**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de
expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda***

Thais Paula de Souza

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

Thais Paula de Souza
Bacharel em Ciências Biológicas

**Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de
proteinase de *Spodoptera frugiperda***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Thais Paula de

Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda* / Thais Paula de Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

85 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Inibidor de proteinase de soja 2. *Spodoptera frugiperda* 3. *Shotgun* 4. Epigenética
5. Mecanismo de retroalimentação I. Título

CDD 633.34
S729e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Com amor
aos meus maiores incentivadores
Aldo, Zuleida, Tiago e Rodnei
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser presença constante na minha vida;

Ao professor Dr. Marcio de Castro Silva Filho pela oportunidade e orientação;

Ao professor Dr. Daniel Scherer Moura, pela inestimável colaboração na execução deste trabalho;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e financiamento do projeto;

Aos meus amados pais (Aldo e Zuleida) e irmão (Tiago) pelo apoio incondicional;

Ao meu Amor e companheiro Rodnei (meu Love), por fazer os meus dias mais felizes;

A família de Piracicaba que me acolheu com tanto amor Arthur, Adair, Raquel, Rebeca, Débora e Roberto;

Ao professor Dr. José Roberto Postali Parra, por disponibilizar os insetos e a estrutura do Laboratório de Biologia de Insetos para a condução dos experimentos;

À técnica do Laboratório de Biologia de Insetos Neide Graciano Zério, pela ajuda na criação dos insetos;

A Renata O. Dias, pela amizade e por nossas inúmeras colaborações;

Ao Rafael Colombi, funcionário do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas;

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Wiliane Garcia, Elaine Castelhana, Wellington Campos, Lucas Lopes, Marcos, Marcelo Brandão, Horácio Montenegro, Aline Borges, Poliene Costa, Maria Lígia Macedo e aos que passaram por lá Ricardo Rodrigues, Ligia Arruda, Marcela Joaquim e Christine Stock;

Aos amigos amados de Piracicaba Fabiana Mingossi, Larissa Spoladore, Flávia Franco, Wellington Nascimento e Renata Villegas;

Aos amigos que mesmo longe sempre se fizeram presentes Joyce, Luíza, Renata, Vívian, Larissa, Alexa e Luciene;

A minha família, que mesmo sem entender minha ausência, esteve sempre na torcida;

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

“Para tudo há um tempo certo;
Há um tempo certo para cada propósito
debaixo do céu:
... Tempo de plantar e tempo de colher,
...Tempo de chorar e tempo de sorrir,
...Tempo de prantear e tempo de dançar,
...Tempo de procurar e tempo de desistir,
...Tempo de calar e tempo de falar,
...Tempo de lutar e tempo de viver em paz.”

Bíblia sagrada. Eclisiaste 3:1-8

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELA	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	23
2.2 Inibidores de peptidases de plantas	24
2.3 Inibidores de peptidases de plantas identificados para o controle de insetos praga.....	25
2.4 Inibidores de endopeptidases de soja	26
2.5 Serina endopeptidases.....	27
2.6 Serina endopeptidases de insetos	28
2.7 Adaptação dos insetos aos inibidores de peptidases de plantas	29
2.9 Plantas transgênicas com inibidores de peptidases	32
2.10 Adaptação de <i>S. frugiperda</i> aos inibidores de endopeptidases	33
2.11 Mecanismo epigenético em insetos.....	34
2.12 Transcriptomas de insetos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Extração dos inibidores de endopeptidases de soja.....	37
3.2 Estimativa da concentração dos inibidores.....	37
3.3 Experimentos realizados para averiguar o mecanismo de resposta dos genes de tripsinas e quimotripsinas a exposição aguda e crônica aos inibidores de peptidases de soja	38
3.4 Experimentos para investigação do mecanismo de retroalimentação dos genes de tripsinas e quimotripsinas.....	40
3.5 Extração de RNA e obtenção de cDNA.....	42
3.6 PCR em tempo real.....	42
3.7 Transcriptoma de <i>S. frugiperda</i>	45
3.8 Alinhamento de sequências e árvore filogenética	45
3.9 Experimento para avaliação da existência de controle epigenético	46
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Transcriptoma	49

4.2 Perfil transcricional das serina endopeptidases de <i>S. frugiperda</i> submetidas à ingestão aguda dos inibidores de endopeptidases de soja	51
4.3 Relação entre filogenia e expressão relativa	54
4.4 Comparação da expressão relativa de lagartas criadas com ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja e transferidas para dieta controle	56
4.5 Perfil transcricional das serina endopeptidases de <i>S. frugiperda</i> submetidas à ingestão aguda dos inibidores de endopeptidases de soja	58
4.6 Mecanismo epigenético	59
5 DISCUSSÃO	65
5.1 Sensibilidade das serina endopeptidases estudadas aos inibidores de endopeptidases de soja.....	65
5.2 Efeito da ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja as tripsinas e quimotripsinas do intestino de <i>S. frugiperda</i>	66
5.3 Comparação da expressão relativa de lagartas criadas com ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja e transferidas para dieta controle	68
5.4 Mecanismo temporalmente regulado na expressão dos genes.....	67
5.5 Controle epigenético dos genes de tripsinas e quimotripsinas.....	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda*

Dentre as substâncias químicas secretadas pelas plantas, contra os insetos herbívoros, os inibidores de peptidases são de grande interesse. A atenção dada a esses inibidores deve-se ao fato, de eles serem uma boa alternativa no controle de insetos praga, uma vez que não causam danos ao meio ambiente. Contudo, muitas espécies de insetos são capazes de escapar dos efeitos negativos dos inibidores de peptidases das plantas, via diferentes mecanismos adaptativos. Devido a esse fato, é importante compreender os mecanismos desenvolvidos pelos insetos para burlar os efeitos dos inibidores de peptidases das plantas. Diante desse panorama, este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo adaptativo das serina endopeptidases de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de endopeptidases de soja. Foram realizadas análises do transcriptoma dos intestinos das lagartas mantidas em exposição crônica ao inibidor. Para averiguar os efeitos causados devido à exposição crônica ao inibidor, foram realizadas comparações da expressão relativa, dos genes de tripsinas e quimotripsinas, de intestinos de lagartas de sexto instar. Contudo, para entender o efeito da exposição aguda ao inibidor, lagartas de *S. frugiperda* foram criadas em dieta artificial controle até o primeiro dia do sexto instar, após esse período elas foram transferidas para dieta artificial acrescida com 0,5 % dos inibidores de endopeptidases de soja, durante 48 horas. Para verificar a ocorrência de um possível controle epigenético na expressão dos genes, as lagartas foram conduzidas até a fase adulta e os adultos, de cada tratamento, foram acasalados entre si, constituindo uma segunda geração. Dados de expressão relativa foram obtidos, de indivíduos da primeira e segunda geração, e foram então comparados. Foram identificados 14 possíveis genes de quimotripsinas e nove possíveis genes de tripsinas. Os genes de tripsina foram divididos em dois grupos distintos em relação a sua sensibilidade aos inibidores de endopeptidases de soja e expressão relativa. Houve uma resposta diferenciada na ativação dos genes de serina endopeptidases de *S. frugiperda*, a qual dividiu os genes em dois grupos, os responsivos e os não responsivos ao inibidor. A exposição aguda ao inibidor ativou um pequeno grupo de genes, enquanto que a exposição crônica promoveu uma maior amplitude de expressão gênica, sugerindo mecanismos temporalmente regulados. Por último, evidências indicam, pela primeira vez, a possível ocorrência de um mecanismo epigenético, na resposta das enzimas digestivas aos inibidores de serina endopeptidases de soja.

Palavras-chave: Inibidor de endopeptidase de soja; *Spodoptera frugiperda*; Shotgun; Epigenética; Mecanismo de retroalimentação

ABSTRACT

Effect of soybean peptidase inhibitor in pattern endopeptidase expression of *Spodoptera frugiperda*

Among the chemicals secreted by plants against insect herbivores, peptidase inhibitors (PIs) are of great interest. The attention given to PIs is due to the fact that they are a good alternative to control insect pests since they do not cause damage to human health and the environment. However, many species of insects are able to escape the negative effects of PIs plants via different adaptive mechanisms. Because of this, it is important to understand the mechanisms developed by insects to circumvent the effects of PIs plants. Against this background, this research aimed to study the adaptive mechanism of serine endopeptidases *Spodoptera frugiperda* to soybean endopeptidase inhibitors. For this purpose, larvae of *S. frugiperda* were reared on artificial diet and control artificial diet plus 0.5% of endopeptidase inhibitors of soybean. We conducted a transcriptome midgut of worms maintained in chronic ingestion of the inhibitor. The relative expression of the genes, trypsin and chymotrypsin, was also compared the midgut of sixth instar larvae kept in these diets. In another experiment, the larvae were conducted to moth, then the treatments were mated forming a second generation. Relative expression data were obtained for individuals of the first and second generation, and then compared. Identified 14 genes with potential of chymotrypsin and 9 trypsin like genes. The trypsin gene were divided into two groups for both their sensitivity to PI soybean endopeptidase, and for their relative expression pattern. There was a differentiated response on the genes activation of *S. frugiperda* serina endopeptidases. The genes were clustered in 2 groups, the responsive ones and the non responsive to the inhibitor. The acute exposition to the inhibitor activated a small group of genes and the chronic exposition affected several genes, indicating the existence of temporal regulated mechanism. Besides, there is a possible occurrence of an epigenetic mechanism, which is related to the digestive serina endopeptidases inhibitors of soybean.

Keywords: Soybean peptidase inhibitor; *Spodoptera frugiperda*; Shotgun, Epigenetics; Feedback mechanism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas nos experimentos de exposição aguda e crônica aos inibidores de endopeptidases de soja	39
Figura 2 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas no mecanismo de retroalimentação.....	40
Figura 3 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas no controle epigenético	47
Figura 4 - Alinhamento das sequências de tripsinas de <i>S. frugiperda</i> a tripsina bovina. Asteriscos: resíduos envolvidos na tríade catalítica; setas: posições dos aminoácidos supostamente responsáveis pela separação das tripsinas em dois grupos, segundo Lopes et al. (2004). SfTry1...SfTry12: genes de tripsinas numerados em ordem crescente.....	49
Figura 5 - Alinhamento das sequências de quimotripsinas de <i>S. frugiperda</i> a quimotripsina bovina. Asteriscos: resíduos envolvidos na tríade catalítica. SfChy2...SfChy23: genes de quimotripsinas numerados em ordem crescente	50
Figura 6 - (A e B) Expressão relativa dos genes de tripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). (C) Porcentagem da participação dos genes de tripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta controle. (D) Porcentagem da participação dos genes de tripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja.	52
Figura 7 - (A) Expressão relativa dos genes de quimotripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle, comparadas com lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). (B) Porcentagem da participação dos genes de quimotripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta controle. (C) Porcentagem da participação dos genes de quimotripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. Genes com menos de 1 % de participação não foram colocados nos gráficos B e C.....	53

Figura 8 - Árvore filogenética das tripsinas de *S. frugiperda* pelo método de Neighbor-Joining. Os números próximos aos nós representam os valores resultantes da análise de bootstrap. SfTry1...SfTry12: genes de tripsinas numerados em ordem crescente.....54

Figura 9- Árvore filogenética das quimotripsinas de *S. frugiperda* pelo método de Neighbor-Joining. Os números próximos aos nós representam os valores resultantes da análise de bootstrap. SfChy2...SfChy23: genes de quimotripsinas numerados em ordem crescente.....55

Figura 10 - Análise da expressão relativa dos genes de tripsinas, de lagartas criadas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja até o terceiro instar, as quais foram transferidas para dieta controle até o sexto instar (barras tracejadas), comparadas com lagartas mantidas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja desde a eclosão das larvas (barras não tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos, ao lado do nome dos genes, indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns resultados não significativos ($p \leq 0,05$).57

Figura 11 - Análise da expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas criadas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja até o terceiro instar, as quais foram transferidas para dieta controle até o sexto instar (barras tracejadas), comparadas com lagartas mantidas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja desde a eclosão das larvas (barras não tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos, ao lado do nome dos genes, indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns resultados não significativos ($p \leq 0,05$).57

Figura 12 - Expressão relativa dos genes de tripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas, durante 48 horas, em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$).58

Figura 13 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas, durante 48 horas, em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$).59

Figura 14 - Comparação da expressão relativa dos genes de tripsinas, dos experimentos realizados na primeira (barras não tracejadas) e segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.....60

Figura 15 - Comparação da expressão relativa dos genes de quimotripsinas, dos experimentos realizados na primeira (barras não tracejadas) e segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.60

Figura 16 - Expressão relativa dos genes de tripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5% inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram transferidas para dieta sem inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.61

Figura 17- Expressão relativa dos genes de quimotripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5 % inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram transferidas para dieta sem inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio três experimentos independentes. ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). Tracejado em preto indica um gene com possível controle epigenético62

Figura 18 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5% inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram mantidas em dieta com 0,5% de inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). Tracejado em preto indica um possível gene com controle epigenético63

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Composição da dieta artificial para criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> (MIHSFELDT; PARRA,1999)	41
Tabela 2 - Primers de tripsinas e quimotripsinas desenhados a partir do transcriptoma de <i>S. frugiperda</i>	44

1 INTRODUÇÃO

Insetos polívoros causam perdas na produção de várias culturas importantes ao redor do mundo. O controle de insetos praga vem ao longo do tempo sendo realizado pelo uso indiscriminado de inseticidas, causando danos a saúde humana e ao meio ambiente. Cientistas vêm buscando novas formas de controle, dentre elas destaca-se o uso de inibidores de peptidases de plantas (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; BRIOSCHI et al., 2007; MACEDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, os insetos desenvolveram várias estratégias para sobrepor os efeitos dos inibidores de peptidases produzidos pelas plantas. Dentre elas pode-se destacar o aumento na atividade das enzimas digestivas (PAULILO et al., 2001), a síntese de endopeptidases insensíveis (JONGSMA et al., 1995), a expressão de endopeptidases que mudam a especificidade pelo substrato (WU et al., 1997), endopeptidases que hidrolisam os inibidores (GIRI et al., 1998) e um rápido aumento na expressão dos genes daquelas já existentes (BRIOSCHI et al., 2007). Os intestinos dos insetos herbívoros além de envolvidos com a digestão participam de vários processos tais como desintoxicação e interação com o hospedeiro (SINHA et al., 2011). Conhecer a composição das enzimas digestivas dos insetos herbívoros, assim como os mecanismos de adaptação a presença de inibidores de peptidases na dieta é de suma importância. Assim, será possível identificar e até mesmo modificar, os inibidores de peptidases de plantas para maior especificidade e efetividade no controle de pragas. Esses inibidores de peptidases naturais ou modificados podem ser usados, por exemplo, na obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos praga (DUNSE et al., 2010; ABDEEN et al., 2005).

Vários estudos mostram que após o contato com os inibidores de endopeptidases, os insetos apresentam um aumento significativo da expressão de genes que codificam endopeptidases (BOWN et al., 1997; BOWN et al., 2004; BRIOSCHI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013). Sendo assim, duas hipóteses foram apresentadas visando explicar esta adaptação: (i) um mecanismo do tipo *shotgun* que seria um aumento geral na expressão dos genes que codificam as endopeptidases (BRIOSCHI et al., 2007); e (ii) um mecanismo do tipo retroalimentação (*feedback*) que seria um aumento na expressão dos genes de endopeptidases seguido da diminuição na expressão dos genes cujos produtos são sensíveis à ação dos inibidores de peptidases (BOWN et al., 2004). Associado ao

mecanismo *shotgun*, Brioschi et al. (2007) observaram que quando lagartas de *Spodoptera frugiperda* são expostas aos inibidores de endopeptidase de soja, a expressão de todo o conjunto de endopeptidases permanece alto até 48 horas após a exposição a esses inibidores.

Uma pergunta relevante é se os mecanismos adaptativos podem envolver um controle epigenético, ou seja, se insetos expostos à presença dos inibidores manteriam elevada a expressão dos genes que codificam as endopeptidases nas gerações seguintes, mesmo na ausência dos inibidores de endopeptidases. Os insetos, por possuírem genomas pequenos são considerados modelos inovadores para estudos funcionais da metilação do DNA. A presença da metilação tem sido abordada em poucos insetos da ordem dos Lepidoptera. Só há estudos com *Mamestra brassicae* (MANDRIOLI; VOLPI, 2003) e *Bombyx mori* (PATEL; GOPINATHAN, 1987; ZEMACH et al., 2010; XIANG et al., 2010).

Neste trabalho buscou-se compreender como as serina endopeptidases (tripsinas e quimotripsinas) presentes no intestino de *S. frugiperda*, respondem ao extrato semipurificado de inibidores de endopeptidases de soja. Para tal propósito adotou-se uma abordagem transcriptômica que resultou na identificação de nove genes de tripsinas e 14 genes de quimotripsinas. A análise da expressão gênica, por PCR em tempo real, com exposição aguda e crônica ao inibidor, revelou que *S. frugiperda*, provavelmente, está utilizando uma estratégia de resposta temporal aos inibidores de serina endopeptidases de soja. Os genes de tripsinas e quimotripsinas foram divididos em dois grupos, sendo um responsivo ao inibidor e outro grupo não responsivo. Além disso, foi investigada a possível ocorrência de um controle epigenético no mecanismo de regulação dos genes de tripsinas e quimotripsinas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) pertence à ordem Lepidoptera e a família Noctuidae. Tal inseto pode apresentar coloração de parda a esverdeada, dependendo do estágio em que se encontra, além de ser muito voraz. Na fase adulta, as mariposas medem entre 35 a 40 mm de envergadura apresentando um ciclo de vida de aproximadamente 12 dias. Geralmente a postura é feita na parte superior das folhas, em grupos de 50 a 300 ovos, totalizando 1500 a 2000 ovos por fêmea. Após três dias, eclodem as larvas e as lagartas jovens começam o dano raspando as folhas mais novas. A duração do período larval varia entre 12 a 30 dias, sendo que ao final deste período as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas, de coloração avermelhada, permanecendo assim por oito dias no verão e vinte e cinco dias no inverno. Após o rompimento das pupas, emergem as mariposas (CRUZ et al., 1995; GALLO et al., 2002; CRUZ; MONTEIRO, 2004).

Também conhecida como lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, *S. frugiperda* é um inseto polífago que pode ser encontrado nas Américas e em algumas ilhas a oeste da Índia. No Brasil, devido à alimentação diversificada e disponível o ano todo, causa danos a várias culturas como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, repolho, espinafre, abóbora, couve, entre outras (CRUZ; VIANNA; WAQUIL, 1999; MONTESBRAVO, 2001).

O controle desse inseto praga é realizado principalmente pelo uso de produtos químicos. No entanto, o uso indiscriminado de defensivos promove a contaminação do ambiente e causa desequilíbrios biológicos. Além disso, este método apresenta limitações, uma vez que a lagarta pode permanecer no interior da planta, reduzindo sua exposição ao inseticida. Tendo isso em vista, novas alternativas são propostas para o manejo dessa praga, dentre elas o uso de inibidores de peptidases de plantas.

2.2 Inibidores de peptidases de plantas

Para se defenderem do ataque de insetos e de patógenos, as plantas produzem um arsenal de armas químicas, dentre as quais destacam-se os inibidores de peptidases (JONGSMA; BOLTER, 1997). Esses inibidores funcionam como pseudo-substratos específicos (das peptidases digestivas dos insetos), formando um complexo estável que limita a reação de proteólise (TIFFIN; GAUT, 2001). Essas substâncias, quando ingeridas por insetos herbívoros são observadas agindo diretamente nas peptidases desses organismos aumentando a atividade inibitória em seus intestinos (RAKWAL; AGRAWAL; JWA, 2001).

Existem diversos tipos de inibidores de peptidases de plantas descritos atualmente, abrangendo moléculas que atuam sobre peptidases com diferentes especificidades e alguns são bifuncionais (CHRISTELLER et al., 1998; ROY; GUPTA, 2000). As análises de interação de diferentes tipos de inibidores de peptidases com peptidases de insetos mostram diferenças na capacidade inibitória dessas moléculas, com alguns isoinibidores de plantas possuindo alta atividade inibitória contra esses organismos (TIFFIN; GAUT, 2001). Assim como, algumas plantas apresentam síntese de inibidores de peptidases resistentes a proteólise e aos diferentes pHs intestinais de diferentes insetos (CHRISTELLER et al., 1998).

A via de sinalização que leva a indução desses inibidores se inicia com a liberação de indutores extracelulares após a injúria. Sua produção é regulada por uma via de transdução de sinal, a qual é iniciada como uma resposta ao ferimento (KOIWA et al., 1997). Verificou-se que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema, acarretando aumento nos níveis dos inibidores de peptidases por toda a planta, portanto caracterizando esta resposta como sistêmica (JONGSMA; BOLTER, 1997). A expressão induzida dos genes, relacionados aos inibidores, ocorre pela via octadecanóide, que se inicia com a liberação do ácido linolênico das membranas do cloroplasto e finaliza com a formação do ácido jasmônico (FARMER; JOHNSON; RYAN, 1992).

2.3 Inibidores de peptidases de plantas identificados para o controle de insetos praga

Os inibidores podem ser encontrados em órgãos de armazenamento ou serem produzidos nos tecidos, após um fermento (GIRI, 1998). Sua capacidade de defesa contra os insetos foi constatada pelo clássico estudo de Green e Ryan (1972). De acordo com estes autores, há indução e acúmulo de inibidores de peptidases na parte aérea de plantas de tomate e batata, após fermento mecânico ou danos causados por insetos. Inúmeros estudos têm caracterizado extensivamente inibidores de peptidases, estes decorrentes de várias espécies de plantas (RYAN et al., 1990; BOULTER, 1993; BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; MURDOCK; SHADE, 2002; MACEDO et al., 2003, 2011; LOPES et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012). Nas plantas, esses inibidores são expressos de maneira constitutiva ou, de maneira geral, induzidos em resposta ao ataque de insetos. Atualmente, a principal ênfase está na identificação de potenciais inibidores de peptidases digestivas do inseto-alvo e na compreensão da natureza dinâmica da indução da expressão dos genes que codificam as peptidases intestinais dos insetos.

O ataque de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae) em plantas de *Nicotiana attenuata* (Solanales, Solanaceae) causa um rápido aumento e acúmulo do inibidor de tripsina (STEPPUHN; BALDWIN, 2007). Em tomate, observações de campo constataram que lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) infestavam as folhas e os frutos, mas não as flores da planta. Estudos comprovaram que há um maior nível dos inibidores de tripsinas nos tecidos das flores (DAMLE et al., 2005). Hartl et al. (2010) identificaram quatro inibidores de serina endopeptidases em *Solanum nigrum* (Solanales, Solanaceae). Neste caso, constatou-se que as diferenças entre eles correspondem à especificidade do substrato, padrões de acúmulo e diferentes efeitos sobre insetos herbívoros. Tais diferenças sugerem que os inibidores de *S. nigrum* tenham se diversificado para proteger a planta do ataque de diferentes predadores. Já Silva et al. (2012) avaliou o inibidor de tripsina (ApTI), o qual foi purificado de sementes de *Adenanthera pavonina* (Fabales, Fabaceae). Os efeitos desta substância foram testados em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae), sendo observada alteração no peso larval e sobrevivência, evidenciando que esta proteína pode apresentar grande potencial tóxico.

Em *Cajanus cajan* (Fabales, Fabaceae) (RgPI), também foram observados efeitos relacionados ao inibidor de peptidase. A sua ação inseticida foi comprovada pela redução do crescimento e do desenvolvimento das larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) (PRASAD et al., 2010). Outro grupo de pesquisadores relatou um inibidor de endopeptidases em *C. cajan*, o qual apresenta efeito tanto para as tripsinas como para as quimotripsinas do intestino de *H. armigera* (LOMATE; HIVRALE, 2012). A vantagem desse tipo de inibidor consiste na sua atuação sobre duas peptidases diferentes.

Com o intuito de avaliar a especificidade na indução dos inibidores por diferentes espécies de insetos, Chung e Felton (2011) colocaram plantas de tomateiro sob ataque de dois herbívoros especialistas, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) e *Manduca sexta*. Tais insetos provocaram respostas quantitativas distintas na planta, sendo que apesar dos genes de defesa induzidos serem os mesmos, houve um maior acúmulo de transcritos quando o dano era decorrente das larvas de *M. sexta*. O mesmo inseto provocou uma maior atividade do inibidor de tripsina em tomate. Os autores propõem que o mecanismo de defesa destas plantas, é uma resposta específica as secreções orais dos diferentes insetos.

Em um estudo recente, Bode, Halitschke e Kessler (2013) elucidaram como *Solidago altíssima* (Asterales, Asteraceae) responde ao ataque de diferentes herbívoros. Eles verificaram que tanto os inibidores de serina endopeptidases quanto os inibidores de cisteína peptidases são produzidos em resposta aos danos causados por Lepidoptera e Coleoptera herbívoros. Desta maneira, a resposta aos inibidores não é específica para o organismo que causa a injúria, porém os diferentes componentes de defesa podem afetar especificamente diferentes espécies herbívoras.

2.4 Inibidores de endopeptidases de soja

Na soja, os inibidores são constituídos pelo inibidor de tripsina Kunitz (SBTI) (ODANI; IKENAKA, 1971), com massa molecular em torno de 21 kDa, e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk (BBI) (BOWMAN, 1946; BIRK; GERTLER; KHALEF, 1963), o qual tem massa molecular de aproximadamente 8 kDa. A maior parte da inibição da atividade trípica de grãos de soja, cerca de 80%, é causada pela ação do SBTI. Tais antinutrientes apresentam a especificidade de inibir enzimas

proteolíticas, consequentemente reduzindo a digestão proteica de alimentos e proporcionando diminuição no ganho de massa e crescimento dos insetos.

2.5 Serina endopeptidases

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, peptidase é o termo geral para todas as proteínas com atividade proteolítica. Quando há a remoção de aminoácidos das extremidades N-terminal ou C-terminal elas são classificadas como exopeptidases. Já as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas internas são denominadas endopeptidases (RYAN, 1990). As endopeptidases podem ser agrupadas de acordo com o resíduo catalítico principal, o mecanismo de catálise e a estrutura tridimensional, resultando em quatro principais subclasses mecanísticas: (1) serina-endopeptidases, com um resíduo de aminoácido serina e outro histidina; (2) cisteína-endopeptidases, com uma cisteína; (3) aspártico-endopeptidase, com um grupo aspartato e (4) metalo-endopeptidase, com um íon metálico (BOULTER, 1993; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Desta forma, elas podem diferir na especificidade em relação ao substrato.

As serina endopeptidases (EC 3.4.21) apresentam, em seu sítio catalítico, a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195, sendo os resíduos numerados de acordo com a quimotripsina bovina. Elas clivam ligações peptídicas em regiões internas de cadeias polipeptídicas, com mecanismo catalítico semelhante para todas as serina endopeptidases. Neste caso, após a ligação do substrato ao sítio ativo, ocorre o ataque nucleofílico da Ser195 sobre a carbonila da ligação peptídica a ser quebrada. Forma-se então um intermediário tetraédrico ligado covalentemente à enzima. A His57 doa um próton do Nitrogênio 3, o qual é degradado em um intermediário acil-enzima e forma a nova região N-terminal do substrato. Essa região é liberada e substituída por uma molécula de água. Em seguida, a His57 forma uma ponte de hidrogênio com o Asp102 e torna-se uma base nucleofílica potencial, devido ao seu pKa alterado. O carboxilato, ainda ligado à Ser195, é atacado pela água e passa a ser o nucleófilo da reação, liberando a nova região C-terminal formada. Por fim, a enzima é reconstituída (LODISH et al., 2012).

2.6 Serina endopeptidases de insetos

No grupo das serina endopeptidases, as tripsinas (EC 3.4.21.4) e quimotripsinas (EC 3.4.21.1) têm ampla distribuição entre os insetos. Apresentam pHs ótimos alcalinos e massa molecular na faixa de 20 kDa a 35 kDa. A especificidade primária da tripsina corresponde as ligações peptídicas no lado carboxila de aminoácidos com grupos R básicos, como a arginina (Arg) e a lisina (Lys) (TERRA; FERREIRA, 1994, 2005). Em seu subsítio S1, há um resíduo ácido conservado (Asp189), o qual interage com o resíduo P1 carregado positivamente. Neste processo, os aminoácidos vizinhos à ligação a ser quebrada também são importantes. Em lepidópteros, as tripsinas ligam-se melhor as proteínas nas quais os aminoácidos, vizinhos à ligação a ser quebrada do lado carboxila da Lys/Arg, são mais hidrofóbicos. Nos demais insetos, a preferência de clivagem são as ligações de Arg ladeadas por resíduos de aminoácidos menos hidrofóbicos (LOPES et al., 2004). Os inibidores de peptidases de plantas possuem Lys margeadas por resíduos de aminoácidos hidrofílicos (RYAN, 1990). Isso pode explicar a menor inibição das tripsinas de lepidópteros por esses inibidores, uma vez que os inibidores de endopeptidases ligariam-se mal e quando ligados seriam hidrolisados rapidamente pelas tripsinas (LOPES et. al., 2004).

Já as quimotripsinas, preferencialmente, clivam ligações junto a grupos R hidrofóbicos grandes, como fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr), atuando também em ligações com resíduos apolares menores (TERRA; FERREIRA, 1994, 2005). Elas apresentam baixa atividade no intestino médio de lepidópteros e possuem um sítio estendido hidrolisando, preferencialmente, substratos peptídicos com número de resíduos igual ou superior a três (LEE; ANSTEE, 1995). Nos Noctuidae as quimotripsinas apresentam algumas peculiaridades, dentre elas o fato das cetonas sintéticas reagirem com o resíduo de His presente no sítio catalítico dessas enzimas, acarretando sua inativação. Ao contrário das demais quimotripsinas, as dos Noctuidae possuem um Trp, no lugar da Gly, que se encontra nas vizinhanças da His. O grupo radical do Trp é bem mais volumoso e, portanto, diminui a reatividade da His as cetonas. Este fato favorece a polifagia dessa família, uma vez que as quimotripsinas dos Noctuidae são mais resistentes a cetonas naturais que ocorrem em muitos vegetais (LOPES; SATO; TERRA, 2009). No entanto, há pouca informação disponível a respeito da especificidade dos subsítios das quimotripsinas

de insetos, assim como de sua atividade.

2.7 Adaptação dos insetos aos inibidores de peptidases de plantas

A ampla distribuição de proteínas de defesa nas plantas reflete a importância do processo de proteólise para os insetos fitófagos. A ingestão de inibidores de peptidases interfere diretamente na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento, desenvolvimento e reprodução destes insetos (BROADWAY, 1995; ZHU-SALZMAN et al., 2003). Um dos primeiros estudos envolvendo inibidores de peptidases em plantas, na defesa contra insetos, foi realizado por Hilder et al. (1987). Por meio de um aumento na expressão de um gene, que codifica um inibidor de endopeptidase, estes autores obtiveram um aumento da resistência do tabaco a herbivoria. Broadway (1995) complementa tal constatação, afirmando que o potencial dos inibidores de peptidases depende da compatibilidade estrutural com as peptidases do organismo, das condições fisiológicas dentro do intestino, como pH e da qualidade da alimentação .

Experimentos mostraram que dos inibidores de endopeptidases semi-purificados são eficientes quando incorporados na dieta de diferentes insetos (POMPERMAYER et al., 2001; FRANCO et al., 2003), quando expressos nas plantas transgênicas (FALCO; SILVA-FILHO, 2003; SIMÕES et al., 2008; DUNSE et al., 2010a) ou ainda em plantas onde estão naturalmente presentes em maiores concentrações (BROADWAY, 1996). Quando em concentrações adequadas, os dos inibidores de peptidases interferem no desenvolvimento e crescimento dos insetos, inibindo as enzimas digestivas e causando deficiência de aminoácidos essenciais na síntese de outras proteínas (BROADWAY, 1995; POMPERMAYER et al., 2001; FRANCO et al., 2004).

Pompermayer et al. (2001), propõem o uso de proteínas com efeitos anti-nutricionais, atuantes no metabolismo e desenvolvimento do inseto, no manejo integrado de algumas pragas. Tais autores indicam que *Diatraea saccharalis*, quando alimentada com dieta artificial contendo dos inibidores de endopeptidases de soja, tem sua taxa de crescimento e desenvolvimento larvais retardados, se comparados com larvas alimentadas com dieta normal. Portanto, os efeitos dos inibidores de endopeptidases em populações de *D. saccharalis* poderiam interferir no crescimento populacional desta praga (POMPERMAYER et al., 2001).

Duas quimotripsinas, uma resistente e outra suscetível aos dois inibidores de endopeptidases de *Nicotiana glauca* (Solanales, Solanaceae) (NaPI), foram isoladas do intestino de *Helicoverpa spp.* Para estudar o mecanismo de resistência das quimotripsinas foram realizadas mutações na quimotripsina suscetível ao NaPI, usando aminoácidos correspondentes da quimotripsina resistente. Comparando os sítios de ligação dessas duas proteínas, quatro resíduos foram identificados como sendo os responsáveis por conferirem resistência ao inibidor (DUNSE et al., 2010b). Prasad et al. (2010) ao incorporarem o inibidor RgPI na dieta de *M. sexta*, constataram uma forte atividade inibitória contra as tripsinas do intestino da lagarta.

Já Telang et al. (2009), trabalharam com dois genes do inibidor de quimotripsina (WCI2 e WCI5), os quais foram obtidos e caracterizados a partir de plantas de *Psophocarpus tetragonolobus* (Fabales, Fabaceae). Como resultado observou-se que quando esses inibidores de endopeptidases foram adicionados à dieta artificial causou uma redução significativa no crescimento de *H. armigera*, devido à inibição das endopeptidases digestivas. *D. saccharalis*, por sua vez, apresentou nível das tripsinas reduzido após a ingestão de dieta artificial, a qual continha inibidor de tripsina (ApTI) purificado a partir de sementes de *Adenanthura pavonina*. Além disso, o ApTI também acarretou a diminuição da atividade das tripsinas, tanto no intestino quanto nas fezes das larvas, fato este que reforça sua sensibilidade ao inibidor (SILVA et al., 2012). Em tabaco um inibidor de serina peptidase (NtPI) confere tolerância a múltiplos fatores de estresse em plantas transgênicas, as quais expressam o inibidor constitutivamente. Segundo Srinivasan, Kumar e Kirti (2009), a expressão ectópica do NtPI, confere tolerância a diferentes estresses, dentre eles NaCl, pH, sorbitol e ao ataque de *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae) e *H. armigera*.

A combinação de inibidores ocasiona uma melhor proteção às culturas, quando uma classe de inibidores é usada para corresponder à capacidade genética do inseto de se adaptar a uma segunda classe de inibidores. Dunse et al. (2010a) encontraram um inibidor de peptidase produzido por *Solanum tuberosum* (Solanales, Solanaceae) (StPin1A), o qual inibe fortemente a atividade da quimotripsina resistente ao NaPI. Eles então avaliaram o efeito inibitório de ambos os inibidores a *H. armigera*, em laboratório e com plantas transgênicas de algodão expressando NaPI. O efeito inibitório da combinação dos dois inibidores causou uma diminuição do crescimento das lagartas criadas em laboratório. Já nas plantas transgênicas,

para os dois inibidores, a combinação do efeito inibitório foi refletida na maior produção de algodão quando as mesmas foram comparadas com plantas não transformadas.

Apesar dos resultados positivos observados até o momento, existem alguns entraves limitando a utilização deste mecanismo no controle aos insetos. Dentre estes está o fato de muitas espécies serem capazes de escapar dos efeitos negativos dos inibidores de peptidases das plantas, via diferentes mecanismos (BROADWAY, 1995; GIRARD et al., 1998; PAULILLO et al., 2000; BRITO et al., 2001; VOLPICELLA et al., 2006,). Outro aspecto relevante é a flexibilidade dos insetos polívoros em mudar sua fonte alimentar. Isto foi evidenciado por Erlandson et al. (2010), que relatou a adaptação da *Mamestra configurata* (Lepidoptera, Noctuidae), *quando sujeita a* diferentes tipos de inibidores e dietas. Com esses dados os autores propõem que os insetos polívoros respondem rapidamente as mudanças de fonte alimentar, uma vez que há uma ampla variedade de genes de serina peptidases expressas no intestino médio das *M. configurata*.

Gatehouse et al. (1999) estudando *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, Noctuidae) verificaram que na presença de inibidores não há uma redução na atividade proteolítica, mas sim uma super-produção das enzimas sensíveis ao inibidor. Outro mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese de endopeptidases menos sensíveis aos inibidores (BROADWAY, 1996; PAULILLO et al., 2000; BRITO et al., 2001; ABDEEN et al., 2005; BRIOSCHI et al., 2007). Estas enzimas podem ser endopeptidases secretadas normalmente no tubo digestivo ou podem ser ativadas após a ingestão de inibidores de endopeptidases. Volpicella et al. (2003), caracterizando as tripsinas presentes nos intestinos de lagartas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae), indicaram a existência de proteínas insensíveis aos inibidores testados (inibidores de soja, batata e mostarda). Tais autores determinaram a sequência de aminoácidos das enzimas sensíveis e insensíveis aos inibidores. Neste caso, foram encontradas cinco regiões que diferem as isoformas, se sobrepondo aos resíduos de contato entre enzima e inibidor. Broadway (1996), trabalhando com *Heliothis zea* (Lepidoptera, Noctuidae), alimentadas com inibidores de endopeptidases, incorporados à dieta, observou que as lagartas foram capazes de aumentar a produção de uma endopeptidase pouco sensível ao inibidor.

2.8 Plantas transgênicas com inibidores de peptidases

Tendo em vista o potencial demonstrado pelos inibidores de serina peptidases, é possível afirmar que um ótimo método de controle de insetos praga seria a obtenção de plantas transgênicas capazes de expressarem os inibidores em questão. Além disso, uma vez interrompido o cultivo das plantas transgênicas, a presença do inseto é restaurada, ocasionando um efeito leve e reversível ao meio ambiente. Em experimentos com transgênicos de *N. attenuata*, tanto *Manduca sexta* quanto *S. exíqua* (Lepidoptera, Noctuidae), apresentaram um melhor desempenho em plantas deficientes de inibidor de tripsina quando comparados com o tipo selvagem da planta (ZAVALA et al., 2004; STEPPUHN; BALDWIN, 2007). De Leo et al. (1998) obtiveram plantas transgênicas expressando diferentes níveis de MTI-2 (inibidor de tripsina de mostarda). Foi detectado um limiar de sensibilidade de *S. littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) ao MTI-2, o qual representa a concentração mínima do inibidor necessária para causar efeitos deletérios nas lagartas. Na presença de altos níveis do inibidor, há uma síntese de novas peptidases, mostrando a habilidade do inseto em adaptar sua digestão. Já com concentrações abaixo do limiar de sensibilidade, as larvas são capazes de superar a inibição, superexpressando endopeptidases digestivas.

A importância das endopeptidases intestinais dos insetos despertou o interesse para seu mecanismo de interação com Bt (*Bacillus thuringiensis*). O uso de plantas transgênicas expressando proteínas Cry e inibidores de endopeptidases apresentam um eficiente controle aos insetos praga. Os inibidores de peptidases promovem um aumento na toxicidade do Bt, diminuindo o efeito do desenvolvimento de resistência pelo inseto, ampliando sua gama de controle (OPPERT et al., 1999; ZHU; ABEL; CHEN, 2007; CUI et al., 2011; ZHU et al., 2012). Zhu et al. (2012) estudando o efeito da interação do Bt com inibidores de peptidases, verificaram que tal combinação acarretava em uma diminuição expressiva do peso larval de *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae), assim como redução na atividade enzimática. Por sua vez, Cui et al. (2011) propôs que plantas transgênicas de algodão, expressando a proteína Cry1Ac e o inibidor de tripsina a partir de feijão de corda (CpTI), não acarretou danos a *H. armigera* sob condições de campo. Em estudos sob condições de laboratório, plantas transgênicas para Cry1Ac mais CpTI

promoveram uma redução na população de *H. armigera* (ZHAO et al., 1999; CUI et al., 2011).

2.9 Adaptação de *S. frugiperda* aos inibidores de endopeptidases

A adaptação de lagartas de *S. frugiperda* aos inibidores de peptidases foi reportada por Alfonso et al. (1997) utilizando inibidores de tripsina e amilase, estes últimos extraídos de cereais. Os autores constataram que o inibidor de trigo heterotetramérico é o mais eficiente contra as amilases digestivas do inseto. Já o inibidor de tripsina foi específico, não alterando a atividade de enzimas como quimotripsinas, elastases, carboxipeptidases, entre outras. Já Paulillo et al. (2000) observaram alterações na atividade trípica e quimotríptica de *S. frugiperda