

REPOSTA IMUNOLÓGICA DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) FRENTE A PRODUTOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

ANDRESA CRISTINA BATISTA DE OLIVEIRA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley-Teixeira)

RESUMO

O pH do intestino médio dos insetos tem grande influência na atividade das toxinas Cry que podem ser ativadas em condições alcalinas ou ácidas. O processamento proteolítico das toxinas Cry é uma etapa crucial na sua ativação e informações sobre a distribuição e interação dessas toxinas sobre insetos alvo e não-alvo, são de valor para explicar como a ação proteolítica de enzimas digestivas contribui para a tolerância de inimigos naturais às toxinas Cry. Estudos têm mostrado que insetos podem adaptar-se às toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sob condições de campo e laboratório. *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae), por ser uma espécie monófaga com ciclo de vida curto, apresenta risco de desenvolver resistência às toxinas de *B. thuringiensis*. O conhecimento dos diferentes mecanismos de resistência a essas toxinas é importante para prolongar a utilidade de produtos comerciais à base de Bt. A atividade de proteinases do tubo digestivo de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae), capacidade proteolítica dessas sobre Cry1Ac e a resposta imunológica celular e humoral de lagartas de *A. argillacea* frente às formulações comerciais à base de *B. thuringiensis*, foram testadas. Os resultados indicaram que as principais enzimas do tubo digestivo de *P. nigrispinus* são serino-proteases e proteases cisteínicas que atuam em pH levemente ácido até neutro e que as enzimas

do tubo digestivo não são capazes de degradar Cry1Ac. Lagartas do 4º ínstar de *A. argillacea* não apresentam potencial para desenvolverem tolerância de natureza imunológica a formulados Bt. Dipel® ocasionou variação quantitativa em todos os tipos celulares enquanto XenTari® alterou prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Nos insetos tratados com Dipel® houve aumento no nível de óxido nítrico. As diferenças nas respostas aos tratamentos podem ser atribuídas à diferente composição dos inseticidas testados, onde Dipel® tem uma ação mais efetiva e mais rápida no controle de *A. argillacea*.

PALAVRAS-CHAVE: Percevejos predadores, proteinases digestivas, plantas transgênicas, fenoloxidase, óxido nítrico, hemócitos *Bacillus thuringiensis*.

IMMUNE RESPONSE OF *Alabama argillacea* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae) and its
PREDATOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (Hemiptera: Pentatomidae) FRONT OF
PRODUCTS BASED ON *Bacillus thuringiensis* BERLINER

by

ANDRESA CRISTINA BATISTA DE OLIVEIRA

(Under the Direction of Professor Valéria Wanderley-Teixeira)

ABSTRACT

The insects' midgut pH has a great influence on the activity of Cry toxins. Some toxins are activated under alkaline or acidic conditions. The proteolytic processing of Cry toxins is a crucial step in their activation and information about distribution and interaction of these toxins on target and non-target insects are important to explain how proteolytic activity of digestive enzymes contributes to the tolerance of natural enemies to Cry toxins. Furthermore, studies have shown that insects can adapt to *Bacillus thuringiensis* (Berliner) toxins under field and laboratory conditions. Because *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae), is a monophagous species with short life cycle, it poses a risk of developing resistance to the toxins of *B. thuringiensis*. The knowledge about the different mechanisms of resistance to these toxins is important to extend the usefulness of commercial products based on Bt. The proteinase activity of the digestive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae), proteolytic capacity of these on Cry1Ac and cellular and humoral immune response of larvae of *A. argillacea* towards commercial formulations based on *B. thuringiensis*, were tested. The results indicated that the major enzymes of the digestive tract of *P. nigrispinus* are serine-proteases and cysteine proteases that work in a neutral to mildly acidic pH and apparently digestive enzymes were not able to process the

Cry1Ac toxin within 12 hours of incubation. 4th instar larvae of *A. argillacea* do not have potential to develop tolerance to Bt formulated based on immunological responses. Dipel® led to quantitative variation in all cell types while XenTari® changed prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and oenocytoids. In insects treated with Dipel® was no increase in the level of nitric oxide. Differences in responses to treatments can be attributed to different composition of the insecticides, Dipel® had a more effective and faster to control *A. argillacea*.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, predator, fall armyworm, ultrastructure, histochemistry, immunology.

REPOSTA IMUNOLÓGICA DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) FRENTE A PRODUTOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

ANDRESA CRISTINA BATISTA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2011

REPOSTA IMUNOLÓGICA DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) FRENTE A PRODUTOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

ANDRESA CRISTINA BATISTA DE OLIVEIRA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley-Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

REPOSTA IMUNOLÓGICA DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E DE SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) FRENTE A PRODUTOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER

por

ANDRESA CRISTINA BATISTA DE OLIVEIRA

Orientador:

Valéria Wanderley-Teixeira – UFRPE

Examinadores:

Luiz Carlos Alves – CPqAM-FIOCRUZ

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

A minha mãe Tereza Cristina de Andrade, a minha querida irmã Ana Paula Batista de Oliveira pela dedicação e companheirismo ao longo dessa jornada e ao meu sobrinho e amigo Douglas Araújo de Oliveira Lopes por ser uma grande alegria em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, força suprema que está sempre comigo e que me permitiu realizar esta importante etapa da minha vida pessoal e profissional, fazendo com que cada obstáculo no caminho fosse uma oportunidade de aprendizado e superação.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) pela possibilidade de realização deste curso.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo.

A minha orientadora Valéria Wanderley Teixeira pela amizade, fidelidade e dedicação, por ter acreditado no meu potencial, mesmo nos momentos mais adversos.

Ao professor Hebert Álvaro Abreu de Siqueira, pela paciência nos ensinamentos do dia-dia e por ter me proporcionado a oportunidade de novos aprendizados que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira por toda ajuda e ensinamentos.

Ao professor Jorge Braz Torres pelo fornecimento dos percevejos e de algumas bibliografias.

A Ézio Júnior pela ajuda com a criação inicial dos percevejos.

A Karjoene Casimiro pela ajuda na obtenção das lagartas utilizadas nos experimentos finais.

Ao meu amigo Thiago Alves “Coxinha” pela grande ajuda na criação dos insetos e execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

A Eliana Passos, Mateus Campos, Lílian Ribeiro e Franklin Magliano pela colaboração com as análises estatísticas.

Aos meus amigos do Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos: Tadeu Martins, Mateus Campos, Jefferson Elias, Karjoene Casimiro, Diogo e Amina; pela agradável convivência diária e pelos risadas nas nossas conversas construtivas.

Aos amigos com quem pude ter mais aproximação dentro do PPGEA: Mariana Breda, Mário Jorge, Ellen Valente, Agna Rita, Alberto Belo, Ricardo Lopes e Carolina Guedes.

Aos meus colegas do Laboratório de Histologia/UFRPE: Ana Janaína, Fernanda Ângelo, Alicely Correia, Ana Cláudia, Paulo Estevão, Solange, Ismaela, Glaucilane Cruz, Hilda

Ao meu grande amigo Wellington Marques, que foi sem dúvida a pessoa que compartilhou tudo comigo nestes últimos dois anos: alegrias, angústias, anseios. Obrigada por estar sempre do meu lado nos bons e nos maus momentos.

A Lílian Ribeiro, pela bela amizade que nasceu nesses dois anos de convivência próxima.

As minhas queridas amigas e companheiras para todas as horas: Daniele Claudino e Raiana Lira; é bom saber que tenho com quem contar nos momentos difíceis.

Ao meu amigo Yuri Marinho pelo carinho e amizade em todos os momentos apesar da distância.

Aos meus sobrinhos lindos, queridos e trelosos: Paula Letícia, Henrique Tavares e Douglas Araújo, pois nunca me deixam esquecer como é bom ser criança.

Ao meu namorado Ribson Santos, por todo o apoio e carinho nos momentos em que me incentivou e acreditou no meu potencial. Obrigada por continuar em minha vida.

A minha mãe Tereza Cristina e minha irmã Ana Paula por toda dedicação ao longo da minha vida e pelo exemplo de força que são.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA.....	05
2 REPOSTA IMUNOLÓGICA DE <i>Alabama argillacea</i> (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO	20
AGRADECIMENTOS	22
LITERATURA CITADA.....	23
3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO SUCO DIGESTIVO DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) SOBRE A TOXINA CRY.....	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO.....	37

MATERIAL E MÉTODOS	39
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO	42
AGRADECIMENTOS	44
LITERATURA CITADA.....	44

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) possui grande contribuição na pauta do agronegócio brasileiro e hospeda mais de 250 espécies de insetos (Miranda & Suassuna 2004, Freire 2007), onde as pragas chave são capazes de causar prejuízos de elevada magnitude. Em consequência, um dos fatores que mais onera a produção do algodão é a necessidade de inúmeras aplicações de inseticidas, pois o método de controle de pragas mais empregado é o químico. Além do aumento no custo da produção, a grande quantidade de inseticidas usada no algodoeiro causa impacto ambiental na lavoura e expõe os trabalhadores a riscos de intoxicações (Freire 2007).

A adoção de medidas de controle enquadradas dentro do manejo integrado de pragas (MIP) pode maximizar a produtividade da cultura, por utilizar táticas adequadas que venham a reduzir os custos da produção (EMBRAPA 2002). Alternativas de controle de insetos, incluindo a utilização de microrganismos entomopatogênicos como bactérias, fungos, vírus, inimigos naturais e plantas transgênicas que expressam genes de bactérias ou inibidores de proteinases de insetos, têm sido amplamente estudadas (Betz *et al.* 2000).

Dos vários agentes microbianos que possuem atividade entomopatogênica, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner), pertencente à família Bacillaceae (Habib & Andrade 1998). Essa bactéria é gram-positiva, ocorre em solos, (Hofte & Whitely 1989) e durante sua fase de esporulação produz inclusões cristalinas que contém pró-toxinas chamadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry (Choma *et al.* 1990, Schnepf *et al.* 1998).

O modo de ação das proteínas Cry envolve diversas etapas: após a ingestão por insetos suscetíveis, os cristais são solubilizados e as pró-toxinas são liberadas. Essas pró-toxinas são então

processadas por proteases do intestino médio em um fragmento de aproximadamente 65kDa. A toxina passa através da membrana peritrófica e se liga a receptores específicos localizados nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio. Essa ligação é seguida pela inserção parcial da toxina na membrana da célula, levando à formação de poros, ocasionando lise osmótica das células e morte do inseto (Choma *et al.* 1990, Ferré & Van Rie 2002, Bravo *et al.* 2005). Essas proteínas possuem atividade inseticida altamente específica contra insetos de diversas ordens (Schnepf *et al.* 1998) sendo uma alternativa viável para o controle de insetos praga (Bravo *et al.* 2005) tanto na forma de bioinseticidas pulverizáveis quanto em culturas transgênicas, por exemplo, o algodão Bt (Ferré & Van Rie 2002).

A principal praga desfolhadora do algodoeiro no Brasil é *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae); esta lagarta ataca o algodoeiro desde a fase inicial da cultura até a fase de formação de capulhos (Fontes *et al.* 2006). Este inseto provoca a maturação forçada das maçãs diminuindo a resistência das fibras e ocorre em todas as regiões produtoras do país (Almeida & Silva 1999), exigindo constante vigilância nas lavouras, pois, se não for controlada em tempo hábil, dependendo da época e da intensidade do ataque, poderá provocar prejuízo de até 80% no rendimento da cultura (Silva *et al.* 1980, Nakano *et al.* 1992).

Diversos estudos têm mostrado que os insetos podem adaptar-se às toxinas de *B. thuringiensis* sob condições de campo e de laboratório (Obrycki *et al.* 2001). Das várias espécies que apresentam potencial de desenvolver resistência (Ferré & Van Rie 2002), cinco são pragas do algodoeiro: *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lep.: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lep.: Gelechiidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep.: Noctuidae) e *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lep.: Noctuidae) e *A. argillacea* (Gould & Tabashnik 1998, Liu *et al.* 2001, Fengxia *et al.* 2003, Janmaat & Myers 2003). Contudo, a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella*

(L.) (Lep.: Plutellidae), foi o primeiro caso de resistência a Bt registrado em campo (Tabashnik *et al.* 1990).

