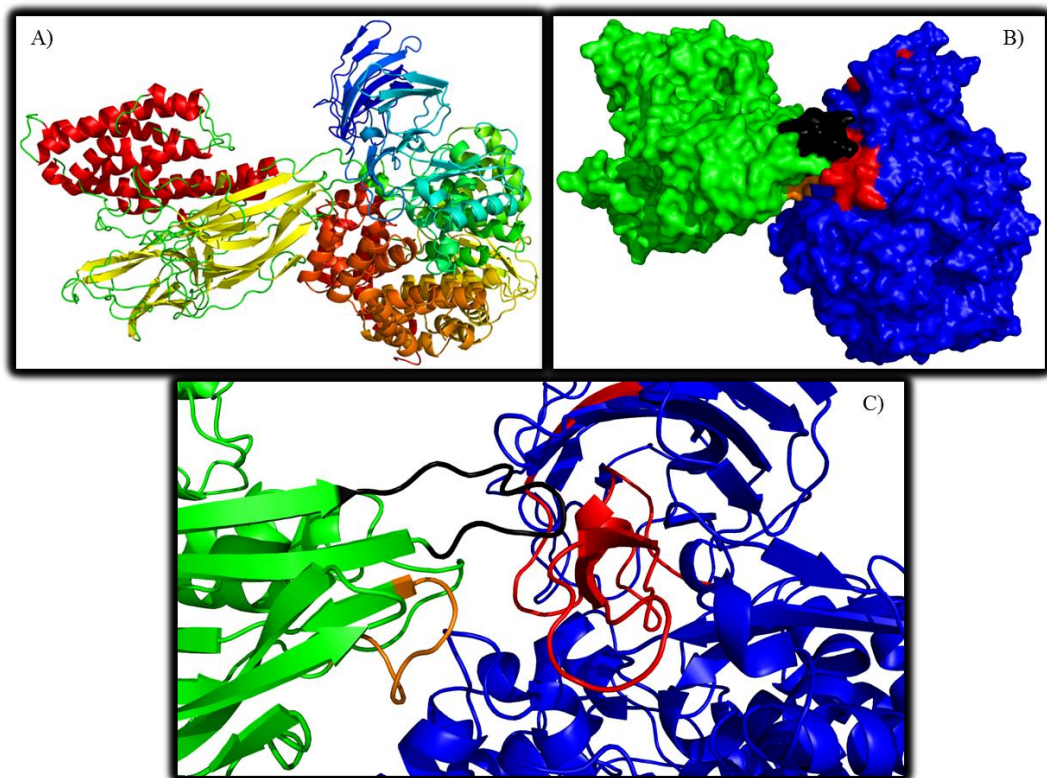
Apêndice II. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN1TI. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem representada pela superfície das proteínas (azul: APN1TI; verde: Cry1Ab; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.



Apêndice III. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN1TI. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem representada pela superfície das proteínas (azul: APN1TI; verde: Cry1Ac; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.



Apêndice IV. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ab à APN3TI. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem representada pela superfície das proteínas (azul: APN3TI; verde: Cry1Ab; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.



Apêndice V. Representação esquemática da ligação da toxina Cry1Ac à APN3T1. A) Visão geral da ligação. B) Mesma imagem representada pela superfície das proteínas (azul: APN3T1; verde: Cry1Ac; vermelho: região de ligação; preto: alça 2 e laranja: alça3). C) Aproximação da imagem para detalhar a interação entre as proteínas.

Anexos

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t566 Chains A } { B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->															
Atom	Atom	Res	Res	Atom	Atom	Res	Res	Chain	Distance										
no.	no.	name	name	no.	no.	name	name												
1.	1370	NH2	ARG 139	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	2.70	37.	1370	NH2	ARG 139	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	2.70
2.	1426	OD1	ASP 144	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	2.74	38.	1370	NH2	ARG 139	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.47
3.	1427	OD2	ASP 144	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	2.73	39.	1425	CG	ASP 144	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	3.13
4.	1455	O	THR 146	A	<-->	3349	N LEU 371	B	2.98	40.	1426	OD1	ASP 144	A	<-->	3305	CZ ARG 367	B	3.90
5.	1451	OG1	THR 146	A	<-->	3303	NE ARG 367	B	3.01	41.	1426	OD1	ASP 144	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	2.74
6.	1461	N	LYS 148	A	<-->	3357	O LEU 371	B	2.71	42.	1427	OD2	ASP 144	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	2.73
7.	1480	NE	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	2.83	43.	1446	O	ARG 145	A	<-->	2819	N PHE 313	B	3.63
8.	1486	NH2	ARG 149	A	<-->	3330	O ARG 368	B	2.63	44.	1446	O	ARG 145	A	<-->	2822	CB PHE 313	B	3.24
9.	1500	NE1	TRP 150	A	<-->	3393	O ASN 376	B	2.81	45.	1455	O	THR 146	A	<-->	3342	CA ILE 370	B	3.90
10.	1834	CE1	GLU 184	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	2.75	46.	1455	O	THR 146	A	<-->	3343	CB ILE 370	B	3.69
11.	1835	CE2	GLU 184	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	2.82	47.	1455	O	THR 146	A	<-->	3349	N LEU 371	B	2.98
12.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	3323	NH1 ARG 368	B	2.80	48.	1455	O	THR 146	A	<-->	3351	CA LEU 371	B	3.68
13.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	2.76	49.	1455	O	THR 146	A	<-->	3356	C LEU 371	B	3.30
14.	1850	OD2	ASP 186	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	2.75	50.	1455	O	THR 146	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.43
15.	2246	NE2	HIS 228	A	<-->	3320	NE ARG 368	B	3.14	51.	1455	O	THR 146	A	<-->	3358	N GLY 372	B	3.66
16.	2472	OD1	ASN 249	A	<-->	3306	NH1 ARG 367	B	2.69	52.	1450	CB	THR 146	A	<-->	3343	CB ILE 370	B	3.68
17.	7480	ND2	ASN 757	A	<-->	2818	O GLY 312	B	3.01	53.	1450	CB	THR 146	A	<-->	3344	CG2 ILE 370	B	3.47
18.	7857	OD1	ASP 797	A	<-->	2806	NH1 ARG 311	B	2.75	54.	1451	OG1	THR 146	A	<-->	3300	CB ARG 367	B	3.78

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->															
Atom	Atom	Res	Res	Atom	Atom	Res	Res	Chain	Distance										
no.	no.	name	name	no.	no.	name	name												
1.	375	O	PRO 36	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	3.86	64.	1458	CA	GLY 147	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.03
2.	378	CA	ALA 37	A	<-->	2494	CD ARG 281	B	3.83	65.	1458	CA	GLY 147	A	<-->	3360	CA GLY 372	B	3.63
3.	380	C	ALA 37	A	<-->	4032	CE1 TYR 445	B	3.70	66.	1459	CD	GLY 147	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.26
4.	380	C	ALA 37	A	<-->	4035	CZ TYR 445	B	3.53	67.	1461	N	LYS 148	A	<-->	3356	C LEU 371	B	3.86
5.	380	C	ALA 37	A	<-->	4036	OH TYR 445	B	3.48	68.	1461	N	LYS 148	A	<-->	3357	O LEU 371	B	2.71
6.	381	O	ALA 37	A	<-->	4031	CD1 TYR 445	B	3.66	69.	1463	CA	LYS 148	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.62
7.	381	O	ALA 37	A	<-->	4032	CE1 TYR 445	B	3.17	70.	1472	C	LYS 148	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.68
8.	381	O	ALA 37	A	<-->	4035	CZ TYR 445	B	3.44	71.	1473	O	LYS 148	A	<-->	3357	O LEU 371	B	3.56
9.	381	O	ALA 37	A	<-->	4036	OH TYR 445	B	3.78	72.	1473	O	LYS 148	A	<-->	3352	CB LEU 371	B	3.81
10.	379	CB	ALA 37	A	<-->	2504	C ARG 281	B	3.68	73.	1478	CG	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	3.70
11.	379	CB	ALA 37	A	<-->	2505	O ARG 281	B	3.41	74.	1478	CG	ARG 149	A	<-->	3349	N LEU 371	B	3.86
12.	379	CB	ALA 37	A	<-->	2492	CB ARG 281	B	3.84	75.	1479	CD	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	3.71
13.	379	CB	ALA 37	A	<-->	2493	CG ARG 281	B	3.71	76.	1479	CD	ARG 149	A	<-->	3342	CA ILE 370	B	3.86
14.	379	CB	ALA 37	A	<-->	4034	CE2 TYR 445	B	3.76	77.	1480	NE	ARG 149	A	<-->	3330	O ARG 368	B	3.34
15.	382	N	GLY 38	A	<-->	2497	CZ ARG 281	B	3.50	78.	1480	NE	ARG 149	A	<-->	3338	C ILE 369	B	3.54
16.	382	N	GLY 38	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	3.04	79.	1480	NE	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	2.83
17.	382	N	GLY 38	A	<-->	4036	OH TYR 445	B	3.50	80.	1480	NE	ARG 149	A	<-->	3342	CA ILE 370	B	3.71
18.	384	CA	GLY 38	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	3.67	81.	1482	CZ	ARG 149	A	<-->	3330	O ARG 368	B	3.31
19.	384	CA	GLY 38	A	<-->	4036	OH TYR 445	B	3.55	82.	1482	CZ	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	3.68
20.	419	CA	THR 43	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.51	83.	1483	NH1	ARG 149	A	<-->	3309	NH2 ARG 367	B	3.22
21.	424	C	THR 43	A	<-->	3387	CG ASN 376	B	3.82	84.	1486	NH2	ARG 149	A	<-->	3329	C ARG 368	B	3.81
22.	424	C	THR 43	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.46	85.	1486	NH2	ARG 149	A	<-->	3330	O ARG 368	B	2.63
23.	425	O	THR 43	A	<-->	3386	CB ASN 376	B	3.24	86.	1486	NH2	ARG 149	A	<-->	3339	O ILE 369	B	3.70
24.	425	O	THR 43	A	<-->	3387	CG ASN 376	B	2.77	87.	1499	CD1	TRP 150	A	<-->	3393	O ASN 376	B	3.88
25.	425	O	THR 43	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	3.27	88.	1499	CD1	TRP 150	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.32
26.	425	O	THR 43	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	2.66	89.	1500	NE1	TRP 150	A	<-->	3392	C ASN 376	B	3.89
27.	421	OG1	THR 43	A	<-->	3397	CB ASN 377	B	3.87	90.	1500	NE1	TRP 150	A	<-->	3393	O ASN 376	B	2.81
28.	423	CG2	THR 43	A	<-->	3382	O PRO 375	B	3.33	91.	1500	NE1	TRP 150	A	<-->	3387	CG ASN 376	B	3.58
29.	423	CG2	THR 43	A	<-->	3386	CB ASN 376	B	3.79	92.	1500	NE1	TRP 150	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	2.73
30.	423	CG2	THR 43	A	<-->	3394	N ASN 377	B	3.45	93.	1497	CE2	TRP 150	A	<-->	3393	O ASN 376	B	3.66
31.	1366	CZ	ARG 139	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	3.59	94.	1497	CE2	TRP 150	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	3.88
32.	1366	CZ	ARG 139	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.70	95.	1497	CE2	TRP 150	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.46
33.	1367	NH1	ARG 139	A	<-->	3387	CG ASN 376	B	3.75	96.	1502	CG2	TRP 150	A	<-->	3355	CD2 LEU 371	B	3.70
34.	1367	NH1	ARG 139	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	3.64	97.	1502	CG2	TRP 150	A	<-->	3393	O ASN 376	B	3.90
35.	1367	NH1	ARG 139	A	<-->	3389	ND2 ASN 376	B	3.25	98.	1502	CG2	TRP 150	A	<-->	3388	OD1 ASN 376	B	3.83
36.	1370	NH2	ARG 139	A	<-->	3387	CG ASN 376	B	3.45	99.	1833	CD	GLU 184	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	3.77
										100.	1833	CD	GLU 184	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	3.34
										101.	1834	OE1	GLU 184	A	<-->	2497	CZ ARG 281	B	3.77
										102.	1834	OE1	GLU 184	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	2.75
										103.	1835	OE2	GLU 184	A	<-->	2497	CZ ARG 281	B	3.42
										104.	1835	OE2	GLU 184	A	<-->	2498	NH1 ARG 281	B	2.82
										105.	1835	OE2	GLU 184	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	3.13
										106.	1844	N	ASP 186	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	3.35
										107.	1846	CA	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	3.56
										108.	1851	C	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	3.76
										109.	1852	O	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	3.78
										110.	1847	CB	ASP 186	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	3.47
										111.	1847	CB	ASP 186	A	<-->	3322	CZ ARG 368	B	3.90
										112.	1847	CB	ASP 186	A	<-->	3323	NH1 ARG 368	B	3.81
										113.	1847	CB	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	3.27

114.	1848	CG	ASP 186	A	<-->	2473	OG SER 279	B	3.35
115.	1848	CG	ASP 186	A	<-->	2501	NH2 ARG 281	B	3.51
116.	1848	CG	ASP 186	A	<-->	3323	NH1 ARG 368	B	3.50
117.	1848	CG	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	3.44
118.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	2473	OG SER 279	B	2.95
119.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	3322	CZ ARG 368	B	3.22
120.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	3323	NH1 ARG 368	B	2.80
121.	1849	OD1	ASP 186	A	<-->	3326	NH2 ARG 368	B	2.76
122.	1850	OD2	ASP 186						

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t567 Chains A } { B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->				Distance				
Atom no.	Atom name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res no.	Chain					
1.	381	O	ALA	37	A	<-->	3329	NH1	ARG	337	B	2.65
2.	381	O	ALA	37	A	<-->	3332	NH2	ARG	337	B	2.86
3.	399	OG	SER	40	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	2.69
4.	417	N	THR	43	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	2.90
5.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4032	O	ASN	410	B	2.97
6.	430	OG1	THR	44	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	2.62
7.	1370	NH2	ARG	139	A	<-->	2500	O	ARG	249	B	2.72
8.	1461	N	LYS	148	A	<-->	4001	O	GLY	407	B	2.88
9.	1473	O	LYS	148	A	<-->	4014	N	SER	409	B	3.25
10.	1468	NZ	LYS	148	A	<-->	2513	O	SER	251	B	2.61
11.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	2.88
12.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	3395	OD1	ASN	344	B	2.68
13.	1500	NE1	TRP	150	A	<-->	4021	O	SER	409	B	2.75
14.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	3362	ND2	ASN	340	B	2.97
15.	6539	O	ASP	661	A	<-->	5135	OG	SER	525	B	2.71
16.	6545	O	ALA	662	A	<-->	5482	ND2	ASN	563	B	3.18
17.	6558	ND2	ASN	664	A	<-->	5457	OD1	ASN	560	B	2.93
18.	7346	NE	ARG	745	A	<-->	4430	OG	SER	452	B	2.96
19.	7357	N	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	2.97
20.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4456	N	VAL	456	B	3.01
21.	7389	O	ALA	749	A	<-->	3029	OH	TYR	306	B	2.75
22.	7484	O	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	2.86
23.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3033	N	GLY	307	B	3.33
24.	7686	NE	ARG	779	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.85
25.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	2.89
26.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	2.82
27.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.70
28.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	4569	NH1	ARG	469	B	2.77
29.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	2.73
30.	7713	NE2	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.94
31.	8356	NH1	ARG	849	A	<-->	5138	O	SER	525	B	2.65
32.	8356	NH1	ARG	849	A	<-->	5135	OG	SER	525	B	3.34
33.	8359	NH2	ARG	849	A	<-->	5135	OG	SER	525	B	2.66

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->				Distance				
Atom no.	Atom name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res no.	Chain					
1.	325	CD2	TYR	31	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.80
2.	326	CE2	TYR	31	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.27
3.	380	C	ALA	37	A	<-->	3328	CZ	ARG	337	B	3.89
4.	380	C	ALA	37	A	<-->	3329	NH1	ARG	337	B	3.64
5.	380	C	ALA	37	A	<-->	3332	NH2	ARG	337	B	3.43

6.	381	O	ALA	37	A	<-->	3328	CZ	ARG	337	B	3.12
7.	381	O	ALA	37	A	<-->	3329	NH1	ARG	337	B	2.65
8.	381	O	ALA	37	A	<-->	3332	NH2	ARG	337	B	2.86
9.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3328	CZ	ARG	337	B	3.50
10.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3329	NH1	ARG	337	B	3.57
11.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3332	NH2	ARG	337	B	3.52
12.	398	CB	SER	40	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	3.89
13.	399	OG	SER	40	A	<-->	2492	CZ	ARG	249	B	3.69
14.	399	OG	SER	40	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	2.69
15.	408	N	LEU	42	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.08
16.	410	CA	LEU	42	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.41
17.	415	C	LEU	42	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.62
18.	411	CB	LEU	42	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.34
19.	417	N	THR	43	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.48
20.	417	N	THR	43	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	2.90
21.	419	CA	THR	43	A	<-->	4031	C	ASN	410	B	3.55
22.	419	CA	THR	43	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.51
23.	419	CA	THR	43	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.79
24.	424	C	THR	43	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.90
25.	425	O	THR	43	A	<-->	2500	O	ARG	249	B	3.67
26.	425	O	THR	43	A	<-->	2487	CB	ARG	249	B	3.09
27.	425	O	THR	43	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.79
28.	420	CB	THR	43	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	3.72
29.	420	CB	THR	43	A	<-->	4031	C	ASN	410	B	3.52
30.	420	CB	THR	43	A	<-->	4032	O	ASN	410	B	3.47
31.	420	CB	THR	43	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.84
32.	420	CB	THR	43	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.71
33.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4031	C	ASN	410	B	3.29
34.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4032	O	ASN	410	B	2.97
35.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.44
36.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4035	CA	SER	411	B	3.86
37.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4036	CB	SER	411	B	3.15
38.	421	OG1	THR	43	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	2.62
39.	423	CG2	THR	43	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.71
40.	423	CG2	THR	43	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	3.52
41.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4024	CA	ASN	410	B	3.84
42.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4031	C	ASN	410	B	3.55
43.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4032	O	ASN	410	B	3.29
44.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4025	CB	ASN	410	B	3.61
45.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4026	CG	ASN	410	B	3.56
46.	423	CG2	THR	43	A	<-->	4027	OD1	ASN	410	B	3.18
47.	428	CA	THR	44	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.89
48.	429	CB	THR	44	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	3.89
49.	430	OG1	THR	44	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.82
50.	430	OG1	THR	44	A	<-->	2492	CZ	ARG	249	B	3.74
51.	430	OG1	THR	44	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	2.62
52.	443	CE2	PHE	45	A	<-->	2500	O	ARG	249	B	3.74
53.	1366	CZ	ARG	139	A	<-->	2500	O	ARG	249	B	3.79
54.	1370	NH2	ARG	139	A	<-->	2499	C	ARG	249	B	3.88
55.	1370	NH2	ARG	139	A	<-->	2500	O	ARG	249	B	2.72
56.	1446	O	ARG	145	A	<-->	3988	O	ARG	405	B	3.77
57.	1446	O	ARG	145	A	<-->	3976	CG	ARG	405	B	3.57
58.	1446	O	ARG	145	A	<-->	3977	CD	ARG	405	B	3.37
59.	1454	C	THR	146	A	<-->	3995	C	SER	406	B	3.78
60.	1454	C	THR	146	A	<-->	3996	O	SER	406	B	3.72
61.	1455	O	THR	146	A	<-->	3996	O	SER	406	B	3.86
62.	1455	O	THR	146	A	<-->	3997	N	GLY	407	B	3.88
63.	1455	O	THR	146	A	<-->	3999	CA	GLY	407	B	3.53
64.	1455	O	THR	146	A	<-->	4000	C	GLY	407	B	3.29
65.	1455	O	THR	146	A	<-->	4001	O	GLY	407	B	3.74
66.	1455	O	THR	146	A	<-->	4002	N	PHE	408	B	3.36

Anexo II. Interações formadas entre Cry1Ab e APN1Ms. Cadeia A (APN1Ms). Cadeia B (Cry1Ab).

189.	6548	CA	ALA	663	A	<-->	5481	OD1	ASN	563	B	3.64	250.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3980	CZ	ARG	405	B	2.91
190.	6548	CA	ALA	663	A	<-->	5482	ND2	ASN	563	B	3.84	251.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.40
191.	6549	CB	ALA	663	A	<-->	5481	OD1	ASN	563	B	3.71	252.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3984	NH2	ARG	405	B	2.87
192.	6549	CB	ALA	663	A	<-->	5482	ND2	ASN	563	B	3.77	253.	7480	ND2	ASN	757	A	<-->	3024	CD1	TYR	306	B	3.83
193.	6552	N	ASN	664	A	<-->	5481	OD1	ASN	563	B	3.48	254.	7521	CG1	ILE	760	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.13
194.	6555	CB	ASN	664	A	<-->	5456	CG	ASN	560	B	3.37	255.	7529	CG1	VAL	761	A	<-->	3980	CZ	ARG	405	B	3.61
195.	6555	CB	ASN	664	A	<-->	5457	OD1	ASN	560	B	3.25	256.	7529	CG1	VAL	761	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.24
196.	6555	CB	ASN	664	A	<-->	5458	ND2	ASN	560	B	3.27	257.	7529	CG1	VAL	761	A	<-->	3984	NH2	ARG	405	B	3.87
197.	6556	CG	ASN	664	A	<-->	5457	OD1	ASN	560	B	3.61	258.	7696	O	ARG	779	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	3.73
198.	6558	ND2	ASN	664	A	<-->	5456	CG	ASN	560	B	3.83	259.	7685	CD	ARG	779	A	<-->	5475	O	GLY	562	B	3.49
199.	6558	ND2	ASN	664	A	<-->	5457	OD1	ASN	560	B	2.93	260.	7686	NE	ARG	779	A	<-->	5475	O	GLY	562	B	3.25
200.	7355	C	ARG	745	A	<-->	4447	O	THR	454	B	3.89	261.	7686	NE	ARG	779	A	<-->	5491	CG	GLU	564	B	3.79
201.	7343	CB	ARG	745	A	<-->	4428	CA	SER	452	B	3.49	262.	7686	NE	ARG	779	A	<-->	5492	CD	GLU	564	B	3.69
202.	7343	CB	ARG	745	A	<-->	4429	CB	SER	452	B	3.87	263.	7686	NE	ARG	779	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.85
203.	7343	CB	ARG	745	A	<-->	4430	OG	SER	452	B	3.87	264.	7688	CZ	ARG	779	A	<-->	4597	CB	THR	471	B	3.61
204.	7343	CB	ARG	745	A	<-->	4434	N	GLY	453	B	3.68	265.	7688	CZ	ARG	779	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	3.27
205.	7345	CD	ARG	745	A	<-->	4420	O	LEU	450	B	3.70	266.	7688	CZ	ARG	779	A	<-->	4600	CG2	THR	471	B	3.74
206.	7345	CD	ARG	745	A	<-->	4418	CD2	LEU	450	B	3.57	267.	7688	CZ	ARG	779	A	<-->	5475	O	GLY	562	B	3.25
207.	7346	NE	ARG	745	A	<-->	4420	O	LEU	450	B	3.42	268.	7688	CZ	ARG	779	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	3.20
208.	7346	NE	ARG	745	A	<-->	4426	N	SER	452	B	3.89	269.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	4597	CB	THR	471	B	3.29
209.	7346	NE	ARG	745	A	<-->	4430	OG	SER	452	B	2.96	270.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	2.89
210.	7348	CZ	ARG	745	A	<-->	4430	OG	SER	452	B	3.75	271.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	5473	CA	GLY	562	B	3.79
211.	7352	NH2	ARG	745	A	<-->	4430	OG	SER	452	B	3.69	272.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	5474	C	GLY	562	B	3.90
212.	7357	N	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	2.97	273.	7689	NH1	ARG	779	A	<-->	5475	O	GLY	562	B	3.24
213.	7359	CA	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	3.56	274.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4566	NE	ARG	469	B	3.44
214.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	3.79	275.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4568	CZ	ARG	469	B	3.69
215.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4450	CA	SER	455	B	2.99	276.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	3.80
216.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4454	C	SER	455	B	3.47	277.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4597	CB	THR	471	B	3.29
217.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4451	CB	SER	455	B	3.49	278.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	2.82
218.	7370	O	TYR	746	A	<-->	4456	N	VAL	456	B	3.01	279.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	4600	CG2	THR	471	B	3.09
219.	7360	CB	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	3.51	280.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	5491	CG	GLU	564	B	3.89
220.	7360	CB	TYR	746	A	<-->	4450	CA	SER	455	B	3.77	281.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	5492	CD	GLU	564	B	3.61
221.	7360	CB	TYR	746	A	<-->	4451	CB	SER	455	B	3.49	282.	7692	NH2	ARG	779	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.70
222.	7360	CB	TYR	746	A	<-->	4452	OG	SER	455	B	3.07	283.	7711	CD	GLN	781	A	<-->	4569	NH1	ARG	469	B	3.28
223.	7361	CG	TYR	746	A	<-->	4452	OG	SER	455	B	3.71	284.	7711	CD	GLN	781	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	3.79
224.	7364	CD2	TYR	746	A	<-->	4447	O	THR	454	B	3.85	285.	7711	CD	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	3.78
225.	7364	CD2	TYR	746	A	<-->	4452	OG	SER	455	B	3.47	286.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	4568	CZ	ARG	469	B	3.15
226.	7365	CE2	TYR	746	A	<-->	4598	OG1	THR	471	B	3.86	287.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	4569	NH1	ARG	469	B	2.77
227.	7388	C	ALA	749	A	<-->	3029	OH	TYR	306	B	3.87	288.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	2.73
228.	7389	O	ALA	749	A	<-->	3025	CE1	TYR	306	B	3.55	289.	7712	OE1	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	3.82
229.	7389	O	ALA	749	A	<-->	3028	CZ	TYR	306	B	3.25	290.	7713	NE2	GLN	781	A	<-->	4569	NH1	ARG	469	B	3.20
230.	7389	O	ALA	749	A	<-->	3029	OH	TYR	306	B	2.75	291.	7713	NE2	GLN	781	A	<-->	5492	CD	GLU	564	B	3.31
231.	7392	CA	GLU	750	A	<-->	3029	OH	TYR	306	B	3.77	292.	7713	NE2	GLN	781	A	<-->	5493	OE1	GLU	564	B	3.13
232.	7393	CB	GLU	750	A	<-->	2999	CE2	PHE	303	B	3.79	293.	7713	NE2	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	2.94
233.	7394	CG	GLU	750	A	<-->	2978	CE2	PHE	301	B	3.82	294.	7714	HE21	GLN	781	A	<-->	5492	CD	GLU	564	B	3.66
234.	7397	OE2	GLU	750	A	<-->	2978	CE2	PHE	301	B	3.58	295.	7714	HE21	GLN	781	A	<-->	5493	OE1	GLU	564	B	3.41
235.	7397	OE2	GLU	750	A	<-->	2979	CZ	PHE	301	B	3.54	296.	7714	HE21	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	3.52
236.	7426	OD1	ASN	753	A	<-->	3023	CG	TYR	306	B	3.85	297.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	4568	CZ	ARG	469	B	3.43
237.	7426	OD1	ASN	753	A	<-->	3024	CD1	TYR	306	B	2.98	298.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	4569	NH1	ARG	469	B	2.66
238.	7426	OD1	ASN	753	A	<-->	3025	CE1	TYR	306	B	3.31	299.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	4572	NH2	ARG	469	B	3.84
239.	7439	CD2	TYR	754	A	<-->	3006	CB	PRO	304	B	3.57	300.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	5491	CG	GLU	564	B	3.72
240.	7439	CD2	TYR	754	A	<-->	3007	CG	PRO	304	B	3.65	301.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	5492	CD	GLU	564	B	2.33
241.	7476	CA	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.53	302.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	5493	OE1	GLU	564	B	2.27
242.	7483	C	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.46	303.	7715	HE22	GLN	781	A	<-->	5494	OE2	GLU	564	B	1.98
243.	7484	O	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	2.86	304.	8355	CZ	ARG	849	A	<-->	5138	O	SER	525	B	3.53
244.	7477	CB	ASN	757	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	3.83	305.	8355	CZ	ARG	849	A	<-->	5135	OG	SER	525	B	3.40
245.	7477	CB	ASN	757	A	<-->	3984	NH2	ARG	405	B	3.62	306.	8356	NH1	ARG	849	A	<-->	5137	C	SER	525	B	3.56
246.	7478	CG	ASN	757	A	<-->	3980	CZ	ARG	405	B	3.78	307.	8356	NH1	ARG	849	A	<-->	5138	O	SER	525	B	2.65
247.	7478	CG	ASN	757	A	<-->	3984	NH2	ARG	405	B	3.60	308.	8356	NH1	ARG	849	A	<-->	5135	OG	SER	525	B	3.34
248.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3033	N	GLY	307	B	3.33	309.	8359	NH2	ARG	849	A	<-->	5137	C	SER	525	B	3.86
249.	7479	OD1	ASN	757	A	<-->	3978	NE	ARG	405	B	3.33	310.	8359	NH2	ARG	849	A	<-->	5138	O	SER	525	B	3.63

311. 8359 NH2 ARG 849 A <--> 5134 CB SER 525 B 3.81
312. 8359 NH2 ARG 849 A <--> 5135 OG SER 525 B 2.66

Number of hydrogen bonds: 33

Number of non-bonded contacts: 312

Anexo II. Continuação.

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

FDB code: t309 Chains A } { B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->				Distance				
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name		Res no.	Chain		
1.	394	O	VAL	39	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	2.68
2.	1409	OH	TYR	142	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	2.84
3.	1439	NH1	ARG	145	A	<-->	3060	O	GLY	307	B	2.60
4.	1461	N	LYS	148	A	<-->	4024	O	GLY	407	B	2.89
5.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	2.80
6.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	2.75
7.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4063	O	SER	411	B	2.90
8.	1506	O	TRP	150	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	2.86
9.	1835	OE2	GLU	184	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	2.74
10.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.84
11.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	2.73
12.	2271	NE2	GLN	230	A	<-->	3089	OD1	ASN	311	B	3.30
13.	7185	O	GLY	728	A	<-->	3009	OG1	THR	302	B	2.81
14.	7389	O	ALA	749	A	<-->	2618	OG	SER	261	B	2.75
15.	7442	OH	TYR	754	A	<-->	3052	OH	TYR	306	B	2.71
24.	384	CA	GLY	38	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.64
25.	385	C	GLY	38	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.88
26.	385	C	GLY	38	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.41
27.	385	C	GLY	38	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.07
28.	386	O	GLY	38	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.58
29.	386	O	GLY	38	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	2.88
30.	386	O	GLY	38	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.04
31.	386	O	GLY	38	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	2.87
32.	387	N	VAL	39	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.45
33.	393	C	VAL	39	A	<-->	2503	NH2	ASN	249	B	3.29
34.	394	O	VAL	39	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.79
35.	394	O	VAL	39	A	<-->	2503	NH2	ASN	249	B	2.68
36.	395	N	SER	40	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.88
37.	423	CG2	THR	43	A	<-->	2507	O	ARG	249	B	3.84
38.	423	CG2	THR	43	A	<-->	2510	CA	GLY	250	B	3.82
39.	1407	CE2	TYR	142	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	3.58
40.	1408	CZ	TYR	142	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	3.35
41.	1409	OH	TYR	142	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	2.84
42.	1446	O	ARG	145	A	<-->	3994	O	PHE	404	B	3.53
43.	1446	O	ARG	145	A	<-->	3997	CA	ARG	405	B	3.51
44.	1435	CD	ARG	145	A	<-->	3060	O	GLY	307	B	3.50
45.	1435	CD	ARG	145	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.86
46.	1436	NE	ARG	145	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.85
47.	1438	CZ	ARG	145	A	<-->	3060	O	GLY	307	B	3.63
48.	1439	NH1	ARG	145	A	<-->	3059	C	GLY	307	B	3.64
49.	1439	NH1	ARG	145	A	<-->	3060	O	GLY	307	B	2.60
50.	1439	NH1	ARG	145	A	<-->	3063	CA	THR	308	B	3.69
51.	1449	CA	THR	146	A	<-->	4012	N	SER	406	B	3.68
52.	1449	CA	THR	146	A	<-->	4016	OG	SER	406	B	3.56
53.	1454	C	THR	146	A	<-->	4012	N	SER	406	B	3.75
54.	1454	C	THR	146	A	<-->	4019	O	SER	406	B	3.87
55.	1455	O	THR	146	A	<-->	4018	C	SER	406	B	3.68
56.	1455	O	THR	146	A	<-->	4019	O	SER	406	B	3.20
57.	1455	O	THR	146	A	<-->	4016	OG	SER	406	B	3.79
58.	1455	O	THR	146	A	<-->	4024	O	GLY	407	B	3.81
59.	1450	CB	THR	146	A	<-->	4016	OG	SER	406	B	3.06
60.	1453	CG2	THR	146	A	<-->	4016	OG	SER	406	B	3.29
61.	1456	N	GLY	147	A	<-->	3999	OG	ARG	405	B	3.67
62.	1456	N	GLY	147	A	<-->	4012	N	SER	406	B	3.79
63.	1458	CA	GLY	147	A	<-->	3999	OG	ARG	405	B	3.64
64.	1458	CA	GLY	147	A	<-->	4024	O	GLY	407	B	3.05
65.	1459	C	GLY	147	A	<-->	4024	O	GLY	407	B	3.47
66.	1461	N	LYS	148	A	<-->	4024	O	GLY	407	B	2.89
67.	1473	O	LYS	148	A	<-->	4027	CA	PHE	408	B	3.73
68.	1473	O	LYS	148	A	<-->	4029	CG	PHE	408	B	3.61
69.	1473	O	LYS	148	A	<-->	4030	CD1	PHE	408	B	2.89
70.	1473	O	LYS	148	A	<-->	4032	CE1	PHE	408	B	3.25
71.	1464	CB	LYS	148	A	<-->	4032	CE1	PHE	408	B	3.57
72.	1464	CB	LYS	148	A	<-->	4034	CZ	PHE	408	B	3.48
73.	1467	CE	LYS	148	A	<-->	4033	CE2	PHE	408	B	3.63
74.	1467	CE	LYS	148	A	<-->	4034	CZ	PHE	408	B	3.72
75.	1477	CB	ARG	149	A	<-->	4048	CB	ASN	410	B	3.87
76.	1477	CB	ARG	149	A	<-->	4049	CG	ASN	410	B	3.86
77.	1478	CG	ARG	149	A	<-->	4043	C	SER	409	B	3.89
78.	1478	CG	ARG	149	A	<-->	4044	O	SER	409	B	3.37
79.	1479	CD	ARG	149	A	<-->	4044	O	SER	409	B	3.71
80.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4044	O	SER	409	B	3.52
81.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4047	CA	ASN	410	B	3.66
82.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4049	CG	ASN	410	B	3.67
83.	1480	NE	ARG	149	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	2.80
84.	1482	CZ	ARG	149	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	3.19

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->				<----- A T O M 2 ----->				Distance				
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name		Res no.	Chain		
1.	374	C	PRO	36	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.70
2.	375	O	PRO	36	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.86
3.	375	O	PRO	36	A	<-->	3381	CA	ASN	340	B	3.33
4.	375	O	PRO	36	A	<-->	3388	C	ASN	340	B	3.89
5.	375	O	PRO	36	A	<-->	3382	CB	ASN	340	B	3.90
6.	375	O	PRO	36	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.45
7.	375	O	PRO	36	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	3.41
8.	375	O	PRO	36	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.88
9.	375	O	PRO	36	A	<-->	3390	N	ILE	341	B	3.38
10.	372	CB	PRO	36	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.58
11.	376	N	ALA	37	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.36
12.	378	CA	ALA	37	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.83
13.	381	O	ALA	37	A	<-->	3456	HE22	GLN	347	B	3.76
14.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3366	O	PRO	338	B	3.27
15.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3369	CA	PHE	339	B	3.67
16.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3377	C	PHE	339	B	3.38
17.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.36
18.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3379	N	ASN	340	B	3.88
19.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3454	NE2	GLN	347	B	3.49
20.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3455	HE21	GLN	347	B	3.13
21.	379	CB	ALA	37	A	<-->	3456	HE22	GLN	347	B	3.28
22.	384	CA	GLY	38	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.71
23.	384	CA	GLY	38	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.79

Anexo III. Interações formadas entre Cry1Ac e APN1Ms. Cadeia A (APN1Ms). Cadeia B (Cry1Ac).

85.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	2.75	146.	1860	CE1	PHE	187	A	<-->	2495	CG	ARG	249	B	3.49
86.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4056	N	SER	411	B	3.60	147.	1860	CE1	PHE	187	A	<-->	4054	C	ASN	410	B	3.62
87.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4062	C	SER	411	B	3.71	148.	1860	CE1	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.17
88.	1486	NH2	ARG	149	A	<-->	4063	O	SER	411	B	2.90	149.	1860	CE1	PHE	187	A	<-->	4058	CA	SER	411	B	3.74
89.	1505	C	TRP	150	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	3.77	150.	1860	CE1	PHE	187	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	3.55
90.	1506	O	TRP	150	A	<-->	4048	CB	ASN	410	B	3.36	151.	1861	CE2	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.28
91.	1506	O	TRP	150	A	<-->	4049	CG	ASN	410	B	3.61	152.	1862	CZ	PHE	187	A	<-->	4045	N	ASN	410	B	3.86
92.	1506	O	TRP	150	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	2.86	153.	1862	CZ	PHE	187	A	<-->	4054	C	ASN	410	B	3.50
93.	1498	CE3	TRP	150	A	<-->	4030	CD1	PHE	408	B	3.51	154.	1862	CZ	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.03
94.	1498	CE3	TRP	150	A	<-->	4032	CE1	PHE	408	B	3.29	155.	1865	N	SER	188	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.33
95.	1503	CZ3	TRP	150	A	<-->	4030	CD1	PHE	408	B	3.27	156.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4054	C	ASN	410	B	3.69
96.	1503	CZ3	TRP	150	A	<-->	4032	CE1	PHE	408	B	3.24	157.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	2.73
97.	1504	CH2	TRP	150	A	<-->	4030	CD1	PHE	408	B	3.62	158.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4048	CB	ASN	410	B	3.63
98.	1833	CD	GLU	184	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.67	159.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4049	CG	ASN	410	B	3.17
99.	1835	OE2	GLU	184	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.47	160.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	3.54
100.	1835	OE2	GLU	184	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.54	161.	1869	OG	SER	188	A	<-->	4051	ND2	ASN	410	B	3.22
101.	1835	OE2	GLU	184	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	2.74	162.	2025	O	GLY	205	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.40
102.	1841	CB	ALA	185	A	<-->	3402	C	GLY	342	B	3.57	163.	2047	CG2	ILE	207	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.86
103.	1841	CB	ALA	185	A	<-->	3403	O	GLY	342	B	3.33	164.	2241	CB	HIS	228	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	3.61
104.	1841	CB	ALA	185	A	<-->	3404	N	ILE	343	B	3.81	165.	2245	CD2	HIS	228	A	<-->	4062	C	SER	411	B	3.55
105.	1841	CB	ALA	185	A	<-->	3406	CA	ILE	343	B	3.87	166.	2245	CD2	HIS	228	A	<-->	4063	O	SER	411	B	3.27
106.	1841	CB	ALA	185	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.88	167.	2245	CD2	HIS	228	A	<-->	4064	N	SER	412	B	3.52
107.	1851	C	ASP	186	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.01	168.	2245	CD2	HIS	228	A	<-->	4066	CA	SER	412	B	3.64
108.	1852	O	ASP	186	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.73	169.	2245	CD2	HIS	228	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.60
109.	1852	O	ASP	186	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	2.77	170.	2246	NE2	HIS	228	A	<-->	4062	C	SER	411	B	3.85
110.	1847	CB	ASP	186	A	<-->	4072	N	VAL	413	B	3.53	171.	2246	NE2	HIS	228	A	<-->	4063	O	SER	411	B	3.27
111.	1847	CB	ASP	186	A	<-->	4074	CA	VAL	413	B	3.50	172.	2246	NE2	HIS	228	A	<-->	4064	N	SER	412	B	3.85
112.	1847	CB	ASP	186	A	<-->	4075	CB	VAL	413	B	3.30	173.	2246	NE2	HIS	228	A	<-->	4066	CA	SER	412	B	3.52
113.	1848	CG	ASP	186	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	3.88	174.	2246	NE2	HIS	228	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.63
114.	1848	CG	ASP	186	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	3.07	175.	2271	NE2	GLN	230	A	<-->	3089	OD1	ASN	311	B	3.30
115.	1848	CG	ASP	186	A	<-->	3439	CG	GLN	346	B	3.88	176.	2272	HE21	GLN	230	A	<-->	3089	OD1	ASN	311	B	3.47
116.	1848	CG	ASP	186	A	<-->	4072	N	VAL	413	B	3.56	177.	2273	HE22	GLN	230	A	<-->	3088	CG	ASN	311	B	3.65
117.	1848	CG	ASP	186	A	<-->	4074	CA	VAL	413	B	3.56	178.	2273	HE22	GLN	230	A	<-->	3089	OD1	ASN	311	B	2.47
118.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	2.80	179.	2462	ND2	ASN	248	A	<-->	4050	OD1	ASN	410	B	3.73
119.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	3439	CG	GLN	346	B	3.87	180.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3064	CB	THR	308	B	3.66
120.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	3440	CD	GLN	346	B	3.85	181.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.37
121.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	3442	NE2	GLN	346	B	3.51	182.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.67
122.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	3443	HE21	GLN	346	B	3.19	183.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.16
123.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4070	C	SER	412	B	3.44	184.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.67
124.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4071	O	SER	412	B	3.88	185.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.16
125.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.24	186.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.69
126.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.65	187.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.71
127.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4072	N	VAL	413	B	3.32	188.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.79
128.	1849	OD1	ASP	186	A	<-->	4074	CA	VAL	413	B	3.75	189.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.29
129.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	2790	CZ	ARG	279	B	3.14	190.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.87
130.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.84	191.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.85
131.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	2.68	192.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.55
132.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	3434	O	ASN	345	B	3.09	193.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.58
133.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	3437	CA	GLN	346	B	3.69	194.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.56
134.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	3438	CB	GLN	346	B	3.69	195.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.88
135.	1850	OD2	ASP	186	A	<-->	3439	CG	GLN	346	B	3.37	196.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.10
136.	1853	N	PHE	187	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.26	197.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	2.97
137.	1855	CA	PHE	187	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.12	198.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.09
138.	1863	C	PHE	187	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.48	199.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.82
139.	1857	CG	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.85	200.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.66
140.	1858	CD1	PHE	187	A	<-->	2495	CG	ARG	249	B	3.81	201.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.24
141.	1858	CD1	PHE	187	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.60	202.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.35
142.	1858	CD1	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.60	203.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.66
143.	1858	CD1	PHE	187	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	3.84	204.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	2.98
144.	1858	CD1	PHE	187	A	<-->	4076	CG1	VAL	413	B	3.42	205.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.62
145.	1859	CD2	PHE	187	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.69	206.	2472	OD1	ASN	249	A	<-->	3067	CG2	THR	308	B	3.49

207.	7185	O	GLY	728	A	<-->	3009	OG1	THR	302	B	2.81
208.	7388	C	ALA	749	A	<-->	2618	OG	SER	261	B	3.49
209.	7389	O	ALA	749	A	<-->	2617	CB	SER	261	B	

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t596 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	2.72
2.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	2.70
3.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1724	NH1	ARG	209	B	2.72
4.	445	O	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	2.61
5.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	2.59
6.	490	O	PHE	48	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	2.73
7.	734	OD2	ASP	74	A	<-->	2533	NE2	GLN	285	B	2.82
8.	996	OE2	GLU	103	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	2.96
9.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2495	NE	ARG	281	B	2.60
10.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	2.67
11.	1307	O	LEU	133	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	2.67
12.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4036	OH	TYR	445	B	2.79
13.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	3424	OE2	GLU	379	B	2.71
14.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	4036	OH	TYR	445	B	2.70
15.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	2809	NH2	ARG	311	B	2.70
16.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	2806	NH1	ARG	311	B	2.80
17.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3367	OG	SER	373	B	2.91
18.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	2.73
19.	7911	NH2	ARG	803	A	<-->	3388	OD1	ASN	376	B	2.60
20.	7911	NH2	ARG	803	A	<-->	3399	OD1	ASN	377	B	2.82
21.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	4007	N	GLY	442	B	2.81
18.	95	CE2	PHE	10	A	<-->	1182	NE2	GLN	154	B	3.52
19.	95	CE2	PHE	10	A	<-->	1183	HE21	GLN	154	B	3.61
20.	95	CE2	PHE	10	A	<-->	1184	HE22	GLN	154	B	3.51
21.	96	CZ	PHE	10	A	<-->	1182	NE2	GLN	154	B	3.58
22.	96	CZ	PHE	10	A	<-->	1183	HE21	GLN	154	B	3.60
23.	96	CZ	PHE	10	A	<-->	1184	HE22	GLN	154	B	3.26
24.	103	CG	GLN	11	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.78
25.	103	CG	GLN	11	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	3.53
26.	104	CD	GLN	11	A	<-->	1811	CD	ARG	217	B	3.83
27.	104	CD	GLN	11	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	3.87
28.	106	NE2	GLN	11	A	<-->	1811	CD	ARG	217	B	3.59
29.	106	NE2	GLN	11	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	3.19
30.	106	NE2	GLN	11	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.39
31.	106	NE2	GLN	11	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.66
32.	107	HE21	GLN	11	A	<-->	1811	CD	ARG	217	B	3.55
33.	107	HE21	GLN	11	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	2.80
34.	107	HE21	GLN	11	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	2.69
35.	107	HE21	GLN	11	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	3.38
36.	107	HE21	GLN	11	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	2.75
37.	108	HE22	GLN	11	A	<-->	1811	CD	ARG	217	B	3.86
38.	108	HE22	GLN	11	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	3.45
39.	418	CA	GLU	42	A	<-->	3336	CG1	ILE	369	B	3.84
40.	424	C	GLU	42	A	<-->	3336	CG1	ILE	369	B	3.83
41.	425	O	GLU	42	A	<-->	3336	CG1	ILE	369	B	3.12
42.	420	CG	GLU	42	A	<-->	3339	O	ILE	369	B	3.62
43.	428	CA	THR	43	A	<-->	3322	CZ	ARG	368	B	3.72
44.	428	CA	THR	43	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.83
45.	428	CA	THR	43	A	<-->	3326	NH2	ARG	368	B	3.82
46.	433	C	THR	43	A	<-->	3322	CZ	ARG	368	B	3.87
47.	433	C	THR	43	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.51
48.	429	CB	THR	43	A	<-->	3326	NH2	ARG	368	B	3.76
49.	435	N	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.30
50.	437	CA	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.83
51.	444	C	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.51
52.	445	O	ASN	44	A	<-->	3322	CZ	ARG	368	B	3.77
53.	445	O	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	2.61
54.	439	CG	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	3.60
55.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	3319	CD	ARG	368	B	3.29
56.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	3320	NE	ARG	368	B	3.89
57.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	3322	CZ	ARG	368	B	3.61
58.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	3323	NH1	ARG	368	B	2.59
59.	489	C	PHE	48	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	3.59
60.	490	O	PHE	48	A	<-->	2497	CZ	ARG	281	B	3.89
61.	490	O	PHE	48	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	2.73
62.	482	CB	PHE	48	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	3.60
63.	723	ND2	ASN	73	A	<-->	2533	NE2	GLN	285	B	3.44
64.	723	ND2	ASN	73	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	3.70
65.	723	ND2	ASN	73	A	<-->	2535	HE22	GLN	285	B	2.94
66.	730	CA	ASP	74	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	3.78
67.	731	CB	ASP	74	A	<-->	2533	NE2	GLN	285	B	3.51
68.	731	CB	ASP	74	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	2.72
69.	731	CB	ASP	74	A	<-->	2535	HE22	GLN	285	B	3.52
70.	732	CG	ASP	74	A	<-->	2533	NE2	GLN	285	B	3.46
71.	732	CG	ASP	74	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	3.05
72.	732	CG	ASP	74	A	<-->	2535	HE22	GLN	285	B	3.05
73.	734	OD2	ASP	74	A	<-->	2533	NE2	GLN	285	B	2.82
74.	734	OD2	ASP	74	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	2.73
75.	734	OD2	ASP	74	A	<-->	2535	HE22	GLN	285	B	2.16
76.	752	CG2	THR	76	A	<-->	1858	O	PRO	221	B	3.60
77.	752	CG2	THR	76	A	<-->	1861	CA	ASP	222	B	3.87
78.	752	CG2	THR	76	A	<-->	1864	OD1	ASP	222	B	3.45

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	1	N	PRO	1	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.11
2.	2	CD	PRO	1	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.85
3.	71	CB	GLU	8	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	3.86
4.	72	CG	GLU	8	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	3.61
5.	73	CD	GLU	8	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	3.38
6.	73	CD	GLU	8	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.73
7.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.13
8.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1815	NH1	ARG	217	B	2.72
9.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	2.70
10.	82	CG	ASP	9	A	<-->	1724	NH1	ARG	209	B	3.76
11.	82	CG	ASP	9	A	<-->	1727	NH2	ARG	209	B	3.18
12.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1723	CZ	ARG	209	B	3.86
13.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1727	NH2	ARG	209	B	2.82
14.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1723	CZ	ARG	209	B	3.18
15.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1724	NH1	ARG	209	B	2.72
16.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1727	NH2	ARG	209	B	2.79
17.	93	CD2	PHE	10	A	<-->	1183	HE21	GLN	154	B	3.88

Anexo IV. Interações formadas entre Cry1Aa e APN1Tl. Cadeia A (APN1Tl). Cadeia B (Cry1Aa).

79.	755	N	ILE	77	A	<-->	1858	O	PRO	221	B	3.80	140.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	4015	CB	ALA	443	B	3.38
80.	763	O	ILE	77	A	<-->	1857	C	PRO	221	B	3.83	141.	1403	NE	ARG	142	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	3.80
81.	763	O	ILE	77	A	<-->	1858	O	PRO	221	B	3.66	142.	1405	CZ	ARG	142	A	<-->	3424	OE2	GLU	379	B	3.78
82.	763	O	ILE	77	A	<-->	1855	CB	PRO	221	B	3.26	143.	1405	CZ	ARG	142	A	<-->	4036	OH	TYR	445	B	3.76
83.	760	CG1	ILE	77	A	<-->	1842	CZ2	TRP	219	B	3.63	144.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	3.84
84.	975	CA	THR	101	A	<-->	1840	NE1	TRP	219	B	3.90	145.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	3335	CG2	ILE	369	B	3.67
85.	979	CG2	THR	101	A	<-->	1839	CD1	TRP	219	B	3.51	146.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	3422	CD	GLU	379	B	3.86
86.	982	N	CYS	102	A	<-->	1840	NE1	TRP	219	B	3.76	147.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	3424	OE2	GLU	379	B	2.71
87.	982	N	CYS	102	A	<-->	1837	CE2	TRP	219	B	3.88	148.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	4036	OH	TYR	445	B	2.70
88.	988	O	CYS	102	A	<-->	1836	CD2	TRP	219	B	3.44	150.	1427	CD2	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.83
89.	988	O	CYS	102	A	<-->	1837	CE2	TRP	219	B	3.68	151.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.86
90.	988	O	CYS	102	A	<-->	1838	CE3	TRP	219	B	3.41	152.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3399	OD1	ASN	377	B	3.90
91.	988	O	CYS	102	A	<-->	1842	CZ2	TRP	219	B	3.87	153.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.86
92.	988	O	CYS	102	A	<-->	1843	CZ3	TRP	219	B	3.61	154.	1433	CZ2	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.63
93.	988	O	CYS	102	A	<-->	1844	CH2	TRP	219	B	3.84	155.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3387	CG	ASN	376	B	3.82
94.	985	CB	CYS	102	A	<-->	1842	CZ2	TRP	219	B	3.67	156.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3388	OD1	ASN	376	B	3.83
95.	993	CG	GLU	103	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.79	157.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	3.16
96.	994	CD	GLU	103	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	3.34	158.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.31
97.	994	CD	GLU	103	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.61	159.	1435	CH2	TRP	144	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.34
98.	994	CD	GLU	103	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	2.97	160.	1542	CZ2	TRP	153	A	<-->	3400	ND2	ASN	377	B	3.46
99.	995	OE1	GLU	103	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	3.01	161.	1544	CH2	TRP	153	A	<-->	3335	CG2	ILE	369	B	3.86
100.	995	OE1	GLU	103	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.32	162.	7863	CA	GLY	798	A	<-->	3374	C	GLY	374	B	3.82
101.	995	OE1	GLU	103	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	2.86	163.	7863	CA	GLY	798	A	<-->	3376	N	PRO	375	B	3.53
102.	996	OE2	GLU	103	A	<-->	1812	NE	ARG	217	B	2.96	164.	7863	CA	GLY	798	A	<-->	3378	CA	PRO	375	B	3.51
103.	996	OE2	GLU	103	A	<-->	1814	CZ	ARG	217	B	3.40	165.	7864	C	GLY	798	A	<-->	3374	C	GLY	374	B	3.79
104.	996	OE2	GLU	103	A	<-->	1818	NH2	ARG	217	B	3.02	166.	7864	C	GLY	798	A	<-->	3375	O	GLY	374	B	3.56
105.	1007	O	MET	104	A	<-->	2530	CG	GLN	285	B	3.28	167.	7864	C	GLY	798	A	<-->	3376	N	PRO	375	B	3.84
106.	1007	O	MET	104	A	<-->	2531	CD	GLN	285	B	3.71	168.	7865	O	GLY	798	A	<-->	3378	CA	PRO	375	B	3.60
107.	1002	CB	MET	104	A	<-->	2537	O	GLN	285	B	3.87	169.	7865	O	GLY	798	A	<-->	3378	CA	PRO	375	B	3.84
108.	1004	SD	MET	104	A	<-->	2528	CA	GLN	285	B	3.87	170.	7865	O	GLY	798	A	<-->	3383	N	ASN	376	B	3.69
109.	1004	SD	MET	104	A	<-->	2534	HE21	GLN	285	B	3.45	171.	7866	N	ASP	799	A	<-->	3374	C	GLY	374	B	3.36
110.	1005	CE	MET	104	A	<-->	1843	CZ3	TRP	219	B	3.67	172.	7866	N	ASP	799	A	<-->	3375	O	GLY	374	B	2.96
111.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	2494	CD	ARG	281	B	3.74	173.	7866	N	ASP	799	A	<-->	3376	N	PRO	375	B	3.87
112.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	2495	NE	ARG	281	B	3.32	174.	7868	CA	ASP	799	A	<-->	3374	C	GLY	374	B	3.89
113.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	2497	CZ	ARG	281	B	3.37	175.	7868	CA	ASP	799	A	<-->	3375	O	GLY	374	B	3.08
114.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	3.23	176.	7869	CB	ASP	799	A	<-->	3371	N	GLY	374	B	3.78
115.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2473	OG	SER	279	B	3.43	177.	7869	CB	ASP	799	A	<-->	3375	O	GLY	374	B	3.58
116.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2493	CG	ARG	281	B	3.53	178.	7870	CG	ASP	799	A	<-->	2805	CZ	ARG	311	B	3.86
117.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2494	CD	ARG	281	B	3.33	179.	7870	CG	ASP	799	A	<-->	2806	NH1	ARG	311	B	3.64
118.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2495	NE	ARG	281	B	2.60	180.	7870	CG	ASP	799	A	<-->	2809	NH2	ARG	311	B	3.16
119.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2497	CZ	ARG	281	B	2.88	181.	7870	CG	ASP	799	A	<-->	3362	O	GLY	372	B	3.89
120.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	2.67	182.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	2805	CZ	ARG	311	B	3.61
121.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2493	CG	ARG	281	B	3.83	183.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	2806	NH1	ARG	311	B	3.67
122.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2494	CD	ARG	281	B	3.38	184.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	2809	NH2	ARG	311	B	2.70
123.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2495	NE	ARG	281	B	3.40	185.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3362	O	GLY	372	B	3.75
124.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2497	CZ	ARG	281	B	3.41	186.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	2805	CZ	ARG	311	B	3.25
125.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	3.84	187.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	2806	NH1	ARG	311	B	2.80
126.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	3.68	188.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	2809	NH2	ARG	311	B	2.89
127.	1306	C	LEU	133	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	3.69	189.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3362	O	GLY	372	B	3.85
128.	1307	O	LEU	133	A	<-->	2497	CZ	ARG	281	B	3.42	190.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3365	CA	SER	373	B	3.30
129.	1307	O	LEU	133	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	2.67	191.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3366	CB	SER	373	B	3.45
130.	1307	O	LEU	133	A	<-->	2501	NH2	ARG	281	B	3.57	192.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3367	OG	SER	373	B	2.91
131.	1323	CB	THR	135	A	<-->	4023	CG2	VAL	444	B	3.75	193.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3371	N	GLY	374	B	3.82
132.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	2498	NH1	ARG	281	B	3.81	194.	7875	N	GLU	800	A	<-->	3386	CB	ASN	376	B	3.90
133.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4023	CG2	VAL	444	B	3.66	195.	7883	C	GLU	800	A	<-->	3386	CB	ASN	376	B	3.82
134.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4032	CB1	TYR	445	B	3.31	196.	7883	C	GLU	800	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	3.67
135.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4035	CZ	TRP	445	B	3.48	197.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3386	CB	ASN	376	B	3.22
136.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4036	OH	TYR	445	B	2.79	198.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3387	CG	ASN	376	B	3.41
137.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	4039	OD1	ASN	377	B	3.62	199.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	2.73
138.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	4023	CG2	VAL	444	B	3.81	200.	7885	N	ALA	801	A	<-->	3354	CD1	LEU	371	B	3.88
139.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	4011	O	GLY	442	B	3.81													

201.	7887	CA	ALA	801	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	3.80
202.	7890	O	ALA	801	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	3.70
203.	7903	CG	ARG	803	A	<-->	3389	ND2	ASN	376	B	3.79
204.	7905	NE	ARG	803	A	<-->						

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t597 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

Hydrogen bonds												
----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1813	NE	ARG	185	B	2.89
2.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.72
3.	86	O	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.89
4.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.73
5.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1816	NH1	ARG	185	B	2.76
6.	733	OD1	ASP	74	A	<-->	4028	ND2	ASN	410	B	2.86
7.	750	OG1	THR	76	A	<-->	2490	NE	ARG	249	B	2.84
8.	750	OG1	THR	76	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	3.22
9.	1282	O	LYS	130	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	2.69
10.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4033	N	SER	411	B	2.77
11.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	2.79
12.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	4021	O	SER	409	B	2.93
13.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	2.70
14.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	2.83
15.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	4040	O	SER	411	B	2.70
16.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	2775	NH2	ARG	279	B	2.77
17.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	2775	NH2	ARG	279	B	2.68
18.	8185	O	ASN	831	A	<-->	3047	N	MET	309	B	3.12
19.	8180	OD1	ASN	831	A	<-->	3067	ND2	ASN	311	B	2.71
20.	8181	ND2	ASN	831	A	<-->	3060	O	GLY	310	B	2.94
21.	8558	OD1	ASN	870	A	<-->	3981	NH1	ARG	405	B	2.71
22.	8558	OD1	ASN	870	A	<-->	3984	NH2	ARG	405	B	2.72
17.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.73
18.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1815	CZ	ARG	185	B	3.66
19.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1816	NH1	ARG	185	B	2.76
20.	84	OD2	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.70
21.	421	CD	GLU	42	A	<-->	3362	ND2	ASN	340	B	3.23
22.	422	OE1	GLU	42	A	<-->	3359	CB	ASN	340	B	3.38
23.	422	OE1	GLU	42	A	<-->	3360	CG	ASN	340	B	3.71
24.	422	OE1	GLU	42	A	<-->	3362	ND2	ASN	340	B	3.02
25.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3362	ND2	ASN	340	B	2.87
26.	736	O	ASP	74	A	<-->	2487	CB	ARG	249	B	3.69
27.	736	O	ASP	74	A	<-->	2488	CG	ARG	249	B	3.41
28.	736	O	ASP	74	A	<-->	2489	CD	ARG	249	B	3.78
29.	732	CG	ASP	74	A	<-->	4028	ND2	ASN	410	B	3.26
30.	733	OD1	ASP	74	A	<-->	4028	ND2	ASN	410	B	2.86
31.	734	OD2	ASP	74	A	<-->	4028	ND2	ASN	410	B	3.77
32.	750	OG1	THR	76	A	<-->	2490	NE	ARG	249	B	2.84
33.	750	OG1	THR	76	A	<-->	2492	CZ	ARG	249	B	3.41
34.	750	OG1	THR	76	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	3.22
35.	1004	SD	MET	104	A	<-->	2501	N	GLY	250	B	3.50
36.	1004	SD	MET	104	A	<-->	2503	CA	GLY	250	B	3.81
37.	1005	CE	MET	104	A	<-->	2501	N	GLY	250	B	3.87
38.	1281	C	LYS	130	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	3.49
39.	1282	O	LYS	130	A	<-->	2490	NE	ARG	249	B	3.80
40.	1282	O	LYS	130	A	<-->	2492	CZ	ARG	249	B	3.64
41.	1282	O	LYS	130	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	2.69
42.	1286	C	GLY	131	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	3.87
43.	1287	O	GLY	131	A	<-->	2496	NH2	ARG	249	B	3.76
44.	1291	CB	ASN	132	A	<-->	2492	CZ	ARG	249	B	3.81
45.	1291	CB	ASN	132	A	<-->	2493	NH1	ARG	249	B	3.46
46.	1291	CB	ASN	132	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.65
47.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	4021	O	SER	409	B	3.82
48.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.24
49.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	4035	CA	SER	411	B	3.89
50.	1292	CG	ASN	132	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	3.33
51.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4031	C	ASN	410	B	3.83
52.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4033	N	SER	411	B	2.77
53.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4035	CA	SER	411	B	3.01
54.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4036	CB	SER	411	B	3.49
55.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4037	OG	SER	411	B	2.79
56.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	4021	O	SER	409	B	2.93
57.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	4024	CA	ASN	410	B	3.45
58.	1294	ND2	ASN	132	A	<-->	4033	N	SER	411	B	3.40
59.	1310	CA	GLN	134	A	<-->	4021	O	SER	409	B	3.76
60.	1311	CB	GLN	134	A	<-->	4021	O	SER	409	B	3.53
61.	1311	CB	GLN	134	A	<-->	4017	CB	SER	409	B	3.84
62.	1320	N	THR	135	A	<-->	4017	CB	SER	409	B	3.88
63.	1320	N	THR	135	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	3.90
64.	1327	C	THR	135	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	3.84
65.	1323	CB	THR	135	A	<-->	3389	O	ILE	343	B	3.78
66.	1323	CB	THR	135	A	<-->	3395	OD1	ASN	344	B	3.10
67.	1323	CB	THR	135	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	3.66
68.	1323	CB	THR	135	A	<-->	4054	CG2	VAL	413	B	3.68
69.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	3395	OD1	ASN	344	B	3.50
70.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4017	CB	SER	409	B	3.24
71.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	2.70
72.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4054	CG2	VAL	413	B	3.04
73.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3389	O	ILE	343	B	3.01
74.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	4054	CG2	VAL	413	B	3.79
75.	1329	N	ASN	136	A	<-->	4017	CB	SER	409	B	3.46
76.	1329	N	ASN	136	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	2.99
77.	1331	CA	ASN	136	A	<-->	4018	OG	SER	409	B	3.84

Non-bonded contacts

Non-bonded contacts												
----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	70	CA	GLU	8	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.71
2.	76	C	GLU	8	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.71
3.	73	CD	GLU	8	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.61
4.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1813	NE	ARG	185	B	2.89
5.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1815	CZ	ARG	185	B	3.24
6.	75	OE2	GLU	8	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.72
7.	78	N	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.40
8.	85	C	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.84
9.	86	O	ASP	9	A	<-->	1815	CZ	ARG	185	B	3.47
10.	86	O	ASP	9	A	<-->	1816	NH1	ARG	185	B	3.66
11.	86	O	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	2.89
12.	82	CG	ASP	9	A	<-->	1815	CZ	ARG	185	B	3.72
13.	82	CG	ASP	9	A	<-->	1816	NH1	ARG	185	B	3.16
14.	82	CG	ASP	9	A	<-->	1819	NH2	ARG	185	B	3.35
15.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1815	CZ	ARG	185	B	3.22
16.	83	OD1	ASP	9	A	<-->	1816	NH1	ARG	185	B	2.90

Anexo V. Interações formadas entre Cry1Ab e APN1T1. Cadeia A (APN1T1). Cadeia B (Cry1Ab).

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t598 Chains A)(B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	2.75
2.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	2.80
3.	457	O	GLN	45	A	<-->	4041	OG	SER	409	B	2.87
4.	475	OG	SER	47	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	2.69
5.	475	OG	SER	47	A	<-->	4064	N	SER	412	B	2.78
6.	490	O	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	2.92
7.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	3441	OE1	GLN	346	B	2.82
8.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	3.11
9.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	2.71
10.	1540	NE1	TRP	153	A	<-->	3403	O	GLY	342	B	3.08
11.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3430	ND2	ASN	345	B	3.08
12.	7890	O	ALA	801	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	2.76
13.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	2.81
14.	7908	NH1	ARG	803	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	2.82
15.	7911	NH2	ARG	803	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	2.70
16.	8211	OD1	ASN	834	A	<-->	2814	OH	TYR	281	B	2.79
17.	8212	ND2	ASN	834	A	<-->	2798	O	ARG	279	B	2.96

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	418	CA	GLU	42	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.70
2.	418	CA	GLU	42	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.62
3.	418	CA	GLU	42	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.44
4.	424	C	GLU	42	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.65
5.	424	C	GLU	42	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.51
6.	424	C	GLU	42	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.88
7.	425	O	GLU	42	A	<-->	2495	CG	ARG	249	B	3.49
8.	425	O	GLU	42	A	<-->	2496	CD	ARG	249	B	3.40
9.	425	O	GLU	42	A	<-->	2497	NE	ARG	249	B	3.34
10.	425	O	GLU	42	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	2.88
11.	425	O	GLU	42	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	2.61
12.	425	O	GLU	42	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.51
13.	419	CB	GLU	42	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.55
14.	420	CG	GLU	42	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.57
15.	421	CD	GLU	42	A	<-->	3377	C	PHE	339	B	3.69
16.	421	CD	GLU	42	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.64
17.	421	CD	GLU	42	A	<-->	3370	CB	PHE	339	B	3.66
18.	422	OE1	GLU	42	A	<-->	3370	CB	PHE	339	B	3.39
19.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3369	CA	PHE	339	B	3.75
20.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3377	C	PHE	339	B	3.10
21.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3378	O	PHE	339	B	3.24

22.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3370	CB	PHE	339	B	3.41
23.	423	OE2	GLU	42	A	<-->	3379	N	ASN	340	B	3.39
24.	428	CA	THR	43	A	<-->	2507	O	ARG	249	B	3.68
25.	439	CG	ASN	44	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.70
26.	439	CG	ASN	44	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	3.76
27.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	2496	CD	ARG	249	B	3.22
28.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.77
29.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	2.75
30.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	4059	CB	SER	411	B	3.32
31.	440	OD1	ASN	44	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	2.80
32.	457	O	GLN	45	A	<-->	4040	CB	SER	409	B	3.38
33.	457	O	GLN	45	A	<-->	4041	OG	SER	409	B	2.87
34.	474	CB	SER	47	A	<-->	4054	C	ASN	410	B	3.78
35.	474	CB	SER	47	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	3.32
36.	474	CB	SER	47	A	<-->	4058	CA	SER	411	B	3.86
37.	475	OG	SER	47	A	<-->	4054	C	ASN	410	B	3.38
38.	475	OG	SER	47	A	<-->	4055	O	ASN	410	B	2.69
39.	475	OG	SER	47	A	<-->	4056	N	SER	411	B	3.62
40.	475	OG	SER	47	A	<-->	4058	CA	SER	411	B	3.11
41.	475	OG	SER	47	A	<-->	4062	C	SER	411	B	3.34
42.	475	OG	SER	47	A	<-->	4064	N	SER	412	B	2.78
43.	475	OG	SER	47	A	<-->	4066	CA	SER	412	B	3.86
44.	475	OG	SER	47	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.89
45.	475	OG	SER	47	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.65
46.	479	N	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.51
47.	481	CA	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.54
48.	489	C	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.41
49.	490	O	PHE	48	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.89
50.	490	O	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	2.92
51.	482	CB	PHE	48	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.20
52.	485	CD	PHE	48	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	3.31
53.	487	CE2	PHE	48	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.21
54.	487	CE2	PHE	48	A	<-->	4060	OG	SER	411	B	3.16
55.	487	CE2	PHE	48	A	<-->	4076	CG1	VAL	413	B	3.80
56.	488	CZ	PHE	48	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.43
57.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4067	CB	SER	412	B	3.26
58.	1293	OD1	ASN	132	A	<-->	4068	OG	SER	412	B	3.38
59.	1327	C	THR	135	A	<-->	3411	C	ILE	343	B	3.60
60.	1327	C	THR	135	A	<-->	3412	O	ILE	343	B	3.45
61.	1328	O	THR	135	A	<-->	3406	CA	ILE	343	B	3.29
62.	1328	O	THR	135	A	<-->	3411	C	ILE	343	B	2.92
63.	1328	O	THR	135	A	<-->	3412	O	ILE	343	B	2.59
64.	1328	O	THR	135	A	<-->	3407	CB	ILE	343	B	3.48
65.	1328	O	THR	135	A	<-->	3413	N	ASN	344	B	3.83
66.	1323	CB	THR	135	A	<-->	3434	O	ASN	345	B	3.72
67.	1323	CB	THR	135	A	<-->	3441	OE1	GLN	346	B	3.65
68.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	3440	CD	GLN	346	B	3.63
69.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	3441	OE1	GLN	346	B	2.82
70.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	3444	HE22	GLN	346	B	3.67
71.	1324	OG1	THR	135	A	<-->	4077	CG2	VAL	413	B	3.53
72.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3395	CG1	ILE	341	B	3.68
73.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3402	C	GLY	342	B	3.83
74.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3403	O	GLY	342	B	3.27
75.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3406	CA	ILE	343	B	3.50
76.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3411	C	ILE	343	B	3.56
77.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3413	N	ASN	344	B	3.29
78.	1326	CG2	THR	135	A	<-->	3434	O	ASN	345	B	3.33
79.	1333	CG	ASN	136	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	3.59
80.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	2790	CZ	ARG	279	B	3.24
81.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	3.11
82.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	2794	NH2	ARG	279	B	2.71

Anexo VI. Interações formadas entre Cry1Ac e APN1TI. Cadeia A (APN1TI). Cadeia B (Cry1Ac).

83.	1334	OD1	ASN	136	A	<-->	3423	O	ASN	344	B	3.27
84.	1413	O	ARG	142	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.06
85.	1406	NH1	ARG	142	A	<-->	4075	CB	VAL	413	B	3.72
86.	1406	NH1	ARG	142	A	<-->	4077	CG2	VAL	413	B	3.77
87.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	3444	HE22	GLN	346	B	3.89
88.	1409	NH2	ARG	142	A	<-->	4075	CB	VAL	413	B	3.82
89.	1422	N	TRP	144	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.50
90.	1425	CB	TRP	144	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.71
91.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.69
92.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3399	N	GLY	342	B	3.81
93.	1429	CE3	TRP	144	A	<-->	3401	CA	GLY	342	B	3.24
94.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3381	CA	ASN	340	B	3.87
95.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3382	CB	ASN	340	B	3.81
96.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.53
97.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.00
98.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3399	N	GLY	342	B	3.74
99.	1434	CZ3	TRP	144	A	<-->	3401	CA	GLY	342	B	3.65
100.	1540	NE1	TRP	153	A	<-->	3403	O	GLY	342	B	3.08
101.	1537	CE2	TRP	153	A	<-->	3403	O	GLY	342	B	3.86
102.	1543	CE3	TRP	153	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.67
103.	1544	CH2	TRP	153	A	<-->	2499	CZ	ARG	249	B	3.84
104.	1544	CH2	TRP	153	A	<-->	2500	NH1	ARG	249	B	3.58
105.	1544	CH2	TRP	153	A	<-->	2503	NH2	ARG	249	B	3.22
106.	2904	CB	ASP	295	A	<-->	3409	CG1	ILE	343	B	3.76
107.	2905	CG	ASP	295	A	<-->	3409	CG1	ILE	343	B	3.58
108.	2905	CG	ASP	295	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.81
109.	2907	OD2	ASP	295	A	<-->	3407	CB	ILE	343	B	3.78
110.	2907	OD2	ASP	295	A	<-->	3409	CG1	ILE	343	B	3.44
111.	2907	OD2	ASP	295	A	<-->	3408	CG2	ILE	343	B	3.23
112.	7870	CG	ASP	799	A	<-->	3338	NH2	ARG	336	B	3.18
113.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3332	NE	ARG	336	B	3.82
114.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3334	CZ	ARG	336	B	3.79
115.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3338	NH2	ARG	336	B	2.91
116.	7871	OD1	ASP	799	A	<-->	3430	ND2	ASN	345	B	3.08
117.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3334	CZ	ARG	336	B	3.90
118.	7872	OD2	ASP	799	A	<-->	3338	NH2	ARG	336	B	2.69
119.	7883	C	GLU	800	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.82
120.	7883	C	GLU	800	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.79
121.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.23
122.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	3.26
123.	7884	O	GLU	800	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.11
124.	7885	N	ALA	801	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.89
125.	7887	CA	ALA	801	A	<-->	3382	CB	ASN	340	B	3.54
126.	7887	CA	ALA	801	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.53
127.	7887	CA	ALA	801	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.09
128.	7889	C	ALA	801	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.20
129.	7890	O	ALA	801	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	2.76
130.	7904	CD	ARG	803	A	<-->	3401	CA	GLY	342	B	3.75
131.	7904	CD	ARG	803	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	3.03
132.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.48
133.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	2.81
134.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3385	ND2	ASN	340	B	3.37
135.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3401	CA	GLY	342	B	3.40
136.	7905	NE	ARG	803	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	2.99
137.	7907	CZ	ARG	803	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	3.18
138.	7907	CZ	ARG	803	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.71
139.	7907	CZ	ARG	803	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	2.99
140.	7908	NH1	ARG	803	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.22
141.	7908	NH1	ARG	803	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	2.82
142.	7908	NH1	ARG	803	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.74
143.	7911	NH2	ARG	803	A	<-->	3383	CG	ASN	340	B	3.75

144.	7911	NH2	ARG	803	A	<-->	3384	OD1	ASN	340	B	2.70
145.	7952	CE2	TYR	807	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.61
146.	7953	CZ	TYR	807	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.37
147.	7954	OH	TYR	807	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.38
148.	7954	OH	TYR	807	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	3.26
149.	7954	OH	TYR	807	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	2.94
150.	8210	CG	ASN	834	A	<-->	2814	OH	TYR	281	B	3.37
151.	8211	OD1	ASN	834	A	<-->	2813	CG	TYR	281	B	3.72
152.	8211	OD1	ASN	834	A	<-->	2814	OH	TYR	281	B	2.79
153.	8212	ND2	ASN	834	A	<-->	2797	C	ARG	279	B	3.72
154.	8212	ND2	ASN	834	A	<-->	2798	O	ARG	279	B	2.96
155.	8212	ND2	ASN	834	A	<-->	2785	CB	ARG	279	B	3.60
156.	8212	ND2	ASN	834	A	<-->	2814	OH	TYR	281	B	3.64
157.	8221	CG	GLN	835	A	<-->	3416	CG	ASN	344	B	3.70
158.	8221	CG	GLN	835	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.86
159.	8221	CG	GLN	835	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.28
160.	8222	CD	GLN	835	A	<-->	3416	CB	ASN	344	B	3.77
161.	8222	CD	GLN	835	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.69
162.	8222	CD	GLN	835	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.32
163.	8223	OE1	GLN	835	A	<-->	3416	CB	ASN	344	B	3.12
164.	8223	OE1	GLN	835	A	<-->	3417	CG	ASN	344	B	3.07
165.	8223	OE1	GLN	835	A	<-->	3418	OD1	ASN	344	B	3.69
166.	8223	OE1	GLN	835	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.14
167.	8251	CG	GLU	838	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	3.66
168.	8252	CD	GLU	838	A	<-->	2786	CG	ARG	279	B	3.70
169.	8252	CD	GLU	838	A	<-->	2790	CZ	ARG	279	B	3.74
170.	8252	CD	GLU	838	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.86
171.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2785	CB	ARG	279	B	3.76
172.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2786	CG	ARG	279	B	3.19
173.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2787	CD	ARG	279	B	3.62
174.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2788	NE	ARG	279	B	3.64
175.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2790	CZ	ARG	279	B	3.40
176.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.94
177.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2784	CA	ARG	279	B	3.89
178.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2785	CB	ARG	279	B	3.31
179.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2786	CG	ARG	279	B	3.39
180.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2787	CD	ARG	279	B	3.42
181.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2790	CZ	ARG	279	B	3.76
182.	8254	OE2	GLU	838	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.79
183.	8261	OG1	THR	839	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	3.78
184.	8261	OG1	THR	839	A	<-->	3415	CA	ASN	344	B	3.71
185.	8261	OG1	THR	839	A	<-->	3422	O	ASN	344	B	3.87
186.	8261	OG1	THR	839	A	<-->	3423	O	ASN	344	B	3.31
187.	8263	CG2	THR	839	A	<-->	3412	O	ILE	343	B	2.86
188.	8263	CG2	THR	839	A	<-->	3415	CA	ASN	344	B	3.81
189.	8263	CG2	THR	839	A	<-->	3419	ND2	ASN	344	B	3.64

Salt bridges

<---- A T O M 1 ---->					<---- A T O M 2 ---->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	8253	OE1	GLU	838	A	<-->	2791	NH1	ARG	279	B	2.79
Number of salt bridges: 1												
Number of hydrogen bonds: 17												
Number of non-bonded contacts: 189												

Anexo VI. Continuação.

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t600 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->					
no.	Atom no.	Atom name	Res name	Chain	no.	Atom no.	Atom name	Res name	Chain	Distance
1.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	281	O	PHE 26	B	3.24
2.	2490	NE	ARG 249	A	<-->	287	OD1	ASP 27	B	2.87
3.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	287	OD1	ASP 27	B	2.76
4.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1183	NH1	ARG 121	B	2.69
5.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1233	NE	ARG 125	B	2.89
6.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	2.65
7.	3395	OD1	ASN 344	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	2.71
8.	3362	ND2	ASN 340	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	2.86
9.	3407	ND2	ASN 345	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	3.34
10.	4037	OG	SER 411	A	<-->	1333	NE1	TRP 134	B	2.86
11.	3381	N	ILE 343	A	<-->	7369	O	GLN 749	B	2.71
12.	3010	N	LEU 305	A	<-->	7606	OH	TYR 774	B	3.05
13.	3978	NE	ARG 405	A	<-->	7646	OD2	ASP 778	B	2.96
14.	3984	NH2	ARG 405	A	<-->	7675	O	PHE 781	B	3.08
15.	3981	NH1	ARG 405	A	<-->	7692	OE1	GLU 783	B	2.72
16.	3989	N	SER 406	A	<-->	7693	OE2	GLU 783	B	2.97
17.	3996	O	SER 406	A	<-->	7702	ND2	ASN 784	B	3.07
18.	3396	ND2	ASN 344	A	<-->	7718	O	PHE 785	B	2.75

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->					
no.	Atom no.	Atom name	Res name	Chain	no.	Atom no.	Atom name	Res name	Chain	Distance
1.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	281	O	PHE 26	B	3.24
2.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	282	N	ASP 27	B	3.87
3.	2492	CZ	ARG 249	A	<-->	284	CA	ASP 27	B	3.81
4.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	284	CA	ASP 27	B	3.03
5.	2490	NE	ARG 249	A	<-->	289	C	ASP 27	B	3.82
6.	2492	CZ	ARG 249	A	<-->	289	C	ASP 27	B	3.82
7.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	289	C	ASP 27	B	3.55
8.	2487	CB	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	3.44
9.	2488	CG	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	3.75
10.	2489	CD	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	3.76
11.	2490	NE	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	2.91
12.	2492	CZ	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	2.99
13.	2493	NH1	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	3.72
14.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	290	O	ASP 27	B	3.13
15.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	285	CB	ASP 27	B	3.81
16.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	286	CG	ASP 27	B	3.27
17.	2490	NE	ARG 249	A	<-->	287	OD1	ASP 27	B	2.87
18.	2492	CZ	ARG 249	A	<-->	287	OD1	ASP 27	B	3.25
19.	2496	NH2	ARG 249	A	<-->	287	OD1	ASP 27	B	2.76
20.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	306	CD2	PHE 29	B	3.76

21.	4028	ND2	ASN 410	A	<-->	306	CD2	PHE 29	B	3.64
22.	2493	NH1	ARG 249	A	<-->	308	CE2	PHE 29	B	3.48
23.	4026	CG	ASN 410	A	<-->	308	CE2	PHE 29	B	3.72
24.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	308	CE2	PHE 29	B	3.26
25.	4028	ND2	ASN 410	A	<-->	308	CE2	PHE 29	B	3.40
26.	2493	NH1	ARG 249	A	<-->	309	CZ	PHE 29	B	3.56
27.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	309	CZ	PHE 29	B	3.83
28.	5135	OG	SER 525	A	<-->	754	CG1	VAL 77	B	3.65
29.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1182	CZ	ARG 121	B	3.66
30.	4026	CG	ASN 410	A	<-->	1183	NH1	ARG 121	B	3.67
31.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1183	NH1	ARG 121	B	2.69
32.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1186	NH2	ARG 121	B	3.79
33.	4021	O	SER 409	A	<-->	1205	CE2	TRP 123	B	3.84
34.	3395	OD1	ASN 344	A	<-->	1206	CE3	TRP 123	B	3.25
35.	4021	O	SER 409	A	<-->	1206	CE3	TRP 123	B	3.76
36.	4021	O	SER 409	A	<-->	1210	CZ2	TRP 123	B	3.34
37.	4033	N	SER 411	A	<-->	1210	CZ2	TRP 123	B	3.40
38.	4035	CA	SER 411	A	<-->	1210	CZ2	TRP 123	B	3.33
39.	4039	C	SER 411	A	<-->	1210	CZ2	TRP 123	B	3.59
40.	4040	O	SER 411	A	<-->	1210	CZ2	TRP 123	B	3.46
41.	3395	OD1	ASN 344	A	<-->	1211	CZ3	TRP 123	B	3.04
42.	4021	O	SER 409	A	<-->	1211	CZ3	TRP 123	B	3.24
43.	4017	CB	SER 409	A	<-->	1211	CZ3	TRP 123	B	3.66
44.	4054	CG2	VAL 413	A	<-->	1211	CZ3	TRP 123	B	3.60
45.	3395	OD1	ASN 344	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.67
46.	4020	C	SER 409	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.68
47.	4021	O	SER 409	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.01
48.	4033	N	SER 411	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.88
49.	4047	C	SER 412	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.83
50.	4048	O	SER 412	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.64
51.	4054	CG2	VAL 413	A	<-->	1212	CH2	TRP 123	B	3.36
52.	3388	C	ILE 343	A	<-->	1233	NE	ARG 125	B	3.88
53.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1233	NE	ARG 125	B	2.89
54.	3386	CG1	ILE 343	A	<-->	1233	NE	ARG 125	B	3.65
55.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1235	CZ	ARG 125	B	3.18
56.	3388	C	ILE 343	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	3.86
57.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	2.65
58.	3394	CG	ASN 344	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	3.47
59.	3395	OD1	ASN 344	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	2.71
60.	3396	ND2	ASN 344	A	<-->	1239	NH2	ARG 125	B	3.86
61.	3381	N	ILE 343	A	<-->	1287	C	THR 129	B	3.86
62.	3383	CA	ILE 343	A	<-->	1287	C	THR 129	B	3.69
63.	3379	C	GLY 342	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.42
64.	3380	O	GLY 342	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.31
65.	3381	N	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.24
66.	3383	CA	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	2.76
67.	3388	C	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.32
68.	3389	O	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.34
69.	3384	CB	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.77
70.	3386	CG1	ILE 343	A	<-->	1288	O	THR 129	B	3.65
71.	3381	N	ILE 343	A	<-->	1283	CB	THR 129	B	3.76
72.	3362	ND2	ASN 340	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	2.86
73.	3378	CA	GLY 342	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	3.67
74.	3380	O	GLY 342	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	3.71
75.	3407	ND2	ASN 345	A	<-->	1295	OD2	ASP 130	B	3.34
76.	4040	O	SER 411	A	<-->	1313	CG2	VAL 132	B	3.78
77.	4037	OG	SER 411	A	<-->	1332	CD1	TRP 134	B	3.52
78.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1333	NE1	TRP 134	B	3.48
79.	4033	N	SER 411	A	<-->	1333	NE1	TRP 134	B	3.67
80.	4037	OG	SER 411	A	<-->	1333	NE1	TRP 134	B	2.86
81.	4027	OD1	ASN 410	A	<-->	1330	CE2	TRP 134	B	3.73

Anexo VII. Interações formadas entre Cry1Ab e APN3TI. Cadeia A (Cry1Ab). Cadeia B (APN3TI).

82.	4020	C	SER	409	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	3.83	143.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.78
83.	4021	O	SER	409	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	2.77	144.	3981	NH1	ARG	405	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.10
84.	4024	CA	ASN	410	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	3.85	145.	3989	N	SER	406	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.51
85.	4027	OD1	ASN	410	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	3.76	146.	3991	CA	SER	406	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.81
86.	4033	N	SER	411	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	3.61		3995	C	SER	406	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.41
87.	4021	O	SER	409	A	<-->	1337	CH2	TRP	134	B	3.18		3996	O	SER	406	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.88
88.	3053	CE	MET	309	A	<-->	7233	OE2	GLU	738	B	3.76		3997	N	GLY	407	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.31
89.	3371	CG2	ILE	341	A	<-->	7322	NE2	GLN	746	B	3.44		3999	CA	GLY	407	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.85
90.	3371	CG2	ILE	341	A	<-->	7323	HE21	GLN	746	B	3.83		3987	C	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.48
91.	3371	CG2	ILE	341	A	<-->	7324	HE22	GLN	746	B	2.63		3988	O	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.80
92.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	7360	CA	GLN	749	B	3.55		3975	CB	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.89
93.	3381	N	ILE	343	A	<-->	7368	C	GLN	749	B	3.84		3976	CG	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.24
94.	3384	CB	ILE	343	A	<-->	7368	C	GLN	749	B	3.89		3977	CD	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.79
95.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	7368	C	GLN	749	B	3.90		3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.67
96.	3378	CA	GLY	342	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	3.87		3981	NH1	ARG	405	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	2.72
97.	3379	C	GLY	342	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	3.77		3989	N	SER	406	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.30
98.	3381	N	ILE	343	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	2.71		3991	CA	SER	406	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.59
99.	3383	CA	ILE	343	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	3.34		3995	C	SER	406	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.58
100.	3384	CB	ILE	343	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	2.95		3997	N	GLY	407	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	3.34
101.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	7369	O	GLN	749	B	3.34		3987	C	ARG	405	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.77
102.	3421	HE22	GLN	346	A	<-->	7363	CD	GLN	749	B	3.76		3976	CG	ARG	405	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.49
103.	3371	CG2	ILE	341	A	<-->	7364	OE1	GLN	749	B	3.48		3989	N	SER	406	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	2.97
104.	3421	HE22	GLN	346	A	<-->	7365	NE2	GLN	749	B	3.75		3991	CA	SER	406	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.48
105.	3421	HE22	GLN	346	A	<-->	7367	HE22	GLN	749	B	3.82		3995	C	SER	406	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.06
106.	3053	CE	MET	309	A	<-->	7576	CG2	THR	771	B	3.74		3996	O	SER	406	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.23
107.	3050	CB	MET	309	A	<-->	7609	O	TYR	774	B	3.88		3997	N	GLY	407	A	<-->	7693	OE2	GLU	783	B	3.43
108.	3010	N	LEU	305	A	<-->	7602	CE1	TYR	774	B	3.85		4017	CB	SER	409	A	<-->	7698	CA	ASN	784	B	3.73
109.	3018	O	LEU	305	A	<-->	7602	CE1	TYR	774	B	3.71		4018	OG	SER	409	A	<-->	7698	CA	ASN	784	B	3.86
110.	3013	CB	LEU	305	A	<-->	7602	CE1	TYR	774	B	3.65		4017	CB	SER	409	A	<-->	7705	C	ASN	784	B	3.65
111.	3010	N	LEU	305	A	<-->	7605	CZ	TYR	774	B	3.68		4017	CB	SER	409	A	<-->	7706	O	ASN	784	B	3.42
112.	3013	CB	LEU	305	A	<-->	7605	CZ	TYR	774	B	3.55		4053	CG1	VAL	413	A	<-->	7706	O	ASN	784	B	3.27
113.	3005	CA	PRO	304	A	<-->	7606	OH	TYR	774	B	3.66		4070	CG1	ILE	415	A	<-->	7699	CB	ASN	784	B	3.81
114.	3008	C	PRO	304	A	<-->	7606	OH	TYR	774	B	3.89		3999	CA	GLY	407	A	<-->	7700	CG	ASN	784	B	3.58
115.	3006	CB	PRO	304	A	<-->	7606	OH	TYR	774	B	3.41		4002	N	PHE	408	A	<-->	7700	CG	ASN	784	B	3.84
116.	3010	N	LEU	305	A	<-->	7606	OH	TYR	774	B	3.05		4064	O	SER	414	A	<-->	7700	CG	ASN	784	B	3.79
117.	3013	CB	LEU	305	A	<-->	7606	OH	TYR	774	B	3.73		4067	CA	ILE	415	A	<-->	7700	CG	ASN	784	B	3.70
118.	3051	CG	MET	309	A	<-->	7612	CA	THR	775	B	3.80		4070	CG1	ILE	415	A	<-->	7700	CG	ASN	784	B	3.74
119.	3051	CG	MET	309	A	<-->	7614	OG1	THR	775	B	3.52		3999	CA	GLY	407	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.55
120.	3052	SD	MET	309	A	<-->	7614	OG1	THR	775	B	3.87		4000	C	GLY	407	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.42
121.	3053	CE	MET	309	A	<-->	7614	OG1	THR	775	B	3.29		4002	N	PHE	408	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.10
122.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	7648	O	ASP	778	B	3.62		4004	CA	PHE	408	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.71
123.	3978	NE	ARG	405	A	<-->	7644	CG	ASP	778	B	3.32		4012	C	PHE	408	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.22
124.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7644	CG	ASP	778	B	3.60		4013	O	PHE	408	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.74
125.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	7644	CG	ASP	778	B	2.99		4014	N	SER	409	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.02
126.	3978	NE	ARG	405	A	<-->	7645	OD1	ASP	778	B	2.89		4016	CA	SER	409	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.45
127.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7645	OD1	ASP	778	B	3.19		4017	CB	SER	409	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.61
128.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	7645	OD1	ASP	778	B	2.76		4063	C	SER	414	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.37
129.	3044	CG2	THR	308	A	<-->	7646	OD2	ASP	778	B	3.50		4064	O	SER	414	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.11
130.	3978	NE	ARG	405	A	<-->	7646	OD2	ASP	778	B	2.96		4065	N	ILE	415	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.66
131.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7646	OD2	ASP	778	B	3.34		4067	CA	ILE	415	A	<-->	7701	OD1	ASN	784	B	3.84
132.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	7646	OD2	ASP	778	B	2.93		3995	C	SER	406	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.71
133.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	7675	O	PHE	781	B	3.08		3996	O	SER	406	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.07
134.	3999	CA	GLY	407	A	<-->	7694	C	GLU	783	B	3.72		3997	N	GLY	407	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.85
135.	3999	CA	GLY	407	A	<-->	7695	O	GLU	783	B	2.93		3999	CA	GLY	407	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.27
136.	4000	C	GLY	407	A	<-->	7695	O	GLU	783	B	3.68		4064	O	SER	414	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.85
137.	4001	O	GLY	407	A	<-->	7695	O	GLU	783	B	3.81		4067	CA	ILE	415	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.34
138.	4018	OG	SER	409	A	<-->	7695	O	GLU	783	B	3.69		4068	CB	ILE	415	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.75
139.	3981	NH1	ARG	405	A	<-->	7689	CB	GLU	783	B	3.23		4070	CG1	ILE	415	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.83
140.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	7690	CG	GLU	783	B	3.83		4069	CG2	ILE	415	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	3.62
141.	3981	NH1	ARG	405	A	<-->	7690	CG	GLU	783	B	3.19		3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7717	C	PHE	785	B	3.38
142.	3976	CG	ARG	405	A	<-->	7691	CD	GLU	783	B	3.56		3394	CG	ASN	344	A	<-->	7718	O	PHE	785	B	3.87

204.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7718	O	PHE	785	B	2.75
205.	4018	OG	SER	409	A	<-->	7713	CD2	PHE	785	B	3.61
206.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7719	N	VAL	786	B	3.59
207.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7721	CA	VAL	786	B	3.16
208.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	7726	O	VAL	786	B	3.47
209.	3396</											

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t601 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

----- A T O M 1 -----					----- A T O M 2 -----							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	281	O	PHE	26	B	2.83
2.	2513	N	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	2.92
3.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	2.74
4.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.72
5.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.77
6.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	2.62
7.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1183	NH1	ARG	121	B	2.90
8.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1186	NH2	ARG	121	B	2.85
9.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1297	O	ASP	130	B	2.70
10.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1308	N	VAL	132	B	3.26
11.	3378	O	PHE	339	A	<-->	1333	NE1	TRP	134	B	2.97
12.	4037	N	SER	409	A	<-->	7646	OD2	ASP	778	B	3.04
13.	4041	OG	SER	409	A	<-->	7682	OE1	GLU	782	B	2.91
14.	2527	N	GLN	253	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	2.78
15.	4025	N	PHE	408	A	<-->	7692	OE1	GLU	783	B	2.98
16.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7702	ND2	ASN	784	B	2.95
17.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7980	OH	TYR	813	B	2.85
18.	2520	O	SER	251	A	<-->	8050	NZ	LYS	820	B	2.71
19.	2526	O	ALA	252	A	<-->	8050	NZ	LYS	820	B	2.61
20.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	8050	NZ	LYS	820	B	2.68
19.	2516	CB	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	3.78
20.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	2.74
21.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1111	CG2	THR	114	B	3.66
22.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1119	OD1	ASP	115	B	3.55
23.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1166	CE1	TYR	120	B	3.52
24.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1169	CZ	TYR	120	B	3.53
25.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1169	CZ	TYR	120	B	3.86
26.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	3.16
27.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.72
28.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.77
29.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1189	C	ARG	121	B	3.75
30.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	3.32
31.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	3.43
32.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	2.62
33.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1182	CZ	ARG	121	B	3.30
34.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1183	NH1	ARG	121	B	2.90
35.	2495	CG	ARG	249	A	<-->	1183	NH1	ARG	121	B	3.69
36.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1186	NH2	ARG	121	B	2.85
37.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1199	N	TRP	123	B	3.47
38.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1202	CB	TRP	123	B	3.57
39.	4075	CB	VAL	413	A	<-->	1210	CZ2	TRP	123	B	3.50
40.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1211	CZ3	TRP	123	B	3.14
41.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1212	CH2	TRP	123	B	3.82
42.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1212	CH2	TRP	123	B	3.33
43.	4072	N	VAL	413	A	<-->	1212	CH2	TRP	123	B	3.58
44.	4074	CA	VAL	413	A	<-->	1212	CH2	TRP	123	B	3.90
45.	4075	CB	VAL	413	A	<-->	1212	CH2	TRP	123	B	3.60
46.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1296	C	ASP	130	B	3.59
47.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1297	O	ASP	130	B	3.84
48.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1297	O	ASP	130	B	2.70
49.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1293	OG	ASP	130	B	2.88
50.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1294	OD1	ASP	130	B	3.80
51.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1294	OD1	ASP	130	B	2.76
52.	2788	NE	ARG	279	A	<-->	1295	OD2	ASP	130	B	3.77
53.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1295	OD2	ASP	130	B	3.59
54.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1295	OD2	ASP	130	B	2.77
55.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1300	CA	GLU	131	B	3.71
56.	3406	CA	ILE	343	A	<-->	1308	N	VAL	132	B	3.67
57.	3411	C	ILE	343	A	<-->	1308	N	VAL	132	B	3.68
58.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1308	N	VAL	132	B	3.26
59.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1314	C	VAL	132	B	3.14
60.	3395	CG1	ILE	341	A	<-->	1315	O	VAL	132	B	3.16
61.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1315	O	VAL	132	B	2.78
62.	3395	CG1	ILE	341	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.82
63.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.39
64.	3411	C	ILE	343	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.33
65.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.39
66.	3413	N	ASN	344	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.58
67.	3424	N	ASN	345	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.86
68.	3434	O	ASN	345	A	<-->	1313	CG2	VAL	132	B	3.14
69.	3408	CG2	ILE	343	A	<-->	1320	OG	SER	133	B	3.35
70.	3378	O	PHE	339	A	<-->	1332	CD1	TRP	134	B	3.83
71.	3378	O	PHE	339	A	<-->	1333	NE1	TRP	134	B	2.97
72.	3395	CG1	ILE	341	A	<-->	1333	NE1	TRP	134	B	3.53
73.	4077	CG2	VAL	413	A	<-->	1335	CZ2	TRP	134	B	3.83
74.	2497	NE	ARG	249	A	<-->	1336	CZ3	TRP	134	B	3.34
75.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1336	CZ3	TRP	134	B	3.65
76.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1336	CZ3	TRP	134	B	3.25
77.	2497	NE	ARG	249	A	<-->	1337	CH2	TRP	134	B	3.56
78.	4033	CE2	PHE	408	A	<-->	7639	O	LEU	777	B	3.88
79.	4031	CD2	PHE	408	A	<-->	7642	CA	ASP	778	B	3.60

Non-bonded contacts

----- A T O M 1 -----					----- A T O M 2 -----							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	3382	CB	ASN	340	A	<-->	281	O	PHE	26	B	3.17
2.	3383	CG	ASN	340	A	<-->	281	O	PHE	26	B	3.50
3.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	281	O	PHE	26	B	2.83
4.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	273	CB	PHE	26	B	3.89
5.	3370	CB	PHE	339	A	<-->	290	O	ASP	27	B	3.42
6.	3377	C	PHE	339	A	<-->	308	CE2	PHE	29	B	3.31
7.	3378	O	PHE	339	A	<-->	308	CE2	PHE	29	B	3.41
8.	3370	CB	PHE	339	A	<-->	308	CE2	PHE	29	B	3.75
9.	3379	N	ASN	340	A	<-->	308	CE2	PHE	29	B	3.34
10.	3381	CA	ASN	340	A	<-->	308	CE2	PHE	29	B	3.82
11.	3378	O	PHE	339	A	<-->	309	CZ	PHE	29	B	3.85
12.	3379	N	ASN	340	A	<-->	309	CZ	PHE	29	B	3.84
13.	3381	CA	ASN	340	A	<-->	309	CZ	PHE	29	B	3.78
14.	2513	N	SER	251	A	<-->	1108	CB	THR	114	B	3.58
15.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1108	CB	THR	114	B	3.17
16.	2510	CA	GLY	250	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	3.13
17.	2511	C	GLY	250	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	3.54
18.	2513	N	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	2.92
19.	2516	CB	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	3.78
20.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1109	OG1	THR	114	B	2.74
21.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1111	CG2	THR	114	B	3.66
22.	2517	OG	SER	251	A	<-->	1119	OD1	ASP	115	B	3.55
23.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1166	CE1	TYR	120	B	3.52
24.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1169	CZ	TYR	120	B	3.53
25.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1169	CZ	TYR	120	B	3.86
26.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	3.16
27.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.72
28.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1170	OH	TYR	120	B	2.77
29.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1189	C	ARG	121	B	3.75
30.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	3.32
31.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	3.43
32.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1190	O	ARG	121	B	2.62
33.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1182	CZ	ARG	121	B	3.30
34.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1183	NH1	ARG	121	B	2.90
35.	2495	CG	ARG	249	A	<-->	1183	NH1	ARG	121	B	3.69
36.	2507	O	ARG	249	A	<-->	1186	NH2	ARG	121	B	2.85
37.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1199	N	TRP	123	B	3.47
38.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1202	CB	TRP	123	B	3.57
39												

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t602 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	2571	OE2	GLU	288	A	<-->	7	ND2	ASN	1	B	3.08
2.	3323	NH1	ARG	368	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	2.98
3.	4007	N	GLY	442	A	<-->	553	O	VAL	55	B	2.73
4.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	2.91
5.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	790	O	THR	81	B	2.68
6.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	797	OD2	ASP	82	B	2.78
7.	2550	NH2	ARG	286	A	<-->	797	OD2	ASP	82	B	2.71
8.	1815	NH1	ARG	217	A	<-->	889	OD1	ASN	91	B	2.93
9.	3293	OH	TYR	366	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.00
10.	3423	OE1	GLU	379	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.75
11.	4011	O	GLY	442	A	<-->	1109	ND2	ASN	114	B	2.87
12.	3375	O	GLY	374	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	2.73
13.	3399	OD1	ASN	377	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	2.46
14.	3367	OG	SER	373	A	<-->	7564	O	MET	775	B	2.74
15.	2784	O	VAL	309	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.63
16.	2806	NH1	ARG	311	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	2.75
17.	2809	NH2	ARG	311	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	2.70
18.	3370	O	SER	373	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.85
19.	3071	OD1	ASN	340	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.85
20.	3990	NE2	GLN	439	A	<-->	7980	OE1	GLN	815	B	2.77
21.	3995	N	ALA	440	A	<-->	7980	OE1	GLN	815	B	2.95
22.	3982	O	SER	438	A	<-->	7981	NE2	GLN	815	B	2.87
23.	2630	NE2	GLN	293	A	<-->	8333	OE1	GLN	851	B	2.85
24.	2605	O	ILE	291	A	<-->	8334	NE2	GLN	851	B	2.80
25.	2592	ND2	ASN	290	A	<-->	8346	O	VAL	852	B	2.82

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	2571	OE2	GLU	288	A	<-->	5	CG	ASN	1	B	3.74
2.	2571	OE2	GLU	288	A	<-->	6	OD1	ASN	1	B	3.85
3.	2592	ND2	ASN	290	A	<-->	6	OD1	ASN	1	B	3.71
4.	2550	NH2	ARG	286	A	<-->	7	ND2	ASN	1	B	3.08
5.	2571	OE2	GLU	288	A	<-->	7	ND2	ASN	1	B	3.08
6.	3322	CZ	ARG	368	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.89
7.	3323	NH1	ARG	368	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.69
8.	3326	NH2	ARG	368	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.18

9.	3322	CZ	ARG	368	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.42
10.	3323	NH1	ARG	368	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	2.98
11.	3326	NH2	ARG	368	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	2.96
12.	3322	CZ	ARG	368	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.48
13.	3323	NH1	ARG	368	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.55
14.	3326	NH2	ARG	368	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	2.71
15.	4007	N	GLY	442	A	<-->	552	C	VAL	55	B	3.87
16.	4005	C	ALA	441	A	<-->	553	O	VAL	55	B	3.82
17.	4007	N	GLY	442	A	<-->	553	O	VAL	55	B	2.73
18.	4009	CA	GLY	442	A	<-->	553	O	VAL	55	B	3.23
19.	4003	CA	ALA	441	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.64
20.	4005	C	ALA	441	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.20
21.	4006	O	ALA	441	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.58
22.	4004	CB	ALA	441	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.34
23.	4007	N	GLY	442	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.23
24.	4009	CA	GLY	442	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.72
25.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	572	CA	ILE	58	B	3.90
26.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	577	C	ILE	58	B	3.73
27.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	577	C	ILE	58	B	2.74
28.	2531	CD	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	3.67
29.	2532	OE1	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	3.75
30.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	2.91
31.	2534	HE21	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	3.47
32.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	578	O	ILE	58	B	2.04
33.	2532	OE1	GLN	285	A	<-->	575	CG1	ILE	58	B	3.64
34.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	575	CG1	ILE	58	B	3.52
35.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	579	N	THR	59	B	3.40
36.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	581	CA	THR	59	B	3.42
37.	2534	HE21	GLN	285	A	<-->	586	C	THR	59	B	3.76
38.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	586	C	THR	59	B	3.44
39.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	587	O	THR	59	B	3.19
40.	2534	HE21	GLN	285	A	<-->	587	O	THR	59	B	2.84
41.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	587	O	THR	59	B	2.89
42.	2531	CD	GLN	285	A	<-->	769	CE2	PHE	79	B	3.38
43.	2532	OE1	GLN	285	A	<-->	769	CE2	PHE	79	B	3.58
44.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	769	CE2	PHE	79	B	3.31
45.	2534	HE21	GLN	285	A	<-->	769	CE2	PHE	79	B	3.55
46.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	769	CE2	PHE	79	B	3.53
47.	2533	NE2	GLN	285	A	<-->	770	CZ	PHE	79	B	3.46
48.	2534	HE21	GLN	285	A	<-->	770	CZ	PHE	79	B	3.34
49.	2535	HE22	GLN	285	A	<-->	770	CZ	PHE	79	B	3.66
50.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	789	C	THR	81	B	3.60
51.	2543	CD	ARG	286	A	<-->	790	O	THR	81	B	3.31
52.	2544	NE	ARG	286	A	<-->	790	O	THR	81	B	3.89
53.	2546	CZ	ARG	286	A	<-->	790	O	THR	81	B	3.63
54.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	790	O	THR	81	B	2.68
55.	2532	OE1	GLN	285	A	<-->	788	CG2	THR	81	B	3.32
56.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	791	N	ASP	82	B	3.72
57.	2546	CZ	ARG	286	A	<-->	793	CA	ASP	82	B	3.78
58.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	793	CA	ASP	82	B	3.14
59.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	794	CB	ASP	82	B	3.52
60.	2546	CZ	ARG	286	A	<-->	795	CG	ASP	82	B	3.75
61.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	795	CG	ASP	82	B	3.37
62.	2550	NH2	ARG	286	A	<-->	795	CG	ASP	82	B	3.42
63.	2550	NH2	ARG	286	A	<-->	796	OD1	ASP	82	B	3.87
64.	2546	CZ	ARG	286	A	<-->	797	OD2	ASP	82	B	3.14
65.	2547	NH1	ARG	286	A	<-->	797	OD2	ASP	82	B	2.78
66.	2550	NH2	ARG	286	A	<-->	797	OD2	ASP	82	B	2.71

Anexo IX. Interações formadas entre Cry1Aa e APN4T1. Cadeia A (Cry1Aa). Cadeia B (APN4T1).

67.	1815	NH1	ARG	217	A	<->	888	CG	ASN	91	B	3.88	125.	3403	C	ASN	377	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	2.92
68.	1815	NH1	ARG	217	A	<->	889	OD1	ASN	91	B	2.93	126.	3404	O	ASN	377	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.27
69.	2498	NH1	ARG	281	A	<->	1049	C	VAL	108	B	3.85	127.	3397	CB	ASN	377	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.37
70.	2494	CD	ARG	281	A	<->	1050	O	VAL	108	B	3.26	128.	3405	N	GLN	378	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.19
71.	2498	NH1	ARG	281	A	<->	1046	CB	VAL	108	B	3.83	129.	3407	CA	GLN	378	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.74
72.	2498	NH1	ARG	281	A	<->	1048	CG2	VAL	108	B	3.46	130.	4022	CG1	VAL	444	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.20
73.	2498	NH1	ARG	281	A	<->	1051	N	GLY	109	B	3.79	131.	4011	O	GLY	442	A	<->	1107	CG	ASN	114	B	3.84
74.	2494	CD	ARG	281	A	<->	1053	CA	GLY	109	B	3.67	132.	4010	C	GLY	442	A	<->	1109	ND2	ASN	114	B	3.47
75.	2495	NE	ARG	281	A	<->	1053	CA	GLY	109	B	3.78	133.	4011	O	GLY	442	A	<->	1109	ND2	ASN	114	B	2.87
76.	2497	CD	ARG	281	A	<->	1053	CA	GLY	109	B	3.89	134.	4015	CB	ALA	443	A	<->	1109	ND2	ASN	114	B	3.38
77.	2498	NH1	ARG	281	A	<->	1053	CA	GLY	109	B	3.70	135.	3375	O	GLY	374	A	<->	1182	CE1	TYR	121	B	3.31
78.	4022	CG1	VAL	444	A	<->	1072	O	ARG	110	B	3.64	136.	3375	O	GLY	374	A	<->	1185	CZ	TYR	121	B	3.46
79.	4023	CG2	VAL	444	A	<->	1072	O	ARG	110	B	3.66	137.	3374	C	GLY	374	A	<->	1186	OH	TYR	121	B	3.69
80.	4036	OH	TYR	445	A	<->	1060	CG	ARG	110	B	3.74	138.	3375	O	GLY	374	A	<->	1186	OH	TYR	121	B	2.73
81.	3323	NH1	ARG	368	A	<->	1061	CD	ARG	110	B	3.51	139.	3387	CG	ASN	376	A	<->	1202	O	LYS	122	B	3.83
82.	3422	CD	GLU	379	A	<->	1061	CD	ARG	110	B	3.34	140.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1202	O	LYS	122	B	3.85
83.	3423	OE1	GLU	379	A	<->	1061	CD	ARG	110	B	3.38	141.	3399	OD1	ASN	377	A	<->	1195	CD	LYS	122	B	3.74
84.	3424	OE2	GLU	379	A	<->	1061	CD	ARG	110	B	3.31	142.	3399	OD1	ASN	377	A	<->	1196	CE	LYS	122	B	3.63
85.	3323	NH1	ARG	368	A	<->	1062	NE	ARG	110	B	3.10	143.	3398	CG	ASN	377	A	<->	1197	NZ	LYS	122	B	3.67
86.	3424	OE2	GLU	379	A	<->	1062	NE	ARG	110	B	3.75	144.	3399	OD1	ASN	377	A	<->	1197	NZ	LYS	122	B	2.46
87.	3323	NH1	ARG	368	A	<->	1064	CZ	ARG	110	B	3.01	145.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1212	CG	TYR	124	B	3.79
88.	3423	OE1	GLU	379	A	<->	1064	CZ	ARG	110	B	3.81	146.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1213	CG	TYR	124	B	3.74
89.	3424	OE2	GLU	379	A	<->	1064	CZ	ARG	110	B	3.51	147.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1215	CD2	TYR	124	B	3.49
90.	3293	OH	TYR	366	A	<->	1065	NH1	ARG	110	B	3.00	148.	3389	ND2	ASN	376	A	<->	1215	CD2	TYR	124	B	3.78
91.	3323	NH1	ARG	368	A	<->	1065	NH1	ARG	110	B	3.31	149.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1214	CE1	TYR	124	B	3.40
92.	3422	CD	GLU	379	A	<->	1065	NH1	ARG	110	B	3.10	150.	3354	CD1	LEU	371	A	<->	1216	CE2	TYR	124	B	3.72
93.	3423	OE1	GLU	379	A	<->	1065	NH1	ARG	110	B	3.75	151.	3387	CG	ASN	376	A	<->	1216	CE2	TYR	124	B	3.76
94.	3424	OE2	GLU	379	A	<->	1065	NH1	ARG	110	B	2.75	152.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1216	CE2	TYR	124	B	3.13
95.	3323	NH1	ARG	368	A	<->	1068	NH2	ARG	110	B	3.43	153.	3389	ND2	ASN	376	A	<->	1216	CE2	TYR	124	B	3.63
96.	4022	CG1	VAL	444	A	<->	1081	O	ILE	111	B	3.44	154.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1217	CZ	TYR	124	B	3.08
97.	4022	CG1	VAL	444	A	<->	1084	CA	ASN	112	B	3.77	155.	2809	NH2	ARG	311	A	<->	1218	OH	TYR	124	B	3.82
98.	4011	O	GLY	442	A	<->	1085	CB	ASN	112	B	3.69	156.	3354	CD1	LEU	371	A	<->	1218	OH	TYR	124	B	3.58
99.	4011	O	GLY	442	A	<->	1086	CG	ASN	112	B	3.75	157.	3388	OD1	ASN	376	A	<->	1218	OH	TYR	124	B	3.60
100.	4009	CA	GLY	442	A	<->	1088	ND2	ASN	112	B	3.73	158.	3389	ND2	ASN	376	A	<->	1316	CE1	TYR	133	B	3.80
101.	4011	O	GLY	442	A	<->	1088	ND2	ASN	112	B	3.62	159.	3399	OD1	ASN	377	A	<->	1320	OH	TYR	133	B	3.43
102.	4015	CB	ALA	443	A	<->	1102	O	GLU	113	B	3.21	160.	3367	OG	SER	373	A	<->	7563	C	MET	775	B	3.47
103.	3378	CA	PRO	375	A	<->	1096	CB	GLU	113	B	3.64	161.	3094	ND2	ASN	343	A	<->	7564	O	MET	775	B	3.45
104.	3383	N	ASN	376	A	<->	1096	CB	GLU	113	B	3.57	162.	3365	CA	SER	373	A	<->	7564	O	MET	775	B	3.48
105.	3383	N	ASN	376	A	<->	1097	CG	GLU	113	B	3.40	163.	3369	C	SER	373	A	<->	7564	O	MET	775	B	3.18
106.	3386	CB	ASN	376	A	<->	1097	CG	GLU	113	B	3.68	164.	3370	O	SER	373	A	<->	7564	O	MET	775	B	2.82
107.	3394	N	ASN	377	A	<->	1097	CG	GLU	113	B	3.80	165.	3366	CB	SER	373	A	<->	7564	O	MET	775	B	3.12
108.	3383	N	ASN	376	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.23	166.	3367	OG	SER	373	A	<->	7564	O	MET	775	B	2.74
109.	3394	N	ASN	377	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.08	167.	3098	O	ASN	343	A	<->	7559	CB	MET	775	B	3.74
110.	3396	CA	ASN	377	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.83	168.	3094	ND2	ASN	343	A	<->	7559	CB	MET	775	B	3.79
111.	3403	C	ASN	377	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.68	169.	3098	O	ASN	343	A	<->	7560	CG	MET	775	B	3.28
112.	3405	N	GLN	378	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.57	170.	3094	ND2	ASN	343	A	<->	7561	SD	MET	775	B	3.20
113.	4022	CG1	VAL	444	A	<->	1098	CD	GLU	113	B	3.55	171.	3367	OG	SER	373	A	<->	7565	N	TYR	776	B	3.73
114.	3378	CA	PRO	375	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.30	172.	3367	OG	SER	373	A	<->	7567	CA	TYR	776	B	3.31
115.	3381	C	PRO	375	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.58	173.	3367	OG	SER	373	A	<->	7568	CB	TYR	776	B	3.80
116.	3379	CB	PRO	375	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.45	174.	3367	OG	SER	373	A	<->	7569	CG	TYR	776	B	3.13
117.	3383	N	ASN	376	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	2.91	175.	3367	OG	SER	373	A	<->	7570	CD1	TYR	776	B	3.30
118.	3394	N	ASN	377	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.32	176.	3367	OG	SER	373	A	<->	7572	CD2	TYR	776	B	3.26
119.	3403	C	ASN	377	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.79	177.	3367	OG	SER	373	A	<->	7571	CE1	TYR	776	B	3.58
120.	3405	N	GLN	378	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.23	178.	2802	CD	ARG	311	A	<->	7573	CE2	TYR	776	B	3.66
121.	3407	CA	GLN	378	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.50	179.	3367	OG	SER	373	A	<->	7573	CE2	TYR	776	B	3.55
122.	3408	CB	GLN	378	A	<->	1099	OE1	GLU	113	B	3.54	180.	2784	O	VAL	309	A	<->	7574	CZ	TYR	776	B	3.62
123.	3394	N	ASN	377	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	2.90	181.	3367	OG	SER	373	A	<->	7574	CZ	TYR	776	B	3.69
124.	3396	CA	ASN	377	A	<->	1100	OE2	GLU	113	B	3.18	182.	2783	C	VAL	309	A	<->	7575	OH	TYR	776	B	3.69

Anexo IX. Continuação.

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t604 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1072	O	ARG	110	B	2.74
2.	2471	O	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.01
3.	2468	OG	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.67
4.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1081	O	ILE	111	B	2.84
5.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	2.93
6.	4028	ND2	ASN	410	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	2.92
7.	4033	N	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.99
8.	4037	OG	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.87
9.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.11
10.	2496	NH2	ARG	249	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.70
11.	4021	O	SER	409	A	<-->	1109	ND2	ASN	114	B	2.84
12.	3326	NE	ARG	337	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.10
13.	3332	NH2	ARG	337	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.67
14.	3343	O	PRO	338	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.00
15.	3362	ND2	ASN	340	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.85
16.	2775	NH2	ARG	279	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	2.57
17.	2769	NE	ARG	279	A	<-->	7874	OE2	GLU	805	B	2.86
18.	3418	OE1	GLN	346	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.78
19.	4095	NH2	ARG	417	A	<-->	7931	O	PHE	810	B	2.89
20.	3419	NE2	GLN	346	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	2.86
21.	4018	OG	SER	409	A	<-->	7985	O	GLN	815	B	2.88
22.	3997	N	GLY	407	A	<-->	7980	OE1	GLY	815	B	2.93
23.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	2.63
24.	3395	OD1	ASN	344	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	2.94
25.	3375	O	ILE	341	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	2.65
26.	3066	OD1	ASN	311	A	<-->	8322	ND2	ASN	850	B	2.72
27.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8333	OE1	GLN	851	B	2.67
12.	2467	CB	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.26
13.	2468	OG	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.67
14.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1080	C	ILE	111	B	3.31
15.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1081	O	ILE	111	B	2.84
16.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1082	N	ASN	112	B	3.72
17.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1084	CA	ASN	112	B	3.58
18.	4028	ND2	ASN	410	A	<-->	1086	CG	ASN	112	B	3.45
19.	2499	CD	ARG	249	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	3.80
20.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	3.72
21.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	2.93
22.	4026	CG	ASN	410	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	3.85
23.	4028	ND2	ASN	410	A	<-->	1087	OD1	ASN	112	B	2.92
24.	4028	ND2	ASN	410	A	<-->	1088	ND2	ASN	112	B	3.21
25.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.69
26.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.49
27.	2496	NH2	ARG	249	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.09
28.	4037	OG	SER	411	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.60
29.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.19
30.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.18
31.	2496	NH2	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.75
32.	4033	N	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.99
33.	4035	CA	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.48
34.	4036	CB	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.74
35.	4037	OG	SER	411	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.87
36.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.34
37.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.11
38.	2496	NH2	ARG	249	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.70
39.	4021	O	SER	409	A	<-->	1109	ND2	ASN	114	B	2.84
40.	3886	CG1	ILE	343	A	<-->	1120	O	PRO	115	B	3.85
41.	3886	CG1	ILE	343	A	<-->	1118	CG	PRO	115	B	3.74
42.	3884	CB	ILE	343	A	<-->	1128	CE1	PHE	116	B	3.85
43.	3886	CG1	ILE	343	A	<-->	1128	CE1	PHE	116	B	3.54
44.	3884	CB	ILE	343	A	<-->	1130	CZ	PHE	116	B	3.52
45.	3886	CG1	ILE	343	A	<-->	1130	CZ	PHE	116	B	3.63
46.	3889	O	ILE	343	A	<-->	1148	NE	ARG	118	B	3.08
47.	3886	CG1	ILE	343	A	<-->	1148	NE	ARG	118	B	3.65
48.	3885	CG2	ILE	343	A	<-->	1148	NE	ARG	118	B	3.55
49.	3889	O	ILE	343	A	<-->	1150	CZ	ARG	118	B	2.73
50.	3885	CG2	ILE	343	A	<-->	1150	CZ	ARG	118	B	3.87
51.	3889	O	ILE	343	A	<-->	1151	NH1	ARG	118	B	3.19
52.	3395	OD1	ASN	344	A	<-->	1151	NH1	ARG	118	B	3.72
53.	4018	OG	SER	409	A	<-->	1151	NH1	ARG	118	B	3.79
54.	3888	C	ILE	343	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.77
55.	3889	O	ILE	343	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	2.82
56.	3885	CG2	ILE	343	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.41
57.	3394	CG	ASN	344	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.87
58.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.61
59.	3362	ND2	ASN	340	A	<-->	7555	O	SER	774	B	3.76
60.	3362	ND2	ASN	340	A	<-->	7558	CA	MET	775	B	3.68
61.	3359	CB	ASN	340	A	<-->	7559	CB	MET	775	B	3.24
62.	3343	O	PRO	338	A	<-->	7560	CG	MET	775	B	3.88
63.	3342	C	PRO	338	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.90
64.	3343	O	PRO	338	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.32
65.	3342	C	PRO	338	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.68
66.	3343	O	PRO	338	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.66
67.	3344	N	PHE	339	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.78
68.	3346	CA	PHE	339	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.80
69.	3354	C	PHE	339	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.56
70.	3355	O	PHE	339	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.43
71.	3359	CB	ASN	340	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.78
72.	3400	O	ASN	344	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.45

Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 ----->					<----- A T O M 2 ----->							
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance		
1.	4028	ND2	ASN	410	A	<-->	566	OG	SER	57	B	3.70
2.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1071	C	ARG	110	B	3.22
3.	2489	CD	ARG	249	A	<-->	1072	O	ARG	110	B	3.62
4.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1072	O	ARG	110	B	3.71
5.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1072	O	ARG	110	B	2.74
6.	2490	NE	ARG	249	A	<-->	1059	CB	ARG	110	B	3.85
7.	2492	CZ	ARG	249	A	<-->	1059	CB	ARG	110	B	3.76
8.	2493	NH1	ARG	249	A	<-->	1059	CB	ARG	110	B	3.75
9.	2468	OG	SER	247	A	<-->	1064	CZ	ARG	110	B	3.76
10.	2470	C	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.84
11.	2471	O	SER	247	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.01

Anexo X. Interações formadas entre Cry1Ab e APN4TI. Cadeia A (Cry1Ab). Cadeia B (APN4TI).

195.	3394	CG	ASN	344	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.68
196.	3395	OD1	ASN	344	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.34
197.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.30
198.	3420	HE21	GLN	346	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.15
199.	3394	CG	ASN	344	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.05
200.	3395	OD1	ASN	344	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	2.98
201.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	2.63
202.	3394	CG	ASN	344	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.58
203.	3395	OD1	ASN	344	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	2.94
204.	3396	ND2	ASN	344	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.49
205.	3416	CG	GLN	346	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.40
206.	3417	CD	GLN	346	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.83
207.	3419	NE2	GLN	346	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.24
208.	3420	HE21	GLN	346	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	2.39
209.	4053	CG1	VAL	413	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.31
210.	3375	O	ILE	341	A	<-->	8003	CE1	TYR	817	B	3.70
211.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	8005	CE2	TYR	817	B	3.62
212.	3375	O	ILE	341	A	<-->	8006	CZ	TYR	817	B	3.58
213.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	8006	CZ	TYR	817	B	3.71
214.	3374	C	ILE	341	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.61
215.	3375	O	ILE	341	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	2.65
216.	3378	CA	GLY	342	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.84
217.	3381	N	ILE	343	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.54
218.	3385	CG2	ILE	343	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.35
219.	3371	CG2	ILE	341	A	<-->	8086	CG2	VAL	826	B	3.89
220.	3060	O	GLY	310	A	<-->	8283	CE1	PHE	846	B	3.87
221.	3063	CA	ASN	311	A	<-->	8283	CE1	PHE	846	B	3.51
222.	3070	C	ASN	311	A	<-->	8283	CE1	PHE	846	B	3.62
223.	3071	O	ASN	311	A	<-->	8283	CE1	PHE	846	B	3.19
224.	3063	CA	ASN	311	A	<-->	8285	CZ	PHE	846	B	3.49
225.	3070	C	ASN	311	A	<-->	8285	CZ	PHE	846	B	3.45
226.	3071	O	ASN	311	A	<-->	8285	CZ	PHE	846	B	3.31
227.	3064	CB	ASN	311	A	<-->	8285	CZ	PHE	846	B	3.65
228.	3066	OD1	ASN	311	A	<-->	8320	CG	ASN	850	B	3.87
229.	3044	CG2	THR	308	A	<-->	8322	ND2	ASN	850	B	3.75
230.	3065	CG	ASN	311	A	<-->	8322	ND2	ASN	850	B	3.75
231.	3066	OD1	ASN	311	A	<-->	8322	ND2	ASN	850	B	2.72
232.	3037	O	GLY	307	A	<-->	8330	CB	GLN	851	B	3.69
233.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8330	CB	GLN	851	B	3.63
234.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8332	CD	GLN	851	B	3.65
235.	3980	CZ	ARG	405	A	<-->	8333	OE1	GLN	851	B	3.73
236.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8333	OE1	GLN	851	B	2.67
237.	3037	O	GLY	307	A	<-->	8339	N	VAL	852	B	3.84
238.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8339	N	VAL	852	B	3.69
239.	3984	NH2	ARG	405	A	<-->	8341	CA	VAL	852	B	3.68
240.	3037	O	GLY	307	A	<-->	8342	CB	VAL	852	B	3.57
241.	3042	OG1	THR	308	A	<-->	8342	CB	VAL	852	B	3.68
242.	3978	NE	ARG	405	A	<-->	8342	CB	VAL	852	B	3.87
243.	3042	OG1	THR	308	A	<-->	8343	CG1	VAL	852	B	3.26
244.	3044	CG2	THR	308	A	<-->	8343	CG1	VAL	852	B	3.49
245.	4089	NE	ARG	417	A	<-->	8343	CG1	VAL	852	B	3.75
246.	4095	NH2	ARG	417	A	<-->	8343	CG1	VAL	852	B	3.57
247.	3976	CG	ARG	405	A	<-->	8344	CG2	VAL	852	B	3.66
248.	3978	NE	ARG	405	A	<-->	8344	CG2	VAL	852	B	3.57

Number of hydrogen bonds: 27

Number of non-bonded contacts: 248

Anexo X. Continuação.

List of atom-atom interactions across protein-protein interface

PDB code: t605 Chains A }{ B

Hydrogen bonds

<----- A T O M 1 ----->										<----- A T O M 2 ----->															
Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance	Atom no.	Atom name	Res name	Res no.	Chain	Distance									
1.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	268	O	SER	27	B	2.72	2.	3397	C	ILE	341	A	<-->	259	C	LEU	26	B	3.86
2.	3379	N	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	2.94	3.	3398	O	ILE	341	A	<-->	260	O	LEU	26	B	3.53
3.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.04	4.	3399	N	GLY	342	A	<-->	260	O	LEU	26	B	3.19
4.	3366	O	PRO	338	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.69	5.	3401	CA	GLY	342	A	<-->	260	O	LEU	26	B	3.50
5.	3366	O	PRO	338	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.26	6.	3402	C	GLY	342	A	<-->	260	O	LEU	26	B	3.09
6.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1081	O	ILE	111	B	2.83	7.	3401	CA	GLY	342	A	<-->	263	CA	SER	27	B	3.90
7.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.66	8.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	267	C	SER	27	B	3.80
8.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.93	9.	3401	CA	GLY	342	A	<-->	267	C	SER	27	B	3.65
9.	4084	OG	SER	414	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.90	10.	3383	CG	ASN	340	A	<-->	268	O	SER	27	B	3.88
10.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.86	11.	3384	OD1	ASN	340	A	<-->	268	O	SER	27	B	3.33
11.	4072	N	VAL	413	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.84	12.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	268	O	SER	27	B	3.40
12.	4080	N	SER	414	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.97	13.	3399	N	GLY	342	A	<-->	268	O	SER	27	B	2.72
13.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	2.66	14.	3401	CA	GLY	342	A	<-->	268	O	SER	27	B	3.25
14.	4064	N	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.00	15.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	271	CA	GLU	28	B	3.41
15.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	2.79	16.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	273	CG	GLU	28	B	3.84
16.	3398	O	ILE	341	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	2.45	17.	3375	CE2	PHE	339	A	<-->	273	CG	GLU	28	B	3.82
17.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	2.69	18.	3376	CZ	PHE	339	A	<-->	273	CG	GLU	28	B	3.87
18.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	2.77	19.	3377	C	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.77
19.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1278	O	ASP	129	B	2.73	20.	3370	CB	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.67
20.	3419	ND2	ASN	344	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	2.87	21.	3371	CG	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.85
21.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	2.83	22.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.37
22.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7497	ND1	HIS	769	B	2.68	23.	3373	CD2	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.40
23.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	2.81	24.	3373	CD2	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.75
24.	3070	N	MET	309	A	<-->	7542	OE1	GLN	773	B	3.11	25.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.80
25.	4051	ND2	ASN	410	A	<-->	7564	O	MET	775	B	2.81	26.	3379	N	ASN	340	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.41
26.	4016	OG	SER	406	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.74	27.	3381	CA	ASN	340	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.49
27.	4105	O	ILE	416	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.74	28.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	274	CD	GLU	28	B	3.50
28.	4123	N	ALA	418	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.24	29.	3377	C	PHE	339	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.56
29.	4068	OG	SER	412	A	<-->	7585	ND2	ASN	777	B	2.78	30.	3370	CB	PHE	339	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.46
30.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	3.01	31.	3371	CG	PHE	339	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.36
31.	2761	OD2	ASP	276	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.67	32.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.85
32.	2842	OH	TYR	283	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.62	33.	3373	CD2	PHE	339	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.63
33.	3065	OG1	THR	308	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.67	34.	3379	N	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	2.94
34.	3078	O	MET	309	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.69	35.	3381	CA	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.12
35.	4037	N	SER	409	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.86	36.	3382	CB	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.48
36.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.90	37.	3383	CG	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.79
37.	4007	NH2	ARG	405	A	<-->	7908	O	GLN	808	B	2.68	38.	3385	ND2	ASN	340	A	<-->	275	OE1	GLU	28	B	3.04
38.	2552	O	ILE	255	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.79	39.	3377	C	PHE	339	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.05
39.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.83	40.	3378	O	PHE	339	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.19
40.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7920	N	PHE	810	B	3.02	41.	3371	CG	PHE	339	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.51
41.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	3.24	42.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.14
42.	2520	O	SER	251	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	2.82	43.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.65
43.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	2.80	44.	3379	N	ASN	340	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.11
													45.	3381	CA	ASN	340	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.14
													46.	3390	N	ILE	341	A	<-->	276	OE2	GLU	28	B	3.87
													47.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	286	O	SER	29	B	3.57
													48.	3395	CG1	ILE	341	A	<-->	282	CB	SER	29	B	3.51
													49.	3395	CG1	ILE	341	A	<-->	283	OG	SER	29	B	3.65
													50.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	1060	CG	ARG	110	B	3.77
													51.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	1062	NE	ARG	110	B	3.56
													52.	3374	CE1	PHE	339	A	<-->	1062	NE	ARG	110	B	3.38
													53.	3366	O	PRO	338	A	<-->	1064	CZ	ARG	110	B	3.53
													54.	3369	CA	PHE	339	A	<-->	1064	CZ	ARG	110	B	3.41
													55.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	1064	CZ	ARG	110	B	3.69
													56.	3365	C	PRO	338	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.34
																									3.75

Non-bonded contacts

Anexo XI. Interações formadas entre Cry1Ac e APN4TI. Cadeia A (Cry1Ac). Cadeia B (APN4TI).

57.	3366	O	PRO	338	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.69	118.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1185	CZ	TYR	121	B	3.20
58.	3369	CA	PHE	339	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.54	119.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1185	CZ	TYR	121	B	3.31
59.	3378	O	PHE	339	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.54	120.	4058	CA	SER	411	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.89
60.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.81	121.	4059	CB	SER	411	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.72
61.	3454	NE2	GLN	347	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.11	122.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	2.66
62.	3455	HE21	GLN	347	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	3.24	123.	4064	N	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.00
63.	3456	HE22	GLN	347	A	<-->	1065	NH1	ARG	110	B	2.87	124.	4066	CA	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.75
64.	3365	C	PRO	338	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.88	125.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	3.43
65.	3366	O	PRO	338	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.26	126.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1186	OH	TYR	121	B	2.79
66.	3367	N	PHE	339	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.88	127.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1202	O	LYS	122	B	3.61
67.	3369	CA	PHE	339	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.47	128.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1202	O	LYS	122	B	3.78
68.	3370	CB	PHE	339	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.87	129.	3398	O	ILE	341	A	<-->	1196	CE	LYS	122	B	3.53
69.	3371	CG	PHE	339	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.88	130.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1196	CE	LYS	122	B	3.58
70.	3372	CD1	PHE	339	A	<-->	1068	NH2	ARG	110	B	3.60	131.	3397	C	ILE	341	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	3.57
71.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1081	O	ILE	111	B	3.81	132.	3398	O	ILE	341	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	2.45
72.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1081	O	ILE	111	B	2.83	133.	3402	C	GLY	342	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	3.82
73.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1093	N	GLU	113	B	3.70	134.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1197	NZ	LYS	122	B	2.69
74.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1096	CB	GLU	113	B	3.71	135.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1208	N	TYR	124	B	3.78
75.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1096	CB	GLU	113	B	3.47	136.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1212	CG	TYR	124	B	3.81
76.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1097	CG	GLU	113	B	3.37	137.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1213	CD1	TYR	124	B	3.42
77.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1097	CG	GLU	113	B	3.62	138.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1215	CD2	TYR	124	B	3.86
78.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.82	139.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1214	CEL	TYR	124	B	3.83
79.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.59	140.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1214	CEL	TYR	124	B	3.50
80.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.57	141.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	3.50
81.	4072	N	VAL	413	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.58	142.	3443	HE21	GLN	346	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	2.75
82.	4077	CG2	VAL	413	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.67	143.	4066	CA	SER	412	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	3.84
83.	4080	N	SER	414	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.61	144.	4070	C	SER	412	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	3.54
84.	4084	OG	SER	414	A	<-->	1098	CD	GLU	113	B	3.64	145.	4071	O	SER	412	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	3.35
85.	2499	CZ	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.15	146.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1216	CE2	TYR	124	B	3.73
86.	2500	NH1	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.66	147.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	1217	CZ	TYR	124	B	3.52
87.	2503	NH2	ARG	249	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.93	148.	3443	HE21	GLN	346	A	<-->	1217	CZ	TYR	124	B	2.75
88.	4077	CG2	VAL	413	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.09	149.	3444	HE22	GLN	346	A	<-->	1217	CZ	TYR	124	B	3.65
89.	4080	N	SER	414	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.45	150.	4066	CA	SER	412	A	<-->	1217	CZ	TYR	124	B	3.54
90.	4083	CB	SER	414	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	3.72	151.	4070	C	SER	412	A	<-->	1217	CZ	TYR	124	B	3.58
91.	4084	OG	SER	414	A	<-->	1099	OE1	GLU	113	B	2.90	152.	4071	O	SER	412	A	<-->	1217	CG	TYR	124	B	3.27
92.	4058	CA	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.78	153.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1217	CG	TYR	124	B	3.72
93.	4062	C	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.26	154.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	2.77
94.	4063	O	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.64	155.	3443	HE21	GLN	346	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	2.05
95.	4059	CB	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.20	156.	3444	HE22	GLN	346	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	2.75
96.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.86	157.	4066	CA	SER	412	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	3.65
97.	4064	N	SER	412	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.18	158.	4070	C	SER	412	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	3.47
98.	4066	CA	SER	412	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.61	159.	4071	O	SER	412	A	<-->	1218	OH	TYR	124	B	2.77
99.	4070	C	SER	412	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.59	160.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1277	C	ASP	129	B	3.70
100.	4067	CB	SER	412	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.82	161.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1278	O	ASP	129	B	3.90
101.	4072	N	VAL	413	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.84	162.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1278	O	ASP	129	B	2.73
102.	4074	CA	VAL	413	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.73	163.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1281	CA	GLU	130	B	3.35
103.	4078	C	VAL	413	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.84	164.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1284	CD	GLU	130	B	3.54
104.	4080	N	SER	414	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	2.97	165.	2791	NH1	ARG	279	A	<-->	1284	CD	GLU	130	B	3.13
105.	4083	CB	SER	414	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.73	166.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1284	CD	GLU	130	B	3.06
106.	4084	OG	SER	414	A	<-->	1100	OE2	GLU	113	B	3.73	167.	3415	CA	ASN	344	A	<-->	1284	CD	GLU	130	B	3.70
107.	4041	OG	SER	409	A	<-->	1147	CD	ARG	118	B	3.80	168.	3419	ND2	ASN	344	A	<-->	1284	CD	GLU	130	B	3.52
108.	4040	CB	SER	409	A	<-->	1148	NE	ARG	118	B	3.79	169.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	3.21
109.	4041	OG	SER	409	A	<-->	1148	NE	ARG	118	B	3.00	170.	2791	NH1	ARG	279	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	2.82
110.	4040	CB	SER	409	A	<-->	1150	CZ	ARG	118	B	3.77	171.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	2.76
111.	4041	OG	SER	409	A	<-->	1150	CZ	ARG	118	B	3.02	172.	3415	CA	ASN	344	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	3.54
112.	4041	OG	SER	409	A	<-->	1151	NH1	ARG	118	B	3.73	173.	3416	CB	ASN	344	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	3.42
113.	4031	CD2	PHE	408	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.31	174.	3417	CG	ASN	344	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	3.56
114.	4033	CE2	PHE	408	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.38	175.	3419	ND2	ASN	344	A	<-->	1285	OE1	GLU	130	B	2.87
115.	4041	OG	SER	409	A	<-->	1154	NH2	ARG	118	B	3.13	176.	2790	CZ	ARG	279	A	<-->	1286	OE2	GLU	130	B	3.21
116.	4060	OG	SER	411	A	<-->	1182	CE1	TYR	121	B	2.86	177.	2791	NH1	ARG	279	A	<-->	1286	OE2	GLU	130	B	2.68
117.	4068	OG	SER	412	A	<-->	1184	CE2	TYR	121	B	3.83	178.	2794	NH2	ARG	279	A	<-->	1286	OE2	GLU	130	B	3.06

Anexo XI. Continuação.

179.	3415	CA	ASN	344	A	<-->	1286	OE2	GLU	130	B	3.54	240.	4050	OD1	ASN	410	A	<-->	7564	O	MET	775	B	2.97
180.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1317	CD2	TYR	133	B	3.88	241.	4051	ND2	ASN	410	A	<-->	7564	O	MET	775	B	2.81
181.	3408	CG2	ILE	343	A	<-->	1317	CD2	TYR	133	B	3.78	242.	4050	OD1	ASN	410	A	<-->	7559	CB	MET	775	B	3.73
182.	4076	CG1	VAL	413	A	<-->	1316	CE1	TYR	133	B	3.84	243.	4024	O	GLY	407	A	<-->	7560	CG	MET	775	B	3.80
183.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1318	CE2	TYR	133	B	3.08	244.	4024	O	GLY	407	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.13
184.	3406	CA	ILE	343	A	<-->	1318	CE2	TYR	133	B	3.24	245.	4027	CA	PHE	408	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.57
185.	3411	C	ILE	343	A	<-->	1318	CE2	TYR	133	B	3.56	246.	4028	CB	PHE	408	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.81
186.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1318	CE2	TYR	133	B	3.06	247.	4030	CD1	PHE	408	A	<-->	7561	SD	MET	775	B	3.18
187.	3408	CG2	ILE	343	A	<-->	1318	CE2	TYR	133	B	3.89	248.	4024	O	GLY	407	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.10
188.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1319	CZ	TYR	133	B	3.58	249.	4028	CB	PHE	408	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.76
189.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1319	CZ	TYR	133	B	3.31	250.	4030	CD1	PHE	408	A	<-->	7562	CE	MET	775	B	3.76
190.	3403	O	GLY	342	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	3.39	251.	4016	OG	SER	406	A	<-->	7571	CE1	TYR	776	B	3.75
191.	3411	C	ILE	343	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	3.79	252.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7571	CE1	TYR	776	B	3.08
192.	3412	O	ILE	343	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	2.83	253.	4104	C	ILE	416	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.57
193.	3434	O	ASN	345	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	3.60	254.	4105	O	ILE	416	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.08
194.	4076	CG1	VAL	413	A	<-->	1320	OH	TYR	133	B	3.16	255.	4106	N	ARG	417	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.83
195.	3029	CB	PRO	304	A	<-->	7465	CB	THR	765	B	3.75	256.	4108	CA	ARG	417	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.55
196.	3030	CG	PRO	304	A	<-->	7465	CB	THR	765	B	3.56	257.	4109	CB	ARG	417	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.84
197.	3030	CG	PRO	304	A	<-->	7468	CG2	THR	765	B	3.77	258.	4110	CG	ARG	417	A	<-->	7573	CE2	TYR	776	B	3.55
198.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7503	O	HIS	769	B	3.63	259.	4016	OG	SER	406	A	<-->	7574	CZ	TYR	776	B	3.40
199.	3041	O	LEU	305	A	<-->	7496	CG	HIS	769	B	3.88	260.	4105	O	ILE	416	A	<-->	7574	CZ	TYR	776	B	3.15
200.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7496	CG	HIS	769	B	3.87	261.	4108	CA	ARG	417	A	<-->	7574	CZ	TYR	776	B	3.83
201.	3059	C	GLY	307	A	<-->	7497	ND1	HIS	769	B	3.83	262.	4114	CZ	ARG	417	A	<-->	7574	CZ	TYR	776	B	3.84
202.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7497	ND1	HIS	769	B	2.68	263.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7574	CZ	TYR	776	B	2.97
203.	3039	CD2	LEU	305	A	<-->	7501	CE1	HIS	769	B	3.73	264.	4015	CB	SER	406	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.88
204.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7501	CE1	HIS	769	B	3.11	265.	4016	OG	SER	406	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.74
205.	3068	C	THR	308	A	<-->	7501	CE1	HIS	769	B	3.78	266.	4104	C	ILE	416	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.65
206.	3070	N	MET	309	A	<-->	7501	CE1	HIS	769	B	3.75	267.	4105	O	ILE	416	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.74
207.	3039	CD2	LEU	305	A	<-->	7500	NE2	HIS	769	B	3.71	268.	4108	CA	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.15
208.	3059	C	GLY	307	A	<-->	7530	CB	ASP	772	B	3.77	269.	4121	C	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.73
209.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7530	CB	ASP	772	B	3.59	270.	4110	CG	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.72
210.	3058	CA	GLY	307	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.54	271.	4111	CD	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.43
211.	3059	C	GLY	307	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.56	272.	4114	CZ	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.71
212.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.88	273.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	2.72
213.	4114	CZ	ARG	417	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.72	274.	4123	N	ALA	418	A	<-->	7575	OH	TYR	776	B	3.24
214.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.41	275.	4062	C	SER	411	A	<-->	7582	CB	ASN	777	B	3.72
215.	4118	NH2	ARG	417	A	<-->	7531	CG	ASP	772	B	3.09	276.	4064	N	SER	412	A	<-->	7582	CB	ASN	777	B	3.60
216.	3058	CA	GLY	307	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.68	277.	4064	N	SER	412	A	<-->	7583	CG	ASN	777	B	3.72
217.	3059	C	GLY	307	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.40	278.	4068	OG	SER	412	A	<-->	7583	CG	ASN	777	B	3.81
218.	3060	O	GLY	307	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.88	279.	4064	N	SER	412	A	<-->	7585	ND2	ASN	777	B	3.53
219.	3061	N	THR	308	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.38	280.	4066	CA	SER	412	A	<-->	7585	ND2	ASN	777	B	3.39
220.	3067	CG2	THR	308	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.11	281.	4067	CB	SER	412	A	<-->	7585	ND2	ASN	777	B	3.64
221.	4114	CZ	ARG	417	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.34	282.	4068	OG	SER	412	A	<-->	7585	ND2	ASN	777	B	2.78
222.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	3.23	283.	2775	ND1	HIS	278	A	<-->	7593	CB	ASP	778	B	3.84
223.	4118	NH2	ARG	417	A	<-->	7532	OD1	ASP	772	B	2.72	284.	2779	CE1	HIS	278	A	<-->	7593	CB	ASP	778	B	3.55
224.	3058	CA	GLY	307	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	3.64	285.	3444	HE22	GLN	346	A	<-->	7594	CG	ASP	778	B	3.22
225.	3977	CB	MET	403	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	3.47	286.	2775	ND1	HIS	278	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	3.72
226.	3978	CG	MET	403	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	3.77	287.	3442	NE2	GLN	346	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	3.01
227.	4114	CZ	ARG	417	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	3.24	288.	3443	HE21	GLN	346	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	3.26
228.	4115	NH1	ARG	417	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	2.81	289.	3444	HE22	GLN	346	A	<-->	7596	OD2	ASP	778	B	2.10
229.	4118	NH2	ARG	417	A	<-->	7533	OD2	ASP	772	B	2.80	290.	3064	CB	THR	308	A	<-->	7603	CG	LYS	779	B	3.74
230.	3063	CA	THR	308	A	<-->	7540	CG	GLN	773	B	3.83	291.	3064	CB	THR	308	A	<-->	7604	CD	LYS	779	B	3.66
231.	3067	CG2	THR	308	A	<-->	7540	CG	GLN	773	B	3.74	292.	3065	OG1	THR	308	A	<-->	7604	CD	LYS	779	B	3.51
232.	3063	CA	THR	308	A	<-->	7542	OE1	GLN	773	B	3.47	293.	2761	OD2	ASP	276	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.79
233.	3068	C	THR	308	A	<-->	7542	OE1	GLN	773	B	3.76	294.	2778	NE2	HIS	278	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.65
234.	3064	CB	THR	308	A	<-->	7542	OE1	GLN	773	B	3.60	295.	3064	CB	THR	308	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.89
235.	3070	N	MET	309	A	<-->	7542	OE1	GLN	773	B	3.11	296.	3065	OG1	THR	308	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.37
236.	4050	OD1	ASN	410	A	<-->	7563	C	MET	775	B	3.86	297.	3078	O	MET	309	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.34
237.	4051	ND2	ASN	410	A	<-->	7563	C	MET	775	B	3.73	298.	3090	ND2	ASN	311	A	<-->	7605	CE	LYS	779	B	3.74
238.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7564	O	MET	775	B	3.31	299.	2759	CG	ASP	276	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.87
239.	4049	CG	ASN	410	A	<-->	7564	O	MET	775	B	3.03	300.	2761	OD2	ASP	276	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.67

Anexo XI. Continuação.

301.	2778	NE2	HIS	278	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.42
302.	2842	OH	TYR	283	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.62
303.	2866	OG	SER	285	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.36
304.	3064	CB	THR	308	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.69
305.	3065	OG1	THR	308	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.67
306.	3077	C	MET	309	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.87
307.	3078	O	MET	309	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	2.69
308.	3090	ND2	ASN	311	A	<-->	7606	NZ	LYS	779	B	3.69
309.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7644	CE1	TYR	782	B	3.04
310.	4032	CE1	PHE	408	A	<-->	7646	CE2	TYR	782	B	3.75
311.	4037	N	SER	409	A	<-->	7646	CE2	TYR	782	B	3.63
312.	4039	CA	SER	409	A	<-->	7646	CE2	TYR	782	B	3.71
313.	4037	N	SER	409	A	<-->	7647	CZ	TYR	782	B	3.55
314.	4039	CA	SER	409	A	<-->	7647	CZ	TYR	782	B	3.55
315.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7647	CZ	TYR	782	B	3.31
316.	4037	N	SER	409	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.86
317.	4039	CA	SER	409	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	3.23
318.	4043	C	SER	409	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	3.71
319.	4045	N	ASN	410	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	3.38
320.	4054	C	ASN	410	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	3.88
321.	4055	O	ASN	410	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	2.90
322.	4050	OD1	ASN	410	A	<-->	7648	OH	TYR	782	B	3.12
323.	4032	CE1	PHE	408	A	<-->	7723	CE1	PHE	789	B	3.81
324.	4004	NH1	ARG	405	A	<-->	7875	C	GLU	805	B	3.70
325.	4000	CD	ARG	405	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	3.59
326.	4001	NE	ARG	405	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	3.37
327.	4003	CZ	ARG	405	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	2.93
328.	4004	NH1	ARG	405	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	2.67
329.	4007	NH2	ARG	405	A	<-->	7876	O	GLU	805	B	3.57
330.	4004	NH1	ARG	405	A	<-->	7872	CD	GLU	805	B	2.87
331.	4004	NH1	ARG	405	A	<-->	7873	OE1	GLU	805	B	2.76
332.	2592	CG2	ILE	259	A	<-->	7874	OE2	GLU	805	B	3.66
333.	4000	CD	ARG	405	A	<-->	7874	OE2	GLU	805	B	3.54
334.	4003	CZ	ARG	405	A	<-->	7874	OE2	GLU	805	B	3.86
335.	4004	NH1	ARG	405	A	<-->	7874	OE2	GLU	805	B	2.75
336.	4007	NH2	ARG	405	A	<-->	7907	C	GLN	808	B	3.64
337.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7908	O	GLN	808	B	3.24
338.	4003	CZ	ARG	405	A	<-->	7908	O	GLN	808	B	3.79
339.	4007	NH2	ARG	405	A	<-->	7908	O	GLN	808	B	2.68
340.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7911	CA	ASN	809	B	3.02
341.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7918	C	ASN	809	B	3.54
342.	2539	N	GLY	254	A	<-->	7912	CB	ASN	809	B	3.87
343.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7912	CB	ASN	809	B	3.69
344.	2539	N	GLY	254	A	<-->	7913	CG	ASN	809	B	3.54
345.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7913	CG	ASN	809	B	3.57
346.	2530	CB	GLN	253	A	<-->	7914	OD1	ASN	809	B	3.58
347.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7914	OD1	ASN	809	B	3.85
348.	2539	N	GLY	254	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	3.32
349.	2542	C	GLY	254	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	3.74
350.	2543	O	GLY	254	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	3.67
351.	2551	C	ILE	255	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	3.73
352.	2552	O	ILE	255	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.79
353.	2558	CD	GLU	256	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	3.62
354.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7915	ND2	ASN	809	B	2.83
355.	2558	CD	GLU	256	A	<-->	7920	N	PHE	810	B	3.46
356.	2559	OE1	GLU	256	A	<-->	7920	N	PHE	810	B	3.02
357.	2560	OE2	GLU	256	A	<-->	7920	N	PHE	810	B	3.15
358.	2560	OE2	GLU	256	A	<-->	7922	CA	PHE	810	B	3.56
359.	2560	OE2	GLU	256	A	<-->	7930	C	PHE	810	B	3.82
360.	2560	OE2	GLU	256	A	<-->	7923	CB	PHE	810	B	3.39
361.	2560	OE2	GLU	256	A	<-->	7926	CD2	PHE	810	B	3.70

Anexo XI. Continuação.

362.	1858	CB	PRO	189	A	<-->	7936	C	ALA	811	B	3.86
363.	1858	CB	PRO	189	A	<-->	7937	O	ALA	811	B	3.36
364.	1859	CG	PRO	189	A	<-->	7937	O	ALA	811	B	3.43
365.	1857	CA	PRO	189	A	<-->	7935	CB	ALA	811	B	3.74
366.	2552	O	ILE	255	A	<-->	7935	CB	ALA	811	B	3.53
367.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7946	C	GLU	812	B	3.08
368.	2529	CA	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	3.77
369.	2530	CB	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	3.02
370.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	3.24
371.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	2.24
372.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7947	O	GLU	812	B	3.82
373.	1858	CB	PRO	189	A	<-->	7941	CB	GLU	812	B	3.63
374.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7948	N	ILE	813	B	3.44
375.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7950	CA	ILE	813	B	3.76
376.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7950	CA	ILE	813	B	3.19
377.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7950	CA	ILE	813	B	3.56
378.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7951	CB	ILE	813	B	3.85
379.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7951	CB	ILE	813	B	3.55
380.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7951	CB	ILE	813	B	3.33
381.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7952	CG2	ILE	813	B	3.23
382.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7952	CG2	ILE	813	B	3.02
383.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7952	CG2	ILE	813	B	2.79
384.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	7989	CB	ASN	816	B	3.85
385.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7989	CB	ASN	816	B	3.35
386.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7989	CB	ASN	816	B	3.03
387.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7989	CB	ASN	816	B	3.75
388.	2531	CG	GLN	253	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.44
389.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.36
390.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.42
391.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7990	CG	ASN	816	B	3.43
392.	2531	CG	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.69
393.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.27
394.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.44
395.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.53
396.	2535	HE21	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.86
397.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	7991	OD1	ASN	816	B	3.84
398.	2520	O	SER	251	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	2.82
399.	2527	N	GLN	253	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.54
400.	2530	CB	GLN	253	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.84
401.	2531	CG	GLN	253	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.39
402.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	7992	ND2	ASN	816	B	3.87
403.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	8004	CD2	TYR	817	B	3.87
404.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	8004	CD2	TYR	817	B	3.18
405.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	8005	CE2	TYR	817	B	3.54
406.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	8005	CE2	TYR	817	B	3.13
407.	2534	NE2	GLN	253	A	<-->	8005	CE2	TYR	817	B	3.25
408.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	8005	CE2	TYR	817	B	2.56
409.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	8006	CZ	TYR	817	B	3.35
410.	2536	HE22	GLN	253	A	<-->	8006	CZ	TYR	817	B	3.70
411.	2532	CD	GLN	253	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.87
412.	2533	OE1	GLN	253	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	2.80
413.	4031	CD2	PHE	408	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.21
414.	4033	CE2	PHE	408	A	<-->	8007	OH	TYR	817	B	3.18
415.	1839	CD2	TRP	187	A	<-->	8342	CB	VAL	852	B	3.86
416.	1841	CE3	TRP	187	A	<-->	8342	CB	VAL	852	B	3.57
417.	1841	CE3	TRP	187	A	<-->	8343	CG1	VAL	852	B	3.70

Number of hydrogen bonds: 43

Number of non-bonded contacts: 417

INGREDIENTES	QUANTIDADE
Caseína	20 g
Extrato de levedura	10 g
Açúcar branco	60 g
Acido ascórbico	10 g
Solução vitamínica	11 mL
Sais de Wesson	7,5 g
Colesterol	300 mg
Benzoato de sódio	300 mg
Ampicilina	80 mg
Nistatina	800.000 UI
Cloreto de colina (50%)	2 mL
Água	800 mL

Anexo XII. Composição da dieta líquida de *T. l. licus*.

Anexo XIII. Meio Osmótico (Quantidade suficiente para 1 litro)

Meio MS +

Ácido cítrico 50 mg/L

2,4D 3 mg/L

Cinetina 0,1 mg/L

0,2 M de Sorbitol

0,2 M de Manitol

Phytigel 2,3 g/L

Anexo XIV. Meio MRP (Quantidade suficiente para 1 litro)

Meio MS +

ANA 3,72 mg/L

BAP 0,45 mg/L

Glufosinato de amônio 1,5mg/L

Phytigel 2,3 g/L

Anexo XV. Sequências utilizadas para transformação de cana-de-açúcar.

CHSB Construct (chitin synthase)

>SfiA

ggccattacggcc

>KpnI

Ggtacc

>OsAct1

CATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTAAGATTACCTGGTCAAAAGTGAAA
ACATCAGTTAAAAGGTGGTATAAGTAAAATATCGGTAATAAAAGGTGGCCCAAAGTGAAATTTACTCTTTTCTAC
TATTATAAAAATTGAGGATGTTTTGTCGGTACTTTGATACGTCATTTTTGTATGAATTGGTTTTTAAGTTTATTC
GCGATTTGGAAATGCATATCTGTATTTGAGTCGGTTTTTAAGTTTCGTTGCTTTTGTAAATACAGAGGGATTTGTA
TAAGAAATATCTTTAAAAAACCCATATGCTAATTTGACATAATTTTTGAGAAAAATATATATTCAGGCGAATTCC
ACAATGAACAATAATAAGATTTAAAATAGCTTGCCCCGTTGCAGCGATGGGTATTTTTTCTAGTAAAATAAAAGA
TAACTTAGACTCAAAACATTTACAAAAACAACCCCTAAAGTCCTAAAGCCCAAAGTGCTATGCACGATCCATAG
CAAGCCCAGCCCAACCCAACCCAACCCACCCACCCAGTCAGCCAACTGGCAAATAGTCTCCACCCCCGGCAC
TATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCGCAGCCAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAGAAAAAGA
AAAACAGCAGGTGGGTCCGGTTCGTGGGGGCCGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCCGGCCCT
CCCTCCGTTCCAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCTCTCCTCCCATCCCCCAACCC
TACCACCACCACCACCACCACCCTCCCTCCCCCTCGCTGCCGGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGC
CGCCGGTAACCACCCCGCCCCCTCTCCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTCGTCTCGGTCTCGATCTTTGGCCTT
GGTAGTTTGGGTGGGCGAGAGCGGCTTCGTCGCCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGGCGT
CTCCGGGCGTGAGTCGGCCCGGATCCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTGCGATCCGCCGTTGTTG
GGGAGATGATGGGGGTTTAAAATTTCCGCCATGCTAAACAAGATCAGGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTT
TATATTTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTCAGGCTTAGATGTGCTAGATCTTCTTTCTTTCTTTTTTGTGGTA
GAATTTGAATCCCTCAGCATTTGTTTCATCGGTAGTTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGA
GCTTTTTTTGTAGGCGCGGGG

>NcoI

ccatgg

>EcoRV

gatatc

>CH2150For

**TCTGCCATTTGAAGGACAAGGCGAAAATAAGACACAGAAAACGATGGTCTCAGGTAATGTATATGTATTACTTCC
TGGGCCACCGGTTAATGGACCTACCAATATCTGTGGACCCTAAGGAGGTGATAGCAGAAAACACTTACCTCCTCG**

>RGA2

GTATGGATAGTGTATCTTCATACTGCATTTGTTTAAATTTGAAAATGGTTATCTAGTTGCCTAACAAAATATAGCT
GGGATACCTTATAACACATGTGCAGGTGACATGGAAAAAATGCCTATTTTTCTATGCACTAACTATTTCATCATG
TGACATACTTCCCCAAAAAATAAATAAGCCAAATTTCCAGCTTCCGAGTCCTGAAAAAGAGTAGTGTACCTGA
TACAAATTTATAGAGTTTTTTTTTTTCGAAAAGAAGGGATAGCCCTCATAGATAGAGTACTAATAAAAGTCTACTT
TTACCAATTTTCAGGTTTTTTGA

>CH2150RevComp

```
CGAGGAGGTAAGTGTTTTCTGCTATCACCTCCTTACGGTCCACAGATATTGGTAGGTCCATTAACCGGTGGCCCA  
GGAAGTAATACATATACATTACCTGAGACCATCGTTTTCTGTGTCTTATTTTCGCCTTGCCTTCAAATGGCAGA
```

>EcoRV

gatatc

>PstI

ctgcag

>T35s

```
AAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCC  
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGT  
ATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTG
```

>XhoI

Ctcgag

>SfiB

ggccgcctcgcc

Gerei uma mutação no íntron RGA2 para desconfigurar um sitio de EcoRV (GATATC), trocando para GATACC, em amarelo.

V-ATPase Construct

>SfiA

ggccattacggcc

>KpnI

Ggtacc

>OsAct1

```
CATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTAAGATTACCTGGTCAAAAGTGAAA
ACATCAGTTAAAAGGTGGTATAAGTAAAATATCGGTAATAAAAGGTGGCCCAAAGTGAAATTTACTCTTTTCTAC
TATTATAAAAATTGAGGATGTTTTGTCCGGTACTTTGATACGTCATTTTTGTATGAATTGGTTTTTAAGTTTATTC
GCGATTTGGAAATGCATATCTGTATTTGAGTCGGTTTTTAAGTTTCGTTGCTTTTGTAAATACAGAGGGATTTGTA
TAAGAAATATCTTTAAAAAACCCATATGCTAATTTGACATAATTTTTGAGAAAAATATATATTCAGGCGAATTCC
ACAAATGAACAATAATAAGATTTAAATAGCTTGCCCCCGTTGCAGCGATGGGTATTTTTTCTAGTAAAATAAAAGA
TAACTTAGACTCAAAACATTTACAAAAACAACCCCTAAAGTCCTAAAGCCCAAAGTGCTATGCACGATCCATAG
CAAGCCCAGCCCAACCCAACCCAACCCACCCACCCAGTGCAGCCAACTGGCAAATAGTCTCCACCCCCGGCAC
TATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCGCAGCCAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAGAAAAAGA
AAAACAGCAGGTGGGTCCGGTTCGTGGGGGCCGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCCGGCCCT
CCCTCCGCTTCCAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCCTCTCCTCCCATCCCCCAACCC
TACCACCACCACCACCACCACCTCCTCCCCCTCGCTGCCGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGC
CGCCGGTAACCACCCCGCCCTCTCCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTCGTCTCGGTCTCGATCTTTGGCCTT
GGTAGTTTGGGTGGGCGAGAGCGGCTTCGTGCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGGCGT
CTCCGGGCGTGAGTCGGCCCGGATCCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTGCGATCCGCCGTTGTTG
GGGAGATGATGGGGGTTTTAAAATTTCCGCCATGCTAAACAAGATCAGGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTT
TATATTTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTGAGGCTTAGATGTGCTAGATCTTCTTTCTTTCTTTTGTGGTA
GAATTTGAATCCCTCAGCATTTTCATCGGTAGTTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGA
GCTTTTTTGTAGGCGCGGGC
```

>NcoI

ccatgg

>EcoRV

gatatc

>vATPase150For

```
CTATTGCACGCTAGAATTGTGTGTGAAACACCATGTACATTGTAATAGGTGGTCCTCGTTTGAGATATTTTAGG
ATTTTTTCAAAATGTTGATCGGTTCTAGCGTGCGATTTCGTTACGTCAGTTAATTAGTTGTTATGATTATATTATT
```

>RGA2

```
GTATGGATAGTGTATCTTCATACTGCATTTGTTAATTTGAAAATGGTTATCTAGTTGCCTAACAAAATATAGCT
GGGATACCCTTATAACACATGTGCAGGTGACATGGAAAAAATGCCTATTTTTCTATGCACTAACTATTCATCATG
TGACATACTTCCCCAAAAAATAAATAAGCCAAATTTCCAGCTTCCGAGTCCTGAAAAAGAGTAGTGTACCTGA
TACAATTTATAGAGTTTTTTTTTTTCGAAAAGAAGGGATAGCCCTCATAGATAGAGTACTAACTAAAAGTCTACTT
TTACCAATTTTCAGTTTTTTGA
```

>vATPase150RevComp

```
ATAATATAATCATAACAACATAAATAACTGACGTAACGAATCGCACGCTAGAACCGATCAACATTTTGAAAAAAT  
CCTAAAATATCTCAAACGAGGACCACCTATTTACAATGTACATGGTGTTCACACACAATTCTAGCGTGCAATAG
```

>EcoRV

gatatc

>PstI

ctgcag

>T35s

```
AAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCC  
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTTAGTATGT  
ATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTG
```

>XhoI

Ctcgag

>SfiB

ggccgcctcggcc

Gerei uma mutação no íntron RGA2 para desconfigurar um sitio de EcoRV (GATATC), trocando para GATACC, em amarelo.

CHSB-V-ATPase Construct

>SfiA

ggccattacggcc

>KpnI

Ggtacc

>OsAct1

CATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTAAGATTACCTGGTCAAAGTGAAA
ACATCAGTTAAAAGGTGGTATAAGTAAAATATCGGTAATAAAAAGGTGGCCCAAAGTGAAATTTACTCTTTTCTAC
TATTATAAAAATTGAGGATGTTTTGTCCGGTACTTTGATACGTCATTTTTGTATGAATTGGTTTTTAAGTTTATTC
GCGATTTGGAAATGCATATCTGTATTTGAGTCGGTTTTTAAGTTCGTTGCTTTTGTAAATACAGAGGGATTTGTA
TAAGAAATATCTTTAAAAAACCCATATGCTAATTTGACATAATTTTTGAGAAAAATATATATTCAGGGCAATTCC
ACAATGAACAATAATAAGATTAATAATAGCTTGCCCCCGTTGCAGCGATGGGTATTTTTTCTAGTAAAATAAAAAGA
TAACTTAGACTCAAACATTTACAAAAACAACCCCTAAAGTCCTAAAGCCCAAAGTGCTATGCACGATCCATAG
CAAGCCCAGCCCAACCAACCCAACCCACCCACCCAGTGCAGCCAACTGGCAAATAGTCTCCACCCCCGGCAC
TATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCGCAGCCAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAGAAAAAGA
AAAACAGCAGGTGGGTCCGGGTCTGGGGGCCGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCCGGCCCT
CCCTCCGCTTCCAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCCTCTCCTCCCATCCCCCAACCC
TACCACCACCACCACCACCACCTCCTCCCCCTCGCTGCCGGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGC
CGCCGTAACCACCCCGCCCTCTCCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTTCTGCTCTCGGTCTCGATCTTTGGCCTT
GGTAGTTTGGGTGGGCGAGAGCGGCTTCGTGCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGGCGT
CTCCGGGCGTGAGTCGGCCCGGATCCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTGCGATCCGCCGTTGTTG
GGGGAGATGATGGGGGTTTAAAATTTCCGCCATGCTAAACAAGATCAGGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTT
TATATTTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTGAGGCTTAGATGTGCTAGATCTTCTTTCTTTCTTTTGTGGTA
GAATTTGAATCCCTCAGCATGTTTCATCGGTAGTTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGA
GCTTTTTTGTAGGCGCGGGC

>NcoI

ccatgg

>EcoRV

gatatc

>CHS-vATPase150For

TC TGCCATTTGAAGGACAAGGCGAAAATAAGACACAGAAAACGATGGTCTCAGGTAATGTATATGTATTACTTCC
TGGGCCACCGGTTAATGGACCTACCAATATCTGTGGACCGTAAGGAGGTGATAGCAGAAAACACTTACCTCCTCG
CTATTGCACGCTAGAATTGTGTGTGAAACACCATGTACATTGTAATAAGGTGGTCCTCGTTGAGATATTTTAGG
ATTTTTTCAAATGTTGATCGGTTCTAGCGTGCGATTTCGTTACGTCAGTTAATTAGTTGTTATGATTATATTATT

>RGA2

GTATGGATAGTGTATCTTCATACTGCATTTGTTTAAATTTGAAAATGGTTATCTAGTTGCCTAACAAAATATAGCT
GGGATACTTATAACACATGTGCAGGTGACATGGAAAAAATGCCTATTTTTCTATGCACTAACTATTCATCATG
TGACATACTTCCCCAAAAAATAAATAAGCCAAATTTCCAGCTTCCGAGTCTGAAAAAGAGTAGTGTACCTGA
TACAATTTATAGAGTTTTTTTTTTTCGAAAAGAAGGGATAGCCCTCATAGATAGAGTACTAACTAAAAGTCTACTT
TTACCAATTTTCAGGTTTTTGA

>CHSB-V-ATPase150RevComp

```
AAATAATATAATCATAACAACATAATTAAGTACGTAACGAATCGCACGCTAGAACCGATCAACATTTTGAAAAAAT
CCTAAAATATCTCAAACGAGGACCACCTATTTACAATGTACATGGTGTTCACACACAATTCTAGCGTGCAATAG
CGAGGAGGTAAGTGTTTTCTGCTATCACCTCCTTACGGTCCACAGATATTGGTAGGTCCATTAACCGGTGGCCCA
CGAAGTAATACATATACATTACCTGAGACCATCGTTTTCTGTGCTTATTTTCGCCTTGTCTTCAAATGGCAGA
```

>EcoRV

gatatc

>PstI

ctgcag

>T35s

```
AAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCC
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGT
ATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTG
```

>XhoI

Ctcgag

>SfiB

ggccgcctcgcc

Gerei uma mutação no íntron RGA2 para desconfigurar um sitio de EcoRV (GATATC), trocando para GATACC, em amarelo.

Cry2Aa Construct

>SfiA

ggcattacggcc

>KpnI

Ggtacc

>OsAct1

CATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTAAGATTACCTGGTCAAAAGTGAAA
ACATCAGTTAAAAGGTGGTATAAGTAAAATATCGGTAATAAAAGGTGGCCCAAAGTGAAATTTACTCTTTTCTAC
TATTATAAAAATTGAGGATGTTTTGTCCGTACTTTGATACGTCATTTTTGTATGAATTGGTTTTAAGTTTTATTC
GCGATTTGGAAATGCATATCTGTATTTGAGTCGGTTTTTAAGTTTCGTTGCTTTTTGTAAATACAGAGGGATTTGTA
TAAGAAATATCTTTAAAAAACCCATATGCTAATTTGACATAATTTTTGAGAAAAATATATATTCAGGGCGAATTCC
ACAATGAACAATAATAAGATTAAAATAGCTTGCCCCCGTTGCAGCGATGGGTATTTTTTCTAGTAAAATAAAAGA
TAAACTTAGACTCAAAACATTTACAAAAACAACCCCTAAAGTCCTAAAGCCCAAAGTGCTATGCACGATCCATAG
CAAGCCCAGCCCAACCCAAACCCAAACCCACCCACCCAGTGCAGCCAACTGGCAAATAGTCTCCACCCCCGGCAC
TATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCGCAGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAAGAAAAAGA
AAAACAGCAGGTGGGTCCGGGTCGTGGGGGCCGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCCGGCCCT
CCCTCCGCTTCCAAAGAAACGCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCTCTCCTCCCATCCCCCAACCC
TACCACCACCACCACCACCACCTCCTCCCCCTCGCTGCCGGACGACGAGCTCCTCCCCCTCCCCCTCCGCCGC
CGCCGGTAACCACCCCGCCCTCTCCTCTTTCTTTCTCCGTTTTTTTTTTCGTCTCGGTCTCGATCTTTGGCCTT
GGTAGTTTGGGTGGGCGAGAGCGGCTTCGTGCGCCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGCTGGCGT
CTCCGGGCGTGAGTCGGCCCGGATCCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTGCGATCCGCCGTTGTTG
GGGAGATGATGGGGGTTTTAAAATTTCCGCCATGCTAAACAAGATCAGGAAGAGGGGAAAAGGGCACTATGGTT
TATATTTTTATATATTTCTGCTGCTTCGTGAGGCTTAGATGTGCTAGATCTTCTTTCTTTCTTTTGTGGTA
GAATTTGAATCCCTCAGCATTGTTTCATCGGTAGTTTTTCTTTTCATGATTTGTGACAAATGCAGCCTCGTGCGGA
GCTTTTTTGTAGGCGGGGGC

>NcoI

ccatgg

>Cry2A

GCCGCGATGgacGTAGTCGGAACTGTGTCTAGTTTTTTGCTAAAGAAAGTGGGGAGTCTTATTGGAAAAAGGATA
TTGAGTGAATTTATGGGGGATAATATTTCCCTAGTGGTAGTACAAATCTAATGCAAGATATTTAAGGGAGACAGAA
CAATTCCTAAATCAAAGACTTAATACAGATACCCTTGCTCGTGTAAATGCAGAATTGATAGGGCTCCAAGCGAAT
ATAAGGGAGTTTAATCAACAAGTAGATAATTTTTTAAACCCCTACTCAAACCCCTGTTCTTTATCAATAACTCT
TCGGTTAATAACAATGCAGCAATTTATTTCTAAATAGATTACCCAGTTCAGATACAAGGATACCAGTTGTTATTA
TTACCTTTTATTTGCACAGGCAGCCAATATGCATCTTTCTTTTATTAGAGATGTTATTCTTAATGCAGATGAATGG
GGTATTTTCAGCAGCAACATTACGTACGTATCGAGATTACCTGAGAAATTATACAAGAGATTATTCTAATTATTGT
ATAAATACGTATCAAACGCGTTTTAGAGGGTTAAACACCCGTTTACACGATATGTTAGAATTTAGAACATATATG
TTTTTAAATGTATTTGAATATGTATCCATTTGGTCAATGTTTAAATATCAGAGTCTTATGGTATCTTCTGGCGCT
AATTTATATGCTAGCGGTAGTGGACCACAGCAGACACAATCATTACAGCACAAAACCTGGCCATTTTTATATTCT
CTTTTCCAAGTTAATTCGAATTATATATTATCTGGTATTAGTGGTACTAGGCTTTCTATTACCTTCCCTAATATT
GGTGGTTTACCGGGTAGTACTACAACCTCATTGATGATAGTGCAGGGTTAATTATAGCGGAGGAGTTTCATCT
GGTCTCATAGGGGCGACTAATCTCAATCACAACCTTAATTCAGCACGGTCTCCTCCTTTATCAACACCATTT
GTTAGAAGTTGGCTGGATTCAGGTACAGATCGAGAGGGCGTTGCTACCTCTACGAATTGGCAGACAGAATCCTTT
CAAACAACTTTAAAGTTTAAAGGTGTGGTGTCTTTTTTCAGCCCGTGAAATTCAAACTATTTCCAGATTATTTTATC
CGTAATATTTCTGGGGTTCCTTTAGTTATTAGAAACGAAGATCTAACAAGACCGTTACACTATAACCAAATAAGA
AATATAGAAAGTCCCTTCGGGAACACCTGGTGGAGCACGGGCCTATTTGGTATCTGTGCATAACAGAAAAATAAT
ATCTATGCCGCTAATGAAAAATGGTACTATGATCCATTTGGCGCCAGAAGATTATACAGGATTTACTATATCGCCA
ATACATGCCACTCAAGTGAATAATCAAACCTCGAACATTTATTTCTGAAAAATTTGGAAATCAAGGTGATTCCTTA
AGATTTGAACAAAGCAACACGACAGCTCGTTATACGCTTAGAGGGAATGGAAATAGTTACAATCTTTATTTAAGA
GTATCTTCAATAGGAAATCAACTATTCGAGTTACTATAAACCGTAGAGTTTATACTGTTTCAAATGTTAATACC
ACTACAAATAACGATGGAGTTAATGATAATGGAGCTCGTTTTTCAGATATTAATATCGGTAATATAGTAGCAAGT
GATAACTAATAATGTAACGCTAGATATAAATGTGACATTAACCTCCGGTACTCCATTTGATCTCATGAATATTATG
TTTGTGCCAATAATtaa

>PstI

ctgcag

>T35s

AAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCC
CAGATAAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGT
ATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTG

>XhoI

Ctcgag

>SfiB

ggccgcctcgcc

Em roxo, Kozac(ATG)modificado (gCgATGG)+ 2nts para manter a fase de leitura. No final de Cry2A, sítio de terminação da tradução. Sequencia de Cry2A fornecida por Edilson.

Publicações do aluno

Artigos relacionados à tese

Fernando C. A. Fonseca, Alexandre A. P. Firmino; Leonardo L. P. Macedo; Orzenil B. Silva-Junior; Roberto C. Togawa; Georgios J. Pappas-Jr; Maria F. Grossi-de-Sá. **454 pyrosequencing based transcriptome analysis of sugarcane giant borer (*Telchin licus*).** *BMC Genomics* 2013. Em preparação.

Fonseca, F.C.A; Redorat, F.S; Lourenço, I.T; Firmino, A.A.P.; Macedo, L.L.P.; Grossi-de-Sá, M.F. **Reference genes for gene expression analysis of different developmental stages of sugarcane giant borer.** *BMC Biotechnology*. Em preparação.

Fonseca, F.C.A ; Leonardo L. P. Macedo; Souza Jr, J.D.A.; Redorat, F.S; Lourenço, I.T; Grossi-de-Sá, M.F. **Cry proteins highly toxic to sugarcane giant borer.** *Pest Management Science*. Em preparação.

Artigos em colaboração

Alexandre A. P. Firmino; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Roberto C. Togawa; Orzenil B. Silva-Junior; Georgios J. Pappas-Jr; Maria F. Grossi-de-Sá. **Pyrosequencing analysis of the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) transcriptome.** *BMC Genomics* 2012. Submetido.

Alexandre A. P. Firmino; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Maria F. Grossi-de-Sá . **Housekeeping genes for *Anthonomus grandis* studies.** Em preparação.

Alexandre A. P. Firmino; Diogo Martins de Sá; Fernando C. A. Fonseca; Leonardo L. P. Macedo; Roberta R. Coelho, Maria F. Grossi-de-Sá. **Lethal Phenotype caused by RNAi-mediated Silencing of a Cotton Boll Weevil *Laccase2* gene .** Em preparação.

Macedo, L.L.P; Fonseca, F.C.A; Firmino, A.A.P; Coelho, R.R; Fragoso, R.R.; Oliveira-Neto, O. B.; Silva, M. C. M.; Oliveira, RS; Grossi-de-Sa, M. F. **A midgut-specific chitin synthase in *Anthonomus grandis* as target for pest control.** Em preparação.

Macedo, L.L.P.; Fonseca, F.C.A.; Fragoso, R.R.; Firmino, A.A.P.; Oliveira-Neto, O. B.; Silva, M. C. M.; Grossi-de-Sa, M. F. **Sequences of cDNAs, expression patterns and silencing of gene encoding chitin synthase in *Anthonomus grandis*: potential target for pest control.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Em preparação.

Nielen, Stephan; Campos-Fonseca, Fernando; Leal-Bertioli, Soraya; Guimarães, Patrícia; Seijo Guilherme; Town Christopher; Arrial, Roberto; Bertioli, David. **Fidel: a retrovirus-like retrotransposon and its distinct evolutionary histories in the A- and B-genome components of cultivated peanut.** *Chromosome Research*, v.18, p. 227-246, 2010.

Patente registrada

Grossi-de-Sa, M.F.; Silva, M.C.M.; Gomes Jr, J.E.; Lourenço, I.T.; Macedo, L.L.P.; Lucena, W.A.; Fonseca, F.C.A. Moléculas variantes sintéticas de toxinas Cry1Ia12 com propriedades de controlar insetos-praga, composições contendo tais mutantes e método de utilização dos mesmos. 2012.

Patente em preparação

Grossi-de-Sa, M.F.; Silva, M.C.M.; Fonseca, F.C.A.; Macedo, L.L.P.; Redorat, F.S. Método de criação de larvas da broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Lepidoptera: Castiniidae), composições, dietas e método de utilização.