A *A. argillacea*, por ser uma espécie monófaga e possuir ciclo de vida curto, apresenta risco de desenvolver resistência às toxinas de *B. thuringiensis* presentes no algodão Bt e também nos formulados pulverizáveis, porque a mesma está em contínua exposição às toxinas (Santos 1999). O conhecimento dos diferentes mecanismos de resistência a essas toxinas é importante para prolongar a utilidade de produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (Herrero *et al.* 2001).

O mais frequente e bem caracterizado mecanismo de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* é a alteração na ligação das proteínas Cry com seus receptores localizados no intestino médio dos insetos (Ferré & Van Rie 2002, Sayyed *et al.* 2004). Outros mecanismos envolvem alterações na atividade das proteinases intestinais que interagem com as toxinas (Oppert *et al.* 1996, Oppert *et al.* 1997) e aumento na taxa de reposição das células danificadas no intestino médio (Martínez-Ramírez *et al.* 1999, Loeb *et al.* 2001), porém, alguns trabalhos têm relatado evidências de um mecanismo adicional, onde a tolerância à Bt está associada com uma elevada resposta imune (Rahaman *et al.* 2004), envolvendo aumento na melanização e reações de coagulação (Ma *et al.* 2005).

Os insetos possuem um complexo e eficiente sistema de defesa contra patógenos onde a primeira linha é constituída por barreiras físicas: tegumento e trato digestivo. Se estas barreiras forem rompidas serão desencadeadas respostas imunes celulares e humorais (Gillespie *et al.* 1997). Defesas celulares referem-se a respostas mediadas por hemócitos como fagocitose e encapsulação, e a defesa humoral inclui a produção de peptídios antimicrobianos, a cascata que regula a coagulação e melanização (Lavine & Strand 2002).

Outra importante questão levantada em relação ao uso de Bt é o efeito sobre insetos não-alvos (Bravo *et al.* 2005). Estes organismos podem ser expostos às toxinas Cry tanto pela

alimentação direta sobre a planta como também pela transferência através da cadeia alimentar (via presa). Atualmente, muitos estudos têm investigado o potencial efeito de toxinas Cry sobre artrópodos não-alvo (Brandt *et al.* 2004, Romeis *et al.* 2008, Lövei *et al.* 2009, García *et al.* 2010). Brandt *et al.* (2004), avaliaram o processamento proteolítico da toxina Cry1Ac e Cry2Ab depois da sua ingestão pelo percevejo *Lygus hesperus* Knight (Hem.: Miridae) e verificaram que há algum processamento proteolítico das toxinas dentro do sistema digestivo desse inseto. García *et al.* (2010) avaliaram o efeito de Cry1Ab expressa em milho Bt sobre a fisiologia digestiva do predador *Atheta coriaria* (Kraatz) (Col.: Staphylinidae), usando *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) como presa; esse estudo indicou que o predador rapidamente elimina a toxina, mas não esclareceu se a toxina foi excretada ou metabolizada.

Segundo Bravo *et al.* (2007) o pH do intestino médio dos insetos tem grande influência na atividade das toxinas Cry. Algumas toxinas são ativadas em condições alcalinas, por exemplo, Cry 1A, enquanto outras são ativadas em condições de pH neutro-ácido como a Cry1B. O processamento proteolítico das toxinas Cry é uma etapa crucial na ativação da toxina e também na sua especificidade. Portanto, em alguns casos, diferentes processamentos proteolíticos de toxinas Cry em diferentes insetos podem ser uma etapa limitante na sua toxicidade. Por isso, informações sobre a interação dessas toxinas no intestino médio de insetos alvos e não-alvos, como herbívoros e inimigos naturais, são de valor para a comunidade científica (Fontes *et al.* 2002, Brandt *et al.* 2004), sendo assim é importante explicar como a ação proteolítica de enzimas digestivas contribuem para a tolerância de inimigos naturais à toxinas Cry.

Podisus nigrispinus (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) é um predador nativo do Brasil que ocorre naturalmente em diversos ecossistemas agrícolas e tem sido criado e liberado para o controle biológico de lagartas desfolhadoras (Zanuncio *et al.* 1994, Torres *et al.* 2006). Além

disso, a utilização de substâncias provenientes de plantas tem sido uma alternativa para esses percevejos em situações de escassez de presas (Crum *et al.* 1998).

Dentro desse contexto, é importante saber como a resposta imune pode contribuir para a resistência às toxinas Cry, a fim de entender sua relação no desenvolvimento da resistência, além de investigar as relações da proteína Cry1Ac com inimigos naturais de insetos pragas. Assim, o estudo objetivou pesquisar modificações na resposta imunológica celular e humoral de *A. argillacea*, praga-chave da cultura do algodoeiro, frente às formulações comerciais de *B. thuringiensis* e entender melhor como a ação proteolítica de enzimas digestivas de *P. nigrispinus* interagem com a toxina Cry1Ac.

Literatura Citada

- Almeida, R.P. & C.A.D. Silva. 1999.** Manejo integrado de pragas do algodoeiro, p.753-820. In N.E.M. Beltrão (ed.), O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília, Embrapa Algodão, 1023p.
- Betz, F.S., B.G. Hammond & R.L. Fuchs. 2000.** Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32: 156–173.
- Brandt, S.L., T.A. Coudron, J. Habib, G.R. Brown, O.M. Ilagan, R.M. Wagner, M.K. Wright, E.A. Backus & J.E. Huesing. 2004.** Interaction of two *Bacillus thuringiensis* with the digestive system of *Lygus hesperus*. Curr. Microbiol. 48: 1-9.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49: 423–435.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2005.** *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use, p. 175-205. In L.I. Gilbert, I. Kostas & S.S. Gill (eds.), Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 6. Amsterdam, Elsevier Pergammon, 459p.

- Choma, C.T., W.K. Surewicz, P.R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynos & H. Kaplan. 1990.** Unusual proteolysis of the protoxin and toxin of *Bacillus thuringiensis* – structural implications. Eur. J. Biochem. 189: 523-527.
- Crum, D.A., L.A. Weiser & N.E. Stamp. 1998.** Effects of prey scarcity and plant material as a dietary supplement on an insect predator. Oikos 83: 549-557.
- EMBRAPA. 2002.** Balanço ambiental. Brasília, DF, 67p.
- Fengxia, M., W. KongMing, G. XiWu, P. Yufa & G. YuYuan. 2003.** Geographic variation in susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. J. Econ. Entomol. 96: 1838-1842.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 47: 501–533.
- Fontes, E.L., C.S.S. Pires, E.R. Sujii & A.R. Panizzi. 2002.** The Environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. Neotrop. Entomol. 31: 497-513.
- Fontes, E.M.G., F.S. Ramalho, E. Underwood, P.A.V. Barroso, M.F. Simon, E.R. Sujii, C.S.S. Pires, N. Bletrão, W.A. Lucena & E.C. Freire. 2006.** The cotton agricultural context in Brazil, p. 21-66. In A. Hilbeck, D.A Andow & E.M.G. Fontes (eds.), Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil. Cambridge, CABI Publishing, 373p.
- Freire, E.C. 2007.** História do algodão no cerrado, p.21-52. In E.C. Freire (ed.), Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, ABRAPA, 918p.
- García, M., F. Ortego, P. Castañera & G.P. Farinós. 2010.** Effects of exposure to the toxin Cry1Ab through Bt maize fed prey on the performance and digestive physiology of the predatory rove beetle *Atheta coriaria*. Biol. Control 55: 225- 233.

- Gillespie, J.P., M.R. Kanost & T. Trenczek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- Gould, F. & B.E. Tabashnik. 1998.** Bt-cotton resistance management, p. 65-105. In J. Rissler (ed.), *Now or never: serious new plans to save natural pest control*. Cambridge, Union of Concerned Scientists Publications Department, 149 p.
- Habib, M.E. & C.F.S. Andrade. 1998.** Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves. *Controle microbiano de Insetos*. Piracicaba, Livroceres, 1163p.
- Herrero, S.S., B. Oppert & J. Ferré. 2001.** Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- Hofte, H., & H.R. Whitely, 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242–255.
- Janmaat, A.F. & J. Myers. 2003.** Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 270:2263–2270.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, T. J. Dennehy, A. L. Patin, M. A. Sims, S. K. Meyer, & Y. Carriere. 2001.** Effects of *Bt* cotton and Cry1Ac Toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera:Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 1237-1242.
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakin, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599-606.
- Lövei, G.L., D.A. Andow & S. Arpaia. 2009.** Transgenic Inseticidal crops an natural enemies: a detailed review of laboratory studies. *Environ. Entomol.* 38: 293-306.

- Ma, G., H. Roberts, M. Sarjan, N. Featherstone, J. Lahnstein, R. Akhurst & O. Schmidt. 2005.** Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by acoagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 729-739.
- Martínez-Ramírez, A.C., F. Gould & J. Ferré. 1999.** Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystals proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 9: 239-246.
- Miranda, J.E. & Suassuna, N.D. 2004.** Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Goiânia, Fundação Goiás, 83p.
- Nakano, O. Marchini, L.C. & Batista, G.C. 1992.** Pragas do algodoeiro, In: Curso de entomologia aplicada à agricultura. Piracicaba, FEALQ, 219-246.
- Obrycki, J.J., J.E. Losey, O.R. Taylor & L.C.H. Jesse. 2001.** Transgenic insecticidal corn: beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *BioScience* 51: 353-361.
- Oppert, B., K.L. Kramer, D. Johnson, S.J. Upton & W.H. Mcgaughey. 1996.** Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* ryIA(c) protoxin. *Insect Molec. Biol.* 26: 571-583.
- Oppert, B., K.J. Kramer, R.W. Beeman, D. Johnson & W.H. Mcgaughey. 1997.** Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- Rahaman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari & O. Schmidt. 2004.** Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proc. Natl. Sci. USA* 101: 2696-2699.
- Romeis, J., D. Bartsch, F. Bigler, M.P. Candolfi, M.M.C. Gielkens, S.E. Hertley, R.L. Hellmich, J.E. Huesing, P.C. Jepson, R. Layton, H. Quemada, A. Raybould, R.I. Rose,**

- J. Schiemann, M.K. Sears, A.M. Shelton, J. Sweet, Z. Vaituzis & J.D. Wolt. 2008.** Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. *Nat. Biotech.* 26: 203-208.
- Santos, W.J. 1999.** Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro, p. 133-174. In E. Cia, E.C. Freire & W.J. Santos (orgs.), *Cultura do Algodoeiro*. Piracicaba, POTAFOS, 286p.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Sayyed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004.** Genetic and biochemical characterization of field evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010-7017.
- Silva, A.L., P.C. Neto Prado & H.F. Cunha. 1980.** Avaliação da produtividade, segundo efeitos da desfolha e eliminação de estruturas frutíferas nos diferentes estágios de algodoeiro. EMGOPA, Goiânia, 125p. (Relatório Técnico)
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in Eucalyptus in Brazil. *CABI Reviews: Persp. Agric. Vet. Sci.* 15: 1-16.
- Zanuncio, J.C., J.B. Alves, T.V. Zanuncio & J.F. Garcia. 1994.** Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *For. Ecol. Manage.* 65: 65-73.

CAPÍTULO 2

REPOSTA IMUNOLÓGICA DE *Alabama argillacea* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) FRENTE A FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER¹

ANDRESA C.B. OLIVEIRA², VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA³, HERBERT A.A. SIQUEIRA²,
THIAGO J. ALVES⁴ E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³

² Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel
de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Oliveira, A.C.B., Siqueira, H.A.A., V. Wanderley-Teixeira, T.J Alves & A.A.C. Teixeira. Resposta imunológica de *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidade) frente a formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner. A ser submetido.

RESUMO – O uso de toxinas Cry é um avanço no cultivo de plantas devido a sua alta especificidade e segurança para o meio ambiente, entretanto, uma séria ameaça à durabilidade desta tecnologia é o potencial de populações de insetos de desenvolver resistência às toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner. O conhecimento dos mecanismos de resistência é importante para prolongar a utilidade dos produtos à base de *B. thuringiensis*. Estudos recentes relatam evidências de um mecanismo de tolerância associado com resposta imune. Devido a importância de *Alabama argillacea* (Hübner) como praga da cultura do algodoeiro, esta pesquisa avaliou as alterações imunológicas (celular e humoral) frente as formulações a base de *B. thuringiensis* em *A. argillacea*. Os resultados sugerem que lagartas do 4º ínstar de *A. argillacea* não apresentam potencial para desenvolverem tolerância de natureza imunológica a formulados à base de *B. thuringiensis*. Dipel® ocasionou variação quantitativa em todos os tipos celulares enquanto XenTari® alterou prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Nos insetos tratados com Dipel® houve aumento no nível de óxido nítrico. As diferenças encontradas nas respostas aos tratamentos podem ser atribuídas às diferenças na composição dos inseticidas testados. Os resultados sugerem ainda que Dipel® (*B. thuringiensis* var. kurstaki HD-1, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) tem uma ação mais efetiva e mais rápida no controle de *A. argillacea*.

PALAVRAS-CHAVE: curuquerê do algodoeiro, imunologia, formulações Bt, tolerância

IMMUNE RESPONSE OF *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) TOWARDS
BASED *Bacillus thuringiensis* COMMERCIAL FORMULATIONS

ABSTRACT – The use of Cry toxins is a breakthrough in crop due to its high specificity and safety for the environment, however, a serious threat to the durability of this technology is the potential of insect populations to develop resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* Berliner. Knowledge of the mechanisms of resistance is important to extend the usefulness of products based on *B. thuringiensis*. Recent studies report evidence of a mechanism of resistance associated with immune response. Due to the importance of *Alabama argillacea* (Hübner) as pest of cotton crop, this study investigated the immunological changes (cellular and humoral) against the basic formulations of *B. thuringiensis*. The results suggest that the 4th instar larvae of *A. argillacea* do not have potential to develop tolerance of immun nature to formulations based on *B. thuringiensis*. Dipel® led to quantitative variation in all cell types while XenTari® changed prohemocytes, plasmacytes, granulocytes and oenocytoids. In insects treated with Dipel® was no increase in the level of nitric oxide. The differences found in responses to treatments can be attributed to differences in the composition of the insecticides tested. The results also suggest that Dipel ® (*Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki HD-1, containing Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) has a more effective and faster to control *A. argillacea*.

KEY WORDS: Cotton leafworm, immunology, Bt formulations, tolerance

Introdução

Uma das principais pragas do algodoeiro *Gossypium hirsutum* L. é o curuquerê, *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae) (Gravena & Cunha 1991, Jácome *et al.* 2001, Quirino & Soares 2001). Este inseto é nativo da América do Sul e Central, podendo ocorrer em todas as fases da cultura e é encontrada em todas as regiões do continente americano onde o algodão é cultivado (Almeida & Silva 1999). Por apresentar hábito monófago, ciclo de vida curto e movimentos de migração *A. argillacea* apresenta um elevado risco para evolução da resistência para as toxinas Cry (Santos 1999), situação que pode ser ainda mais preocupante levando-se em conta a expansão do uso de algodão Bt. Assim o conhecimento dos possíveis mecanismos de resistência é importante para prolongar a utilidade dos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (Herrero *et al.* 2001).

O principal mecanismo de resistência identificado em *P. interpunctella* e *P. xylostella* é a redução no acoplamento da toxina às membranas do epitélio do intestino médio (Van Rie *et al.* 1990, Bravo *et al.* 1992). Outros mecanismos também são citados como aumento no número de sítios de acoplamento em linhagens resistentes de *H. virescens* (Macintosh *et al.* 1991), decréscimo na solubilização ou ativação da toxina no intestino médio antes de atingir o sítio de ação, devido ao pH intestinal inadequado ou ausência de proteases específicas, redução na sensibilidade após a ligação da toxina nos sítios de ação (Gill *et al.* 1992, McGaughey & Whalon 1992) e aumento na taxa de reposição das células danificadas do intestino médio (Martínez-Ramírez *et al.* 1999, Loeb *et al.* 2001). Além desses, estudos mais recentes relatam evidências de um mecanismo de resistência associado com uma elevada resposta imune (Rahman *et al.* 2004). Ma *et al.* (2005) sugeriu que a resistência a Bt observada em *Helicoperva armigera* (Hübner) (Lep.: Noctuidae) está baseada na elevada resposta imune, envolvendo aumento da melanização e reações de coagulação que impediriam a solubilização das toxinas no lúmen intestinal.

O sistema imune dos insetos é comumente dividido em componentes humorais e celulares. A resposta humoral resulta da ação de proteínas presentes ou induzidas e são geralmente associadas a infecções por microorganismos. As moléculas efetoras da resposta humoral são os peptídios antimicrobianos (Gillespie *et al.* 1997). Os insetos também liberam compostos reativos de nitrogênio e oxigênio, como por exemplo, o óxido nítrico (NO) que tem sido apontado como molécula citotóxica contra patógenos em invertebrados (Nappi & Ottaviani 2000, Gourdon *et al.* 2001, Foley & O`Farel 2003), sendo o aumento da sua produção pelos hemócitos correlacionado com a resposta contra agentes estranhos (Faraldo *et al.* 2005). A resposta celular se refere à ação dos hemócitos, células presentes na hemolinfa (Gillespie *et al.* 1997), que envolve a fagocitose, formação de nódulos e encapsulação, e os tipos mais comumente relatados na literatura são prohemócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides. Este último tipo celular contém precursores citoplasmáticos de fenoloxidase e, provavelmente, desempenham papel na melanização da hemolinfa (Lavine & Strand 2002).

Diante da inexistência de estudos que descrevam as alterações ocorridas no sistema imune de *A. argillacea* após interação com *B. thuringiensis* e devido a importância de *A. argillacea* no Brasil como praga-chave do algodoeiro, esta pesquisa avaliou as alterações nos seus hemócitos, bem como modificações nos níveis de óxido nítrico e fenoloxidase produzidos na hemolinfa dos insetos tratados com formulações a base de *B. thuringiensis*, uma vez que, estas informações básicas são importantes para uma melhor avaliação do risco de evolução de resistência em *A. argillacea*.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia e no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção Manutenção e Criação dos Insetos. As lagartas *A. argillacea* utilizadas nos experimentos foram obtidas da criação oriunda do Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos, mantidas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (U.R) de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h, seguindo a metodologia descrita por Santos *et al.* (2008).

Instalação dos Biensaios. Larvas de *A. argillacea* no quarto ínstar (referente ao sétimo dia de eclosão) foram transferidas e individualizadas por 24 horas em tubos Falcon de 15mL, sem alimentação e mantidas nas mesmas condições descritas no item anterior. Posteriormente foram submetidas a dois tratamentos cada um constando de dez repetições: lagartas alimentadas com algodão tratado com as formulações comerciais Dipel[®] (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) e XenTari[®] (*B. thuringiensis* var. *aizawai* ATTC SD-1372, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D), além da testemunha (água destilada contendo o espalhante adesivo Triton X-100). Para os tratamentos utilizou-se CL_{30S} (0,9 mg/L) que foram estimadas através de ensaios de suscetibilidade realizados anteriormente. Discos de folhas de 5 cm de diâmetro foram imersos por 1 minuto na suspensão do inseticida a ser utilizado e após secagem à temperatura ambiente foram oferecidas para as lagartas. As coletas da hemolinfa foram realizadas nos intervalos de 20, 40 e 60 minutos após os tratamentos.

Coleta de Hemolinfa para Contagem Total e Diferencial. Para contagem total de hemócitos realizou-se uma pequena incisão entre as falsas pernas dos insetos e uma alíquota de 10 μ L de hemolinfa foi diluída em 20 μ L de tampão fosfato salino pH 7 (PBS), de onde 10 μ L foi depositado em câmara de Neubauer e a contagem realizada mediante observação em microscópio

óptico de luz OLYMPUS® BX-49. A coleta da hemolinfa para a contagem diferencial foi feita através de uma incisão entre as falsas pernas da lagarta. Com o auxílio de uma micropipeta, foi coletado 5µL de hemolinfa que em seguida foi depositada em lâminas de vidro para realizar o esfregaço. Os esfregaços foram mantidos à temperatura ambiente para secagem, visando permitir uma melhor adesão dos hemócitos à lâmina. O material foi fixado em metanol por cinco minutos e, em seguida, submetido à coloração de Giemsa durante o mesmo período. Realizou-se uma lavagem rápida das lâminas com água destilada para a retirada do excesso de corante, deixando-as secar em temperatura ambiente para posterior montagem com Entellan. Foram confeccionadas 5 lâminas, constituindo 5 repetições para cada intervalo de tempo/tratamento, contendo hemolinfa de 5 insetos cada. A contagem diferencial dos hemócitos foi realizada utilizando-se microscópio de luz da marca OLYMPUS BX-49. Para análise da dinâmica hemocitária, foram observadas e contadas 300 células (Falleiros *et al.* 2003) por lâmina de todos os tratamentos. Os dados das contagens total e diferencial foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 3 x 3, considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel® e XenTari®), e os três intervalos de avaliação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade. Após teste de normalidade, os dados da contagem total foram transformados para $(x + 0,5)$, enquanto que os da contagem diferencial foram transformados em $\sqrt{(x + 0,5)}$, apenas para análise dos adipohemócitos e oenocitóides. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 1999-2001).

Análise dos Níveis de Óxido Nítrico e Fenoloxidase na Hemolinfa. A produção de óxido nítrico foi determinada com base no reagente de Griess (Green *et al.* 1981), conforme metodologia descrita em Faraldo *et al.* (2005). Foram realizadas comparações das concentrações do íon nitrito (NO₂⁻) nas amostras de hemolinfa coletadas nos intervalos de 20,40 e 60 minutos após tratamento com as formulações de *B. thuringiensis*. Cada amostra constou de 10 µL de hemolinfa de lagartas

de quarto ínstar, depositadas em tubo Eppendorf contendo 70 μL de sulfanilamida (1%) em H_3PO_4 (5%). Após coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Para determinar as concentrações de NO_2^- , uma alíquota de 30 μL de cada amostra/intervalo/tratamento (cinco amostras no total) foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços, depois foi adicionado 30 μL de sulfanilamida (1%) em H_3PO_4 (5%). Após 10 minutos, foi adicionado 30 μL de naphthylenediamine dihydrochloride (NEED, Sigma, St. Louis, MO). Após 10 minutos, a absorbância foi medida com um leitor de microplacas (Biotek®) com filtro de 562 nm. O NO_2^- foi quantificado usando uma curva padrão de NaNO_2 como referência. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 3 x 3, considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel® e XenTari®), e os três intervalos de avaliação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade. Após teste de normalidade, os dados foram transformados $\log(x + 1)$, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001). Para as análises dos níveis de fenoloxidase, uma alíquota de 10 μL de hemolinfa foi coletada e depositada em tubo Eppendorf contendo 90 μL de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,0). A hemolinfa foi depositada em placa de fundo chato de 96 poços, contendo L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e tampão PBS (pH 7,0). A atividade da PO (unidade/mg) foi calculada após as medidas de absorbância das amostras em leitora (Biotek®) com filtro de 490 nm, utilizando o software Gen 5. A concentração de proteína total das amostras foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (Smith 1985) usando um kit de análise de proteínas (Pierce Co.). A curva padrão foi estabelecida usando albumina de soro bovino (BSA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 3 x 3, considerando os três tratamentos (testemunha, Dipel® e XenTari®), e os três intervalos de avaliação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD a 5% de probabilidade.

Resultados

Na contagem total dos hemócitos circulantes na hemolinfa de lagartas do 4º ínstar de *A. argillacea* não houve interação entre tratamento x tempo ($F= 0,97$, $P = 0,4309$), sendo então os dados dos diferentes intervalos de tempo agrupados para observação da variação quantitativa das células em função dos inseticidas. Nos insetos tratados com Xentari[®], houve aumento significativo no número total de hemócitos em relação à testemunha e ao Dipel[®], não sendo detectada variação significativa no número de hemócitos dos insetos submetidos ao Dipel[®] em relação à testemunha (Tabela 1).

A análise morfológica revelou a existência de seis tipos celulares na hemolinfa de *A. argillacea*: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides, esferulócitos e adipohemócitos.

Através da análise de regressão foram obtidas equações, de acordo com a significância ($P \leq 0,05$), que explicam a dinâmica hemocitária ao longo do tempo/tratamento (Tabela 2). Adipohemócitos e esferulócitos não apresentam equações de regressão, pois os percentuais da contagem diferencial destas células não se ajustaram ao modelo estatístico.

A dinâmica hemocitária ao longo dos intervalos de avaliação após tratamentos foi variável para prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides enquanto se manteve constantes nos adipohemócitos e esferulócitos (Fig. 1). Nos insetos tratados com Dipel[®] não verificou-se uma redução significativa dos prohemócitos em relação à testemunha no intervalo de 20 minutos, porém nos intervalos de 40 e 60 minutos essa redução ocorreu em relação aos tratamentos testemunha e XenTari[®]. No tratamento com XenTari[®] os prohemócitos aumentaram significativamente em relação a testemunha e Dipel[®] nos intervalos de 20 e 40 minutos e no intervalo 60 minutos apenas para o Dipel[®].

O número de plasmatócitos diminuiu significativamente tanto com o Dipel[®] quanto com o XenTari[®], apenas no intervalo de 20 minutos. O número de granulócitos aumentou significativamente no tratamento com Dipel[®] nos intervalos de 20 e 40 minutos em relação a testemunha e XenTari[®], já no intervalo de 60 minutos esse aumento só foi em relação a testemunha. Também houve aumento significativo nesse tipo celular no tratamento com XenTari[®] no intervalo de 60 minutos em relação à testemunha.

Em relação aos oenocitóides, só houve diferença estatística nos insetos tratados com Dipel[®], com diminuição nos intervalos de 20 (testemunha e XenTari[®]) e 60 minutos (testemunha).

Na contagem diferencial, a análise de variância mostrou que apenas adipohemócitos e esferulócitos não apresentaram interação tratamento x tempo ($F= 0,94$, $P= 0,4530$ e $F= 1,14$, $P= 0,3546$, respectivamente), os dados foram então agrupados para observar a variação desses tipos celulares em função dos inseticidas testados. Nos insetos tratados com Dipel[®] houve uma diminuição no número de adipohemócitos e um aumento dos esferulócitos, enquanto no tratamento com XenTari[®] não houve variação significativa desses tipos celulares em relação à testemunha (Fig. 2).

Os níveis de óxido nítrico não diferiram estatisticamente nos diferentes intervalos de tempo, ou seja, não houve interação tratamento x tempo ($F=0,83$, $P= 0,5135$), logo os dados dos diferentes intervalos de tempo foram agrupados para observação da variação em função dos inseticidas. Nos insetos tratados com Dipel[®], houve aumento significativo no nível de óxido nítrico em relação à testemunha (Tabela 3).

A atividade da enzima fenoloxidase não diferiu entre os tratamentos nem entre os diferentes intervalos de tempos testados em relação à testemunha (Tabela 4).

Discussão

O tratamento com Dipel[®] não provocou modificação significativa no número total de hemócitos porém, ocasionou variação quantitativa em todos os tipos celulares presentes na hemolinfa, enquanto o XenTari[®] alterou a frequência de apenas quatro tipos celulares: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Os seis tipos celulares evidenciados na hemolinfa de *A. argillacea* seguiram o padrão morfológico descrito na literatura para a Ordem Lepidoptera (Negreiro *et al.* 2004, Correia *et al.* 2008, Huang *et al.* 2010).

Segundo Lavigne & Strand (2002), os prohemócitos são células hematopoiéticas responsáveis pela formação dos demais tipos de hemócitos. Este fato explica a diminuição desse tipo celular nos insetos tratados com Dipel[®], pois estas células estão se diferenciando nos demais tipos celulares necessários na resposta à infecção. A redução dos prohemócitos pode estar associada ao aumento no número de granulócitos e esferulócitos, pois segundo Negreiro *et al.* (2004) estas células se diferenciam em plasmatócitos e estes os granulócitos. Os granulócitos são pluripotentes e dão origem aos esferulócitos. A maior quantidade de granulócitos ocorreu porque estas células participam do reconhecimento de partículas estranhas na hemolinfa e estão envolvidas nos processos de fagocitose e destoxificação (Nardi 2004, Ribeiro & Brehélin 2006). O aumento tardio do número de granulócitos nos insetos tratados com XenTari[®] (60 minutos) sugere uma ação mais lenta desse inseticida para desencadear variações na dinâmica hemocitária de *A. argillacea*.

Em relação aos plasmatócitos, a diminuição nos tratamentos com os dois inseticidas no menor intervalo de tempo, pode ser explicada pelo envolvimento desse tipo celular no processo de fagocitose. Segundo Gillespie *et al.* (1997) a fagocitose é a linha de defesa primária da resposta celular às infecções microbianas.

Segundo a literatura, a mais provável função dos oenocitóides é a produção de fenoloxidase (Lavine & Strand 2002, Silva 2002, Shrestha & Kim, 2009), contudo, esta não parece ser sua atividade principal dentro da dinâmica hemocitária dos insetos tratados com Dipel[®], já que o seu número diminuiu, porém sem alterações significativas na produção de fenoloxidase. Giulianini *et al* (2003) atribuiu a estas células a função de fagocitose em larvas de *Cetonischema aeruginosa* Drury (Col.: Scarabaeidae), mostrando que esse tipo celular pode desempenhar outras funções na resposta imune dos insetos, no entanto, diferenças existentes entre as espécies torna difícil a generalização das funções dessa célula.

A diminuição no número de adipohemócitos nos insetos tratados com Dipel[®] pode ser explicada pelo fato de estas células serem as responsáveis pela reserva energética. Provavelmente está havendo um gasto de energia para tentar reparar os danos causados pela toxina Cry (Hillyer & Christensen 2002). Já o aumento no número de esferulócitos pode ser atribuído à participação deste tipo celular na defesa contra bactérias (Yeaton 1983, Rattcliffe *et al.* 1985).

A produção de óxido nítrico não diferiu entre os intervalos de tempos testados, porém, os insetos tratados com Dipel[®] apresentaram produção mais elevada em relação à testemunha, mostrando que os reativos intermediários fazem parte do arsenal citotóxico empregado na defesa de *A. argillacea* contra essa formulação a base de *B. thuringiensis*. Diversos trabalhos mostram o aumento da produção de óxido nítrico na hemolinfa de insetos como resposta aos agentes estranhos (Nappi *et al* 2000, Faraldo *et al* 2005, Molina-Cruz *et al.* 2007).

A cascata de profenoloxidase é um conjunto de enzimas que oxidam derivados da tirosina às suas quinonas correspondentes e seus produtos de polimerização, a melanina (Nappi & Vass 1993), que está diretamente envolvida em várias respostas imunes contra parasitas e patógenos incluindo encapsulação e nodulação (Beckage 1985). Pesquisas têm relacionado tolerância a patógenos com reações de melanização e consequente envolvimento da cascata de

profenoloxidase (Wilson *et al.* 2001); em relação a *B. thuringiensis*, estudos apontam para uma forte ligação entre reação de melanização e tolerância à toxinas Cry. Rahaman *et al.* (2004) observaram que tratar larvas de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) com doses subletais de formulação a base Bt levou a uma elevada reação de melanização na hemolinfa, que estava proporcionalmente relacionada com o aumento da tolerância à toxina; Ma *et al* (2005) sugeriram um mecanismo de resistência à Bt em linhagem de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep.: Noctuidae) baseado no aumento da melanização e reações de coagulação no lúmen intestinal. Estes autores observaram que enquanto o plasma da linhagem resistente apresentou forte reação de melanização após 1h de alimentação com dose subletal da toxina Cry1Ac, nenhuma melanização significativa ocorreu no plasma das lagartas suscetíveis.

Os resultados sugerem que lagartas do 4º ínstar de *A. argillacea* não apresentam potencial para desenvolverem tolerância de natureza imunológica a formulados à base de *B. thuringiensis*. As diferenças encontradas nas respostas aos tratamentos podem ser atribuídas a diferente composição dos inseticidas testados. Os resultados sugerem ainda que Dipel® (*B. thuringiensis* var. kurstaki HD-1, contendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa Cry2Ab) tem uma ação mais efetiva e mais rápida no controle de *A. argillacea*.

Agradecimentos

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho.

Literatura Citada

- Almeida, R.P. & C.A.D. Silva. 1999.** Manejo integrado de pragas do algodoeiro, p.753-820. In N.E.M. Beltrão (ed.), O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília, Embrapa/Algodão, 1023p.
- Beckage, N.E. 1985.** Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 30: 371-413.
- Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, M. Peferoen. 1992.** Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 247-253.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2008.** Dinâmica hemocitária en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas con nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Bol. Sanidad Veg. Plagas* 34: 357-365.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46:287-294.
- Faraldo, A.C., A. Sá-Nunes, E.A. Del Bel, L.H. Faccioli & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 13: 240-246.
- Foley, E. & P.H. O'Farrel. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Develop.* 17: 115-125.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, P.V. Pietrantonio. 1992.** The mode of action os *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost & T. Trenczek. 1997.** Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.

- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003.** Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in *in vivo* phagocytosis. *Tissue Cell* 35: 243–251.
- Gourdon, I., M.C. Guérin, J. Torreilles & P. Roch. 2001.** Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 5:1-6.
- Gravena, S. & H.F. Cunha. 1991.** Artrópodes Predadores na Cultura Algodoeira. Jaboticabal, FUNEP, 120p.
- Green, L.C., K.R. De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764–7768.
- Herrero, S.S., B. Oppert & J. Ferré. 2001.** Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- Hillyer, J.F. & B.M. Christensen. 2002.** Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 117: 431-440.
- Huang, F. Y.Yanga, M. Shi, J. Li, Z. Chenc, F. Chenc, X. Chena. 2010.** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: Cell types and their role in phagocytosis. *Tissue Cell* 42: 360–364.
- Jácome, A.G, J.J. Soares, R.H. Oliveira & F.P. Cordão Sobrinho. 2001.** Efeito da remoção das folhas no desenvolvimento vegetativo e na produção do algodoeiro. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 36: 751-755.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1295-1309.
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakin, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599-606.

- Ma, G., H. Roberts, M. Sarjan, N. Featherstone, J. Lahnstein, R. Akhurst & O. Schmidt. 2005.** Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 729-739.
- Macintosh, S.C., T.B. Stone, R.S. Jokerst & R.L. Fuchs. 1991.** Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8930-8933.
- McGaughey, W.H. & D.E. Johnson. 1992.** Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to different strains and mixtures of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 85: 1594-1600.
- Martínez-Ramírez, A.C., F. Gould & J. Ferré. 1999.** Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystals proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 9: 239-246.
- Molina-Cruz, A., R.J. Dejong, B. Charles, L. Gupta, S. Kumar, G. Jaramillo-Guatierrez & C. Barillas-Mury. 2007.** Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 28: 3217-3223.
- Nappi, A.J. & E. Vass, 1993.** Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. *Pigment Cell Res.* 6: 117-126.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469-480.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey & Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 4: 423-430.
- Nardi, J.B. 2004.** Embryonic origins of the two main classes of hemocytes – granular cells and plasmatocytes – in *Manduca sexta*. *Develop. Genes Evol.* 214: 19-28.

- Negreiro, M.C.C., F.G. Andrade & A.M.F. Falleiros. 2004.** Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. Semina: Cienc. Agric. 25: 293-308.
- Quirino, E.S & J.J. Soares. 2001.** Efeito do ataque de *Alabama argillacea* no crescimento vegetativo e sua relação com a fenologia do algodoeiro. Pesqu. Agropecu. Bras. 36: 1005-1010.
- Rahaman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari & O. Schmidt. 2004.** Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. Proc. Natl. Sci. USA 101: 2696-2699.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald & C.P. Rhódes. 1985.** Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97: 183-279.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect hemocytes: what type of cell is that? J. Insect Physiol. 52: 417-429.
- Santos, W.J. 1999.** Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro, p. 133-174. In E. Cia, E.C. Freire & W.J. Santos (orgs.), Cultura do algodoeiro. Piracicaba, POTAFOS, 286p.
- Santos, R.B., J.B. Torres & C.S. Bastos. 2008.** Desenvolvimento e crescimento populacional de *Alabama argillacea* em algodão de fibra branca e colorida. Pesqu. Agropecu. Bras. 43: 457-463.
- SAS Institute.1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Silva, C.C.A. 2002.** Aspectos do sistema imunológico dos insetos. Biotecnol. Cienc. Desenv. 24: 68-72.
- Shrestha, S. & Y. Kim. 2009.** Oenocytoid cell lysis to release prophenoloxidase in induced by eicosanoid via protein kinase C. J. Asia Pac. Entomol. 12: 301-305.

Van Rie, J., W.H. McGaughey, D.E. Johson & H. Van Mellaert. 1990. Mechanism of resistance to microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.

Wilson, K. , C.C. Sheena, A. F. Reeson & J. K. Pell. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.* 4: 637-649.

Yeaton, R.L.W. 1983. Wound responses in insects. *Am. Zool.* 23: 195-203.

Tabela 1. Contagem total (%) dos hemócitos por μL de hemolinfa de lagartas de *Alabama argillacea* não tratadas e tratadas com Dipel® e XenTari®.

Tratamento	N	Média ($\pm\text{EP}$)	Estatística ¹
			F= 5,50; P=0,0056
Testemunha	30	66,80 \pm 0,55 a	
Dipel®	30	62,67 \pm 0,67 a	
XenTari®	30	79,44 \pm 0,79 b	

¹Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 2. Equações para as proporções (%) e respectivos parâmetros de ajuste (F, Teste de Fisher; P, valor de significância e R², coeficiente de determinação) da contagem diferencial de prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides de *Alabama argillacea* não tratadas e tratadas com Dipel® e XenTari® em função dos intervalos de 20, 40 e 60 minutos após tratamento.

Tipos de hemócitos	Tratamentos	Equações	F ^P	r ²
Prohemócitos	Testemunha	$\hat{y} = 8,97 + 0,236x$	15,62 ^{0,0017}	0,54
	Dipel®	$\hat{y} = 14,02 - 0,153x$	16,09 ^{0,0015}	0,55
	XenTari®	$\hat{y} = \text{média} = 24,24$	0,07 ^{0,8024}	
Plasmatócitos	Testemunha	$\hat{y} = 49,73 - 0,293x$	18,23 ^{0,0009}	0,58
	Dipel®	$\hat{y} = \text{média} = 30,73$	4,44 ^{0,0551}	
	XenTari®	$\hat{y} = \text{média} = 31,33$	1,19 ^{0,2950}	
Granulócitos	Testemunha	$\hat{y} = \text{média} = 25,46$	0,02 ^{0,8829}	
	Dipel®	$\hat{y} = \text{média} = 41,62$	1,27 ^{0,2798}	
	XenTari®	$\hat{y} = \text{média} = 27,42$	1,25 ^{0,2846}	
Oenocitóides	Testemunha	$\hat{y} = \text{média} = 5,46$	0,79 ^{0,3902}	
	Dipel®	$\hat{y} = \text{média} = 3,06$	0,15 ^{0,7039}	
	XenTari®	$\hat{y} = 8,08 - 0,073x$	12,70 ^{0,0035}	0,49

Tabela 3. Concentrações de óxido nítrico (μM de $\text{NO}_2^-/\mu\text{L}$ de hemolinfa) em lagartas de *Alabama argillacea* submetidas aos inseticidas Dipel® e XenTari®.

Tratamento	N	Média (\pm EP)	Estatística ¹
			F= 3,33; P=0,0438
Testemunha	18	2,07 \pm 0,14 b	
Dipel®	18	2,28 \pm 0,13 a	
XenTari®	18	2,13 \pm 0,13 ab	

¹Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD (P>0,05).

Tabela 4. Atividade de fenoxidase (OD/min/mg) em lagartas de *Alabama argillacea* submetidas aos inseticidas Dipel® e XenTari®.

Tratamento	N	Média (\pm EP)	Estatística ¹
			F= 0,85; P=0,4327
Testemunha	30	1,8 \pm 0,17 a	
Dipel®	30	1,9 \pm 0,15 a	
XenTari®	30	2,2 \pm 0,22 a	

¹Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD (P>0,05).

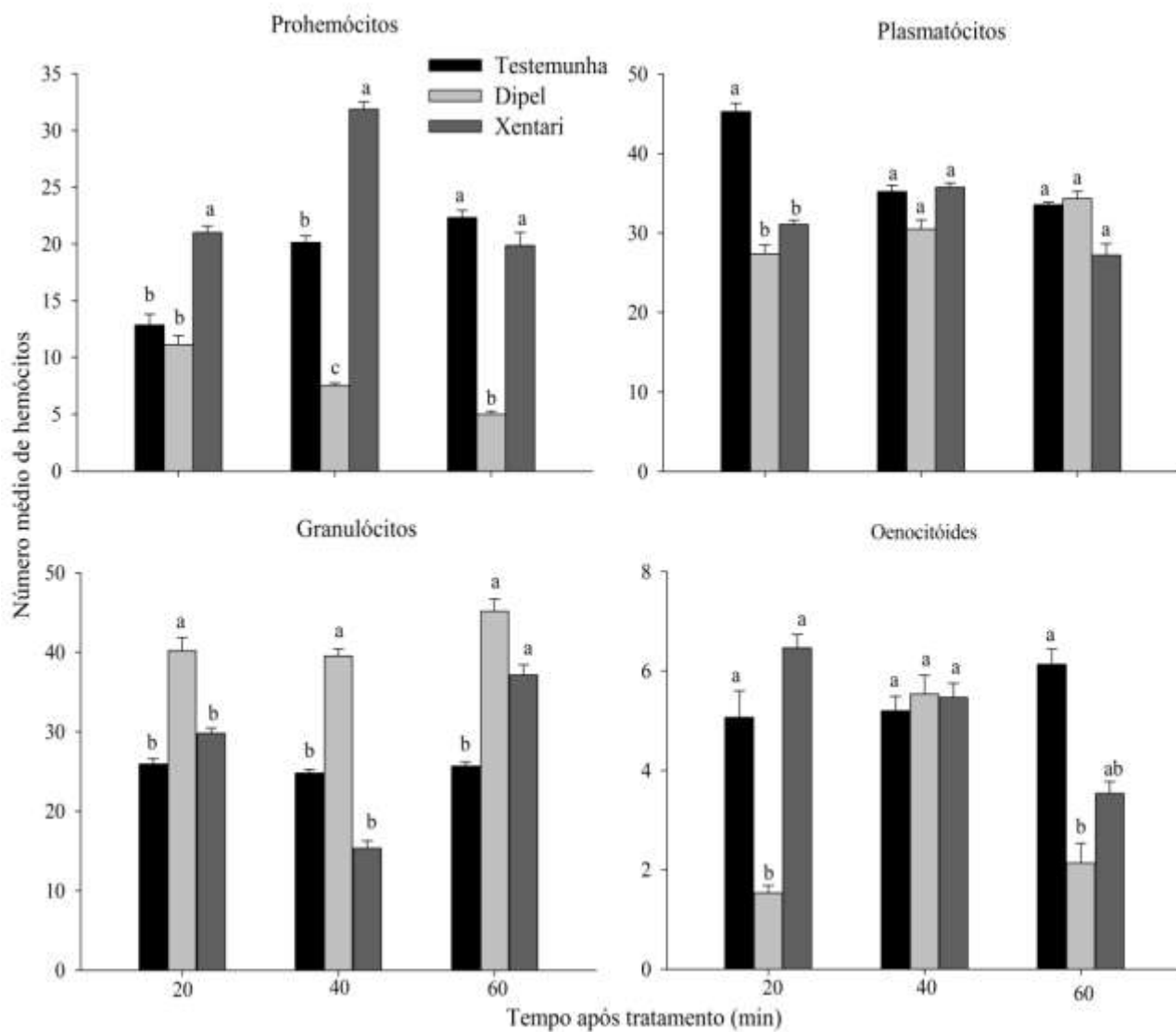


Figura 1. Média (+ EP) da contagem diferencial (%) dos hemócitos de lagartas de *Alabama argillacea* alimentadas com folhas de algodão tratadas e não tratadas com Dipel® e Xentari®. Médias indicadas com diferentes letras ao longo do tempo diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Nota-se que os valores na escala do eixo y diferem entre os tipos de hemócitos.

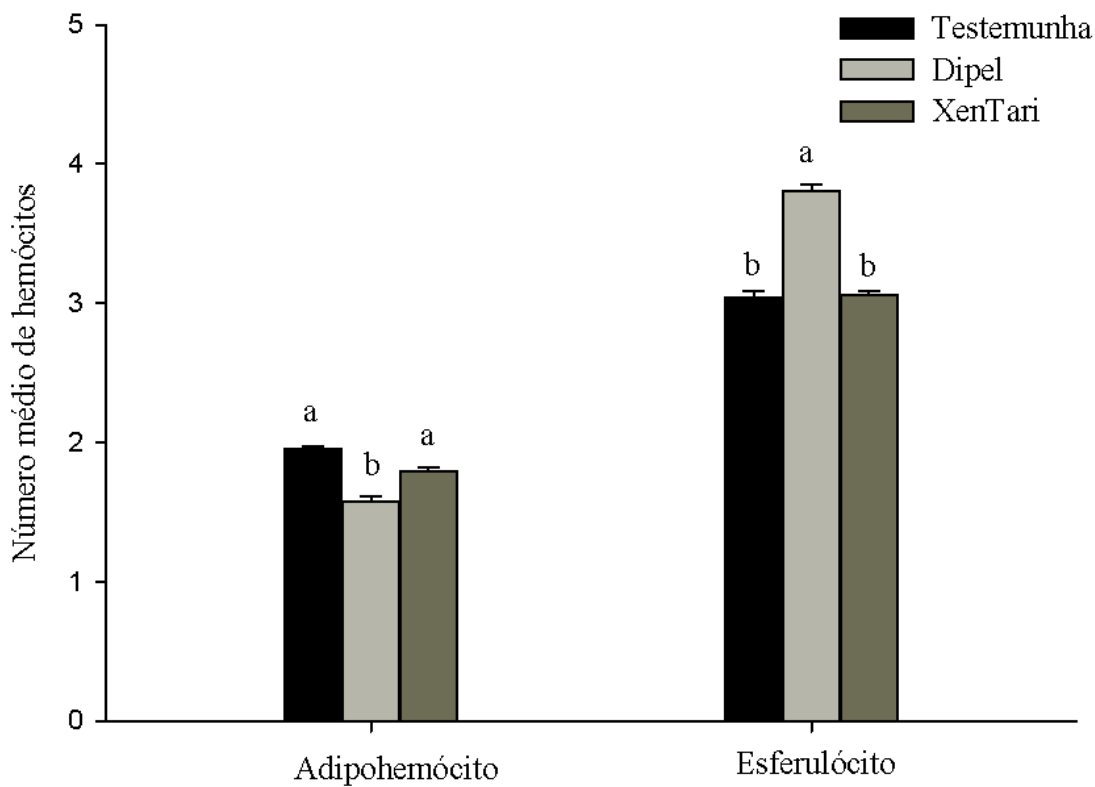


Figura 2. Média (+EP) da contagem diferencial (%) dos adipoheмоcitos e esferulócitos de lagartas de *A. argillacea* alimentadas com folhas de algodão tratadas e não tratadas com Dipel® e XenTari®. Médias indicadas com diferentes letras ao longo do tempo diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO SUCO DIGESTIVO DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) SOBRE A TOXINA CRY1AC¹

ANDRESA C.B. OLIVEIRA², HERBERT A.A. SIQUEIRA², VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA³,
THIAGO J. ALVES⁴ E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³

² Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel
de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹Oliveira, A.C.B., Siqueira, H.A.A., V. Wanderley-Teixeira, T.J Alves & A.A.C. Teixeira. Atividade proteolítica do suco digestivo de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) sobre a toxina Cry1Ac. A ser submetido a Biological Control.

RESUMO - O uso de plantas geneticamente modificadas com genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) visando à proteção completa da planta contra insetos praga têm obtido grande destaque no cenário agrícola mundial. Porém, uma importante questão levantada em relação ao uso de culturas Bt é o efeito sobre insetos não-alvos. Estes organismos podem ser expostos às toxinas Cry tanto pela alimentação direta sobre a planta como também pela transferência através da cadeia alimentar (via presa). Por isso, informações sobre a interação dessas toxinas sobre insetos alvos e não-alvos, como herbívoros e inimigos naturais, são de valor para a comunidade científica, sendo assim é importante explicar se a ação proteolítica de enzimas digestivas contribuem para a tolerância de inimigos naturais às toxinas Cry. Assim, a atividade de proteinases do tubo digestivo de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) e atividade proteolítica das mesmas sobre Cry1Ac foi testada *in vitro* em intervalos de tempo e quantidades de enzimas digestivas. Os resultados indicaram que as principais enzimas do tubo digestivo de *P. nigrispinus* são serino-proteases e proteases cisteínicas que atuam em pH levemente ácido até neutro. Os resultados sugerem que as enzimas presentes no tubo digestivo aparentemente não processam a toxina Cry1Ac ativada antes de 12 horas no intestino.

PALAVRAS-CHAVE: Percejevos predadores, proteinases digestivas, plantas transgênicas

PROTEOLYTIC ACTIVITY TOWARDS THE CRY1AC TOXIN FROM GUT CONTENTS OF

Podisus nigrispinus (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

ABSTRACT – The use of plants genetically modified with genes from the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) aimed at comprehensive protection of plants against insect pests have achieved great prominence in world agricultural scenario. However, one important question raised regarding the use of Bt crops is the effect on non-targets insects. These organisms may be exposed to the Cry toxins either by direct feeding on the plant but also by transfer through the food chain (via prey). Therefore, information on distribution and interaction of these toxins on targets and non-targets insects, such as herbivores and natural enemies, are of value to the scientific community, so it's important to explain if the proteolytic activity of digestive enzymes contribute to tolerance natural enemies to Cry toxins. Thus, the proteinase activity of the digestive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) and proteolytic activity on the same Cry1Ac was tested *in vitro* in different time and amounts of digestive enzymes. The results indicated that the major enzymes of the digestive tract of *P. nigrispinus* are serine-proteases and cysteine proteases that act in mildly acidic to neutral and the results suggest that mainly digestive enzymes apparently were not able to process the toxin Cry1Ac activated whitin 12 hours of incubation in the gut.

KEY WORDS: Predatory stinkbugs, digestive proteinases, transgenic crop

Introdução

Diante da expansão do uso de plantas transgênicas que expressam toxinas Cry, é importante estudar a associação dessas toxinas com organismos não alvos (Andow & Hilbeck 2004, Sanvido *et al.* 2007). Culturas de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, em muitas partes do mundo, têm conduzido questões sobre seu potencial impacto sobre a biodiversidade, particularmente sobre insetos herbívoros e inimigos naturais (Fontes *et al.* 2002), pois estes podem interagir expondo-se diretamente a toxina através da alimentação sobre a planta ou de seus produtos que contém a toxina ou, ainda, indiretamente através de presas contaminadas que ingerem e expõem a toxina aos inimigos naturais (O'Callaghan *et al.* 2005).

Pentatomídeos do gênero *Podisus* são predadores importantes usados como agentes de controle biológico de lagartas desfolhadoras dentro do manejo integrado de pragas (De Clercq 2000, Zanuncio *et al.* 2002). *Podisus maculiventris* (Say) (Het.: Pentatomidae) é provavelmente a espécie mais importante na Europa e Estados Unidos dentro desse contexto, enquanto *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het.: Pentatomidae) é a principal espécie nas Américas do Sul e Central (Zanuncio *et al.* 2002). Esses predadores possuem comportamento alimentar bastante diversificado incluindo em sua dieta, uma suplementação extraída de plantas hospedeiras de suas presas (Stoner *et al.* 1974, Valicente & O'Neil 1995, Coll 1998), o que aumenta o risco de contato com toxinas Cry quando expostos à culturas Bt.

Com o advento da tecnologia da genética molecular, pesquisadores têm sido capazes de criar plantas transgênicas que expressam novos componentes, como por exemplo culturas Bt que expressam genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Andow & Hilbeck 2004). Essa bactéria é gram-positiva, ocorre em solos (Hofte & Whitely 1989) e durante sua fase de esporulação produz inclusões cristalinas que são pró-toxinas chamadas delta-endotoxinas. Essas estruturas também chamadas proteínas Cry, quando ingeridas pelos insetos são dissolvidas em

seu intestino e ativadas por proteases digestivas. A toxina se liga a receptores específicos sobre a superfície das células de revestimento do intestino médio, causando desequilíbrio na concentração iônica, destruindo as células e resultando na morte do inseto (Bravo *et al.* 2007, Gómez *et al.* 2007).

Estudos têm avaliado o efeito de culturas transgênicas que expressam inibidores de proteinases sobre predadores do gênero *Podisus* e Bell *et al.* (2003) relataram alguns efeitos prejudiciais sobre a fecundidade do predador generalista *P. maculiventris* usando presas que ingeriram folhas de batata transgênica; Bell *et al.* (2005) caracterizaram as proteinases do tubo digestivo e glândulas salivares de *P. maculiventris* através do uso de inibidores expressos em plantas transgênicas, e sugeriram também a existência de efeitos adversos para esse predador através da ação sobre atividade proteolítica.

Segundo Torres *et al.* (2010) *P. nigrispinus* não é capaz de adquirir a toxina Cry1Ac quando se alimenta diretamente sobre o algodão transgênico, no entanto estudos com *P. maculiventris* mostram que este predador adquire a toxina após ingestão de larvas alimentadas com algodão transgênico. Apesar disso o predador aparentemente não sofre efeitos adversos pela toxina (Torres *et al.* 2006a). No entanto, não há informações sobre a fisiologia digestiva de *P. nigrispinus* associado com plantas Bt, e ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo que permite ao predador não ser susceptível às toxinas Cry. Assim, diante da importância agrícola dessa espécie no Brasil e considerando que a mesma não tem recebido tanta atenção dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* se há processamento proteolítico da toxina ativa depois da interação com proteínas do tubo digestivo de *P. nigrispinus*, para testar a hipótese de que o predador é capaz de degradar a toxina Cry1Ac no seu sistema digestivo.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Obtenção e Criação dos Insetos. Os adultos de *P. nigrispinus* utilizados nos experimentos foram obtidos a partir da criação existente no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantida de acordo com a metodologia descrita por Torres *et al.* (2006b).

Extração do Conteúdo Digestivo. Adultos de *P. nigrispinus* foram resfriados a -20°C por cerca de 5 minutos e então dissecados com o auxílio de estereomicroscópio OPTON MODELO SE2000. Os tubos digestivos foram imediatamente transferidos para tubos de microcentrífuga resfriados com capacidade para 1,5 mL contendo solução 0,15M de NaCl (1 tubo/ 40 μl) e centrifugados a 10.000g/4 $^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos. Depois disso o sobrenadante contendo as proteinases foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20°C até o uso. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Smith *et al.* 1985) usando um kit de análise de proteínas (Pierce Co.). A curva padrão foi estabelecida usando albumina de soro bovino (BSA). A concentração protéica de cada amostra foi padronizada para 2,5 mg/mL de proteína total.

Determinação de pH Ótimo para Atividade Enzimática. Para avaliar a atividade de serino proteases, substratos sintéticos específicos foram utilizados: N- α -benzoil-L-arginina ρ -nitroanilida (BapNA) para tripsina e proteases cisteínicas, N-succinil-ala-ala-pro-phe- ρ -nitroanilida (SAAPF ρ NA) para quimiotripsina e N-succinil-ala-ala-pro-leu ρ -nitroanilida (SAAPL ρ NA) para elastase. Todos os substratos foram obtidos da Sigma (Sigma Co.) e utilizados a uma concentração final de 1mM. As amostras foram diluídas 1:10 em diferentes tampões: 0,1M ácido cítrico –NaOH (pH 3); 0,1M citrato de sódio (pH 4-6); 0,1M tris-HCl (pH 7-9); 0,1M Glicina (pH 10), todos

contendo 0,15 M de NaCl e 20mM de CaCl₂. 50 µl das amostras diluídas nos diferentes tampões foram adicionadas em poços de placa de microtitulação e em seguida foi adicionado 50µL do substrato diluído no mesmo tampão para iniciar a reação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os brancos apropriados foram corridos em todos os casos. Depois de 12 horas de incubação à temperatura de 30°C, a absorbância foi monitorada a 405 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek[®]) e o software Gen 5[®]. Os experimentos foram repetidos por três vezes e a média foi obtida dos dados das três repetições.

Inibição Enzimática. O efeito de inibidores de proteinases sobre a atividade proteolítica do tubo digestivo foi avaliado. Os inibidores utilizados foram: trans-Epoxy succinil-L-leucilamideo (4-guanidino) butano (E-64) para proteases cisteínicas; fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) para serino proteases; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para metalo-proteases; 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona (TLCK) para tripsina e 1-cloro-3-tosilamido-4-fenil-2-butanona (TPCK) para quimiotripsina. Os mesmos foram preparados em soluções aquosas (E-64, TLCK e EDTA), em etanol (TPCK) ou metanol (PMSF) nas concentrações de 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 10⁰ e armazenados à -20°C. As incubações foram conduzidas no pH 6, com o inibidor pré-incubado com a enzima à 30°C por 15 minutos antes da adição do substrato, a absorbância foi monitorada a 405nm e a atividade inibitória foi mostrada como porcentagem residual quando comparada com o controle do teste.

Interação das Enzimas Digestivas de *P. nigrispinus* com a Toxina Cry1Ac *in vitro*. O processamento proteolítico da toxina Cry1Ac foi avaliado pela incubação de 3µg da toxina ativa com proteínas digestivas de *P. nigrispinus* (8µg de proteína total) em um volume final de 13,33µL em tampão citrato de sódio (pH 6). As amostras foram incubadas à 30°C por diferentes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 45, 60 minutos; 12 e 24 horas. As reações foram paradas pelo aquecimento das amostras à 95°C por 5 minutos; após resfriar à temperatura ambiente, as amostras

foram diluídas 2:1 com tampão Laemmli (Laemmli 1970) e novamente aquecidas à 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas. Uma alíquota de 40 µL de cada amostra foi submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Usando-se a mesma metodologia, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de proteínas digestivas (5, 10, 15 e 20µg) sobre o processamento proteolítico da toxina Cry1Ac (3µL). Os experimentos foram conduzidos em aparato de eletroforese mini-vertical usando gel separador de 7,5% de acrilamida. A corrida foi executada usando-se um sistema de tampão descontínuo Tris-glicina, a uma corrente constante de 25 mA por aproximadamente 40 minutos. Os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, álcool metílico e ácido acético. O peso molecular das proteínas foi determinado a partir da migração eletroforética do padrão que incluiu as seguintes proteínas: miosina (210kDa), foforilase B (110kDa), BSA (80 kDa), ovalbumina (47 kDa), anidrase carbônica (32 kDa), inibidor de tripsina (25 kDa) e lisozima (16,5 kDa).

Resultados

O perfil da atividade usando BApNA como substrato mostrou três picos nos pH 4, pH 5 e pH 6 sendo a hidrólise máxima obtida no pH 5 (Fig. 1). Para a hidrólise de SAAPFpNA houve atividade nos pHs 6 e 7 sendo maior no pH 7, o mesmo ocorreu para o substrato SAAPLpNA entretanto, a atividade deste último alcançou níveis menores quando comparado com os outros substratos (Fig. 1). A atividade de enzimas diante do substrato BApNA foi quase totalmente inibida por E-64, TLCK e TPCK alcançando níveis de aproximadamente 100% e levemente inibida por PMSF, cerca de 50% da atividade (Fig. 2) enquanto a atividade contra o substrato SAAPFpNA foi inibida por TPCK, TLCK, EDTA, inibindo cerca de 60% da atividade e completamente inibida por PMSF alcançando 100% de inibição em todas as concentrações testadas (Fig. 3).

Em relação ao processamento da toxina Cry1Ac quando incubada com enzimas digestivas por diferentes intervalos de tempo, observou-se que a toxina aparentemente não sofreu alteração nos menores intervalos de tempo (5 – 60 minutos) (Fig. 4), começando a sofrer uma pequena degradação a partir do intervalo de 12h, que aumentou no intervalo de 24h. A toxina sofreu pouca degradação quando submetida a diferentes concentrações de enzimas digestivas (Fig. 5), onde ocorreu uma crescente, porém discreta degradação de Cry1Ac que foi proporcional ao aumento da concentração das enzimas digestivas de *P. nigrispinus*. Todos os tempos de incubação e concentrações de enzimas usados apresentaram um padrão de bandas duplo de aproximadamente 65 kDa, semelhante ao encontrado na toxina ativada.

Discussão

Os resultados das análises *in vitro* das proteínas digestivas indicam que o conteúdo digestivo de *P. nigrispinus* possui proteases cisteínicas e serino-proteases do tipo elastase e quimiotripsina que atuam em pHs variando de ácido a neutro. Além disso, a análise eletroforética indicou que as enzimas digestivas de *P. nigrispinus* não são capazes de degradar efetivamente a toxina CryAc.

O substrato BApNA pode ser hidrolisado por proteases cisteínicas, bem como, por proteases tipo tripsina, no entanto, levando em conta que o pico de atividade ocorreu em pH ácido (pH 5), podemos inferir que toda ou a maior parte dessa atividade é devido a presença de proteases cisteínicas no trato digestivo de *P. nigrispinus*. Reforçando esta conclusão, houve inibição significativa na hidrólise deste substrato por E-64 que é um inibidor deste grupo de enzimas. Esses resultados concordam com trabalhos anteriores onde proteases-cisteínicas são as enzimas digestivas predominantes no intestino médio de hemípteros (Terra & Ferreira 1994). Segundo Nation (2001) proteases cisteínicas possuem pH ótimo ligeiramente ácido. Bell *et al.*

(2005) estudando atividade proteolítica no intestino de *P. maculiventris* também verificou que as principais enzimas digestivas neste inseto são as proteases cisteínicas.

Apesar de BApNA também sofrer hidrólise pela ação de proteases tipo tripsina e ter ocorrido inibição por TLCK, não podemos confirmar a presença desta enzima no tubo digestivo de *P. nigrispinus*, pois, Novillo *et al.* (1997) estudando as enzimas digestivas do coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) mostraram que proteases cisteínicas podem ser inibidas por TLCK.

A atividade de SAAPFpNA sugere a presença de protease tipo quimiotripsina, com pico em pH neutro (pH 7); a total inibição da hidrólise desse substrato por PMSF e efetiva inibição por TPCK, corroboram com essa conclusão. Diante desses dados, proteases do tipo quimiotripsina parecem ser enzimas importantes para a digestão em *P. nigrispinus*. A hidrólise de SAAPLpNA aponta a presença de elastase no intestino de *P. nigrispinus*, com melhor atividade nos pHs 6 e 7. Boyd Jr. *et al.* (2002) estudando *Deraeocoris nebulosus* (Uhler) (Hem.: Miridae) também encontrou baixos níveis de elastase na região anterior do intestino médio deste percevejo.

Em relação à interação das enzimas de *P. nigrispinus* com toxina Cry1Ac ativada, observamos que não houve degradação total da toxina nos tratamentos testados. Torres *et al.* (2006a) avaliando a ingestão da toxina Cry1Ac pelo predador *Geocoris punctipes* (Say) (Hem.: Geocoridae) mostraram que este inseto é capaz de adquirir a toxina diluída em água; estes mesmos autores revelaram também que a toxina é excretada nas fezes do inseto com pico de excreção entre os intervalos de 12-24h, e após 72h nenhuma toxina foi detectada no corpo dos insetos testados. Em 12 horas de incubação com enzimas digestivas de *P. nigrispinus* observou-se pouca degradação da toxina. Desta forma, os achados sugerem que as enzimas do tubo digestivo de *P. nigrispinus* não degradam a toxina Cry1Ac rapidamente e que a excreção em heterópteros auxilia na passagem da toxina de forma incólume pelo trato digestivo do predador.

Porém é importante salientar que em hemípteros predadores o processo de digestão começa antes da ingestão da presa pela ação das enzimas salivares (Cohen 1995) e continua no intestino pela ação de enzimas intestinais (Terra & Ferreira 1994), assim pode haver diferenças no processamento proteolítico da toxina *in vitro* e *in vivo*. O efeito das enzimas salivares sobre a toxina não foram avaliados neste estudo, no entanto, existe a possibilidade de que a atividade proteolítica das glândulas salivares degradem Cry1Ac. No entanto este estudo fornece algumas evidências que rejeitam a hipótese de que o predador *P. nigrispinus* tenha capacidade de degradar totalmente a toxina Cry1Ac embora, conclusões definitivas ainda não tenham sido obtidas. Apesar de Brandt *et al.* (2004) sugerirem que a toxina seja na sua maioria excretada, outros estudos são necessários para elucidar de fato qual é a participação das enzimas salivares na degradação de Cry1Ac ou se esta toxina atravessa o trato digestivo de *P. nigrispinus* e é eliminada intacta nas fezes.

Agradecimentos

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor, possibilitando a realização deste trabalho.

Literatura Citada

- Andow, D.A. & A. Hilbeck. 2004.** Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *BioScience* 54: 637-649.
- Bell, H.A., R.E. Down, E.C. Fitches, J.P. Edwards & A. M.R. Gatehouse. 2003.** Impact of genetically modified potato expressing plant-derived insect resistance genes on the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 13: 729-741.

- Bell, H.A., R.E. Down, J.P. Edwards, J.A Gatehouse, & A. M.R. Gatehouse. 2005.** Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae), effect of proteinase inhibitors. *Eur. J. Entomol.* 102: 139-145.
- Brandt, S.L., T.A. Coudron, J. Habib, G.R. Brown, O.M. Ilagan, R.M. Wagner, M.K. Wright, E.A. Backus & J.E. Huesing. 2004.** Interaction of two *Bacillus thuringiensis* with the digestive system of *Lygus hesperus*. *Curr. Microbiol.* 48: 1-9.
- Bravo, A., S.S. Gill, M. Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Cohen, A.C. 1995.** Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 85-103.
- Coll, M. 1998.** Living and feeding on plants in predatory Heteroptera, p. 89-129. In M. Coll & J.R. Ruberson (eds.), *Predatory Heteroptera: their ecology and use in biological control.* Lanham, Entomological Society of America, 233p.
- De Clercq, P. 2000.** Predaceous stinkbugs (Pentatomidae: Asopinae), p. 737–789. In C.W. Schaefer & A.R. Panizzi (eds.), *Heteroptera of economic importance.* Boca Raton, CRC Press, 828p.
- Fontes, E.L., C.S.S. Pires, E.R. Sujii & A.R. Panizzi. 2002** The Environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotrop. Entomol.* 31: 497-513.
- Gómez, I., L. Pardo-López, C. Muñoz-Garay, L.E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M. Soberón, A. Bravo. 2007.** Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28: 169-173.
- Hofte, H., & H. R. Whitely, 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242–255.

- Knowles, B.H. 1994.** Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24: 275-308.
- Laemmli, K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Nation, J.L. 2001.** Digestion, p.27-63. In *Insect physiology and biochemistry*. Boca Raton, CRC Press, 485p.
- Novillo, C., P. Castañera & F. Ortego. 1997.** Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 36: 181-201.
- O'Callaghan, M., T.R. Glare, E.P. J. Burgess, & L.A. Malone. 2005.** Effects of plant genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 271-292.
- Sanvido, O., J. Romeis & F. Bigler. 2007.** Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. *Adv. Bioch. Eng. Biotechnol.* 107: 235-278.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-86.
- Stoner, A., A.M. Metcalfe & R.E. Weers. 1974.** Plant feeding by a predaceous insect, *Podisus acutissimus*. *Environ. Entomol.* 3: 187-189.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109: 1-62.
- Torres, J.B., J.R. Ruberson & M.J. Adang. 2006a.** Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agric. For. Entomol.* 8: 191-202.

- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006b.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in Eucalyptus in Brazil. CAB Reviews: Persp. Agric. Vet. Sci. 15: 1-16.
- Torres, J.B., E.M. Barros, R.R. Coelho & Pimentel, R.M.M. 2010.** Zoophytophagous pentatomids feeding on plant and implications for biological control. Arthrop. Pl. Inter. 4: 219-227.
- Valicente, F.H. & R.J. O'Neil. 1995.** Effect of host plants and feeding regimes on selected life history characteristics of *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). Biol. Control 5: 449-461.
- Zanuncio JC, R.N.C Guedes, H.N. Oliveira & T.V. Zanuncio. 2002.** Uma década de estudos com percevejos predadores: conquistas e desafios, p. 495-505. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Correa-Ferreira, J.M.S. Bento (eds), Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 609p.

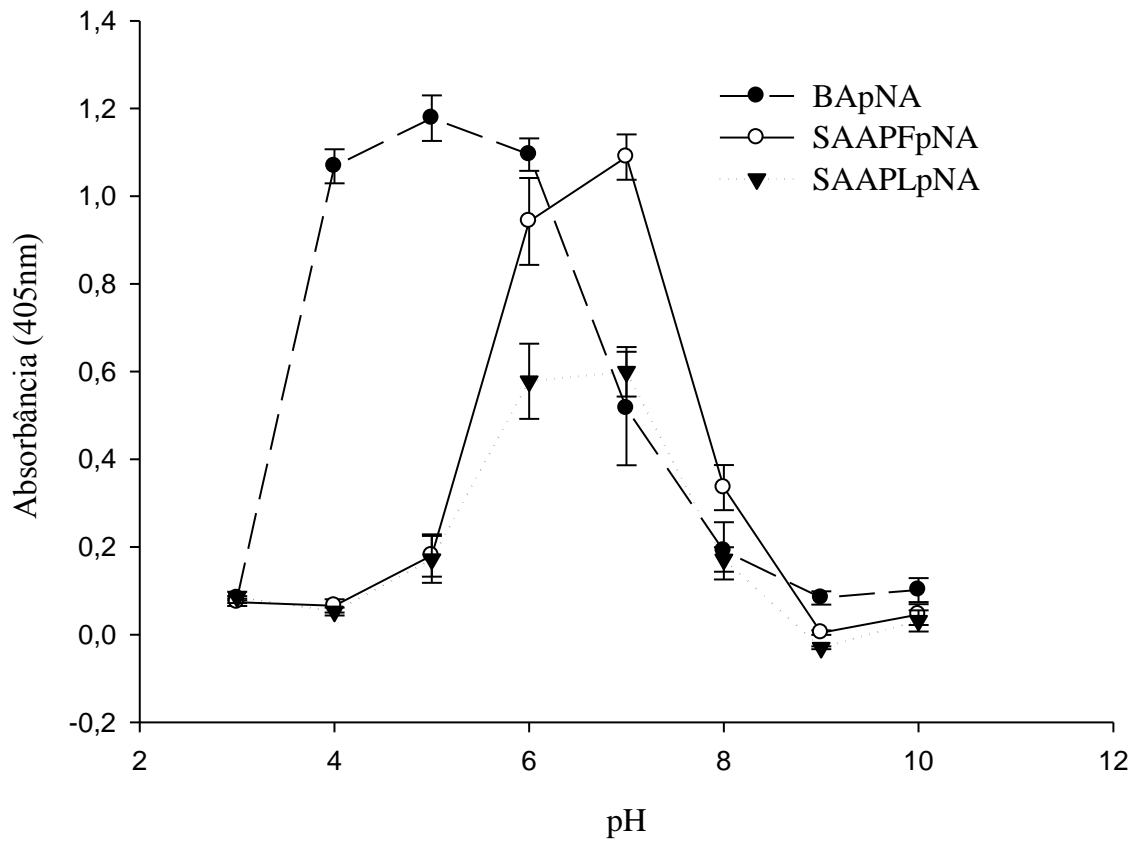


Figura 1. Atividade de proteases do intestino de adultos de *Podisus nigrispinus* usando BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA, em tampões de pH crescente. Os pontos representam a média da absorbância a 405nm de três replicatas (Média \pm EP).

BApNA

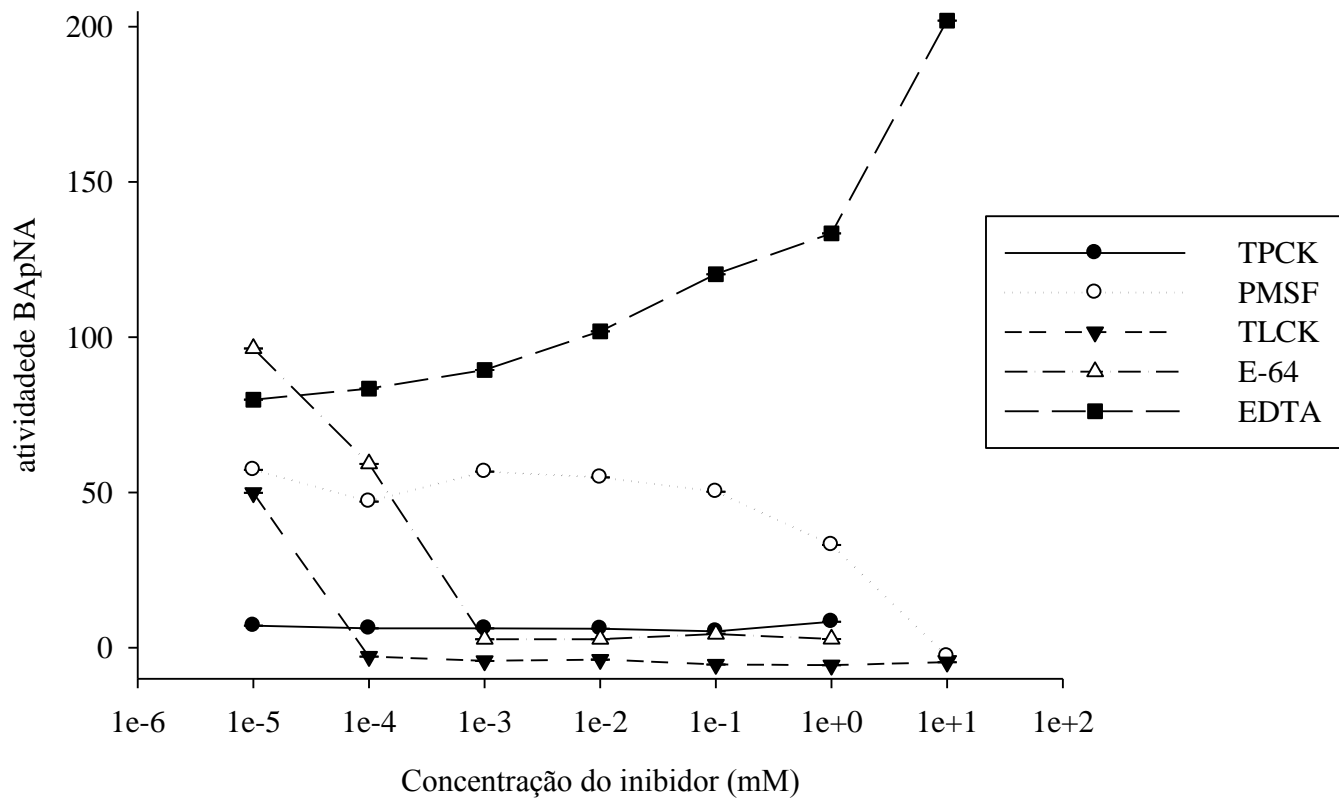


Figura 2. Efeito de inibidores de proteases sobre a hidrólise de BApNA pelas enzimas do tubo digestivo de *Podisus nigrispinus*.

SAAPFpNA

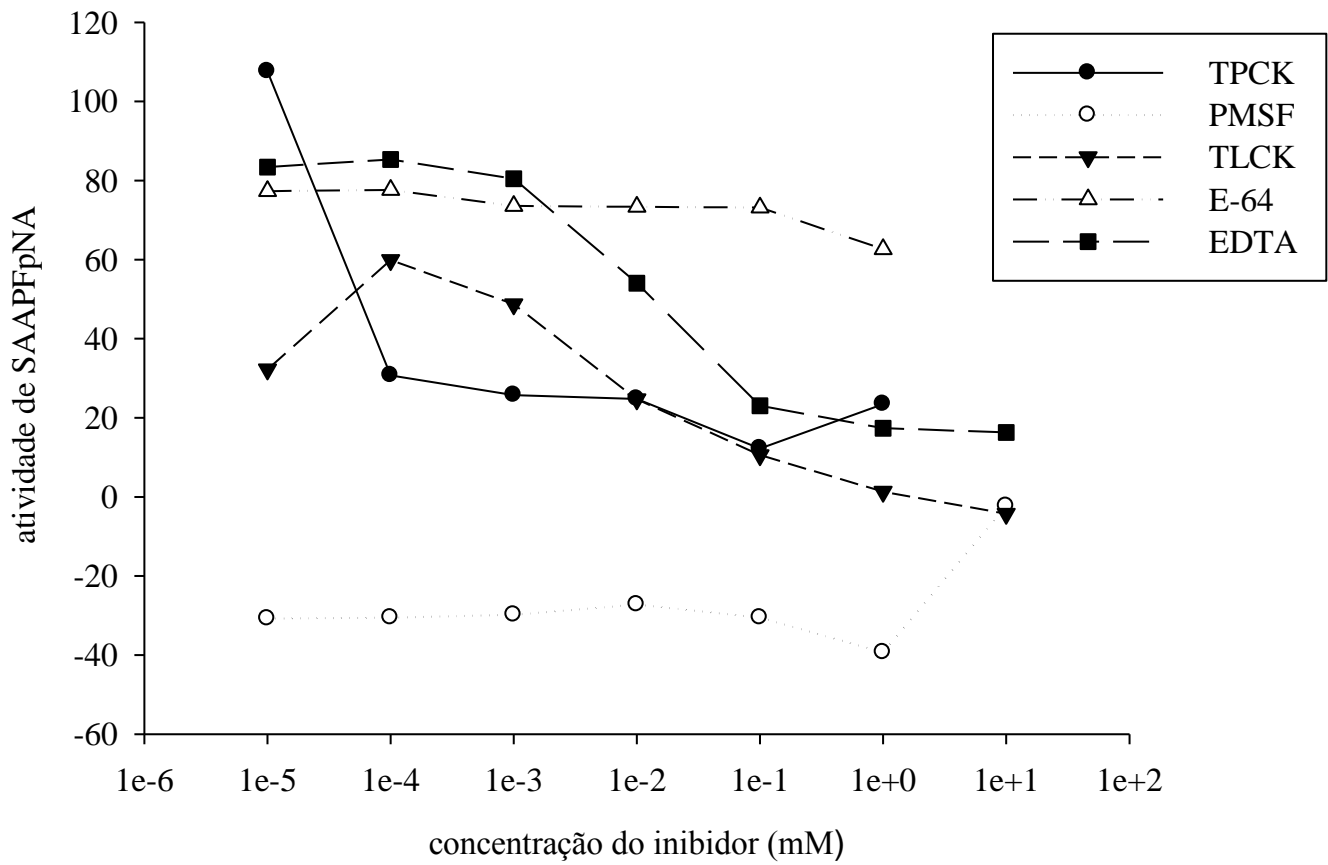


Figura 3. Efeito de inibidores de proteases sobre a hidrólise de SAAPFpNA pelas enzimas do tubo digestivo de *Podisus nigrispinus*.

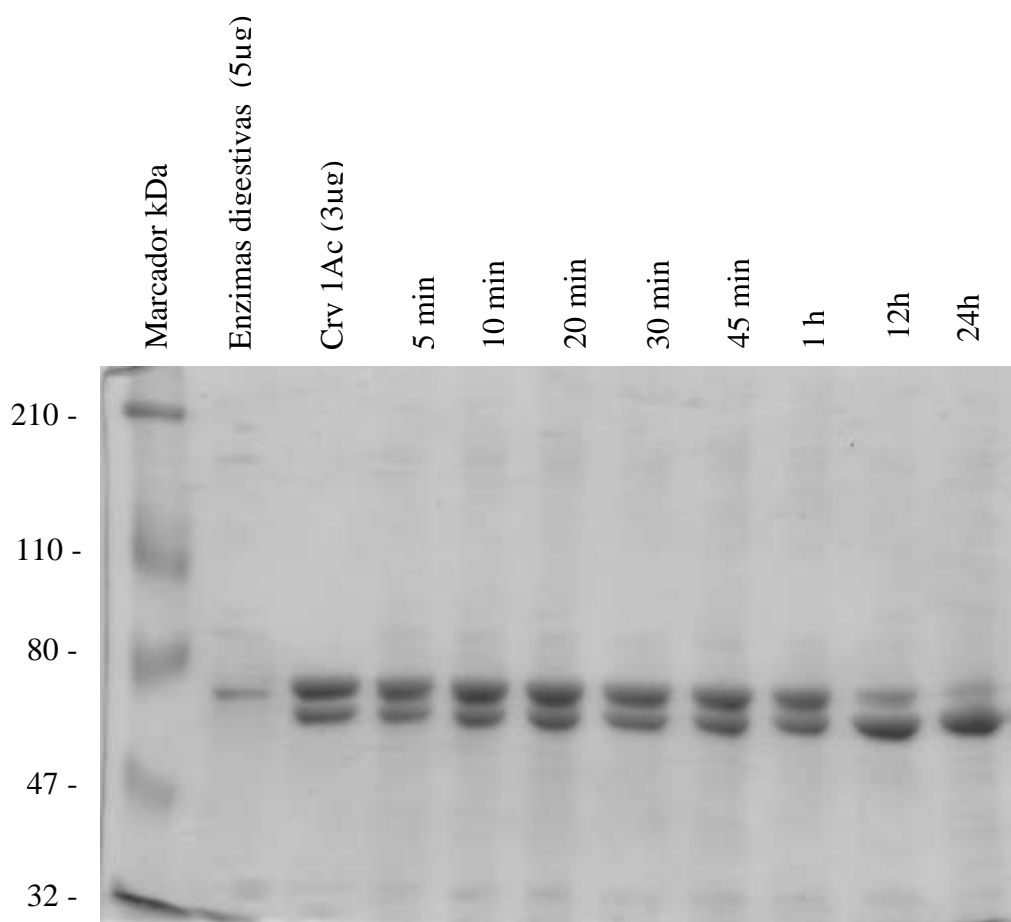


Figura 4. Perfil eletroforético da ação das enzimas digestivas sobre Cry1Ac após diferentes tempos de incubação.

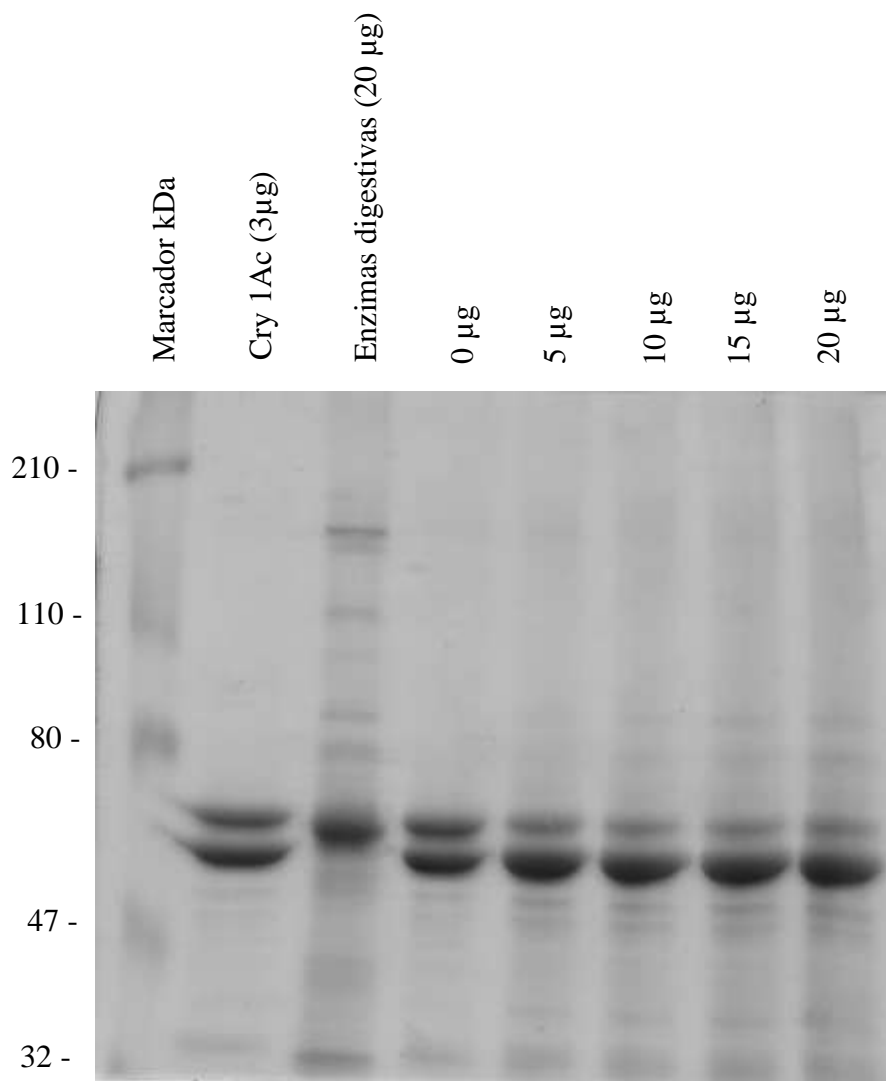


Figura 5. Perfil eletroforético da ação das enzimas digestivas sobre Cry1Ac após 12h de incubação com diferentes concentrações de enzimas digestivas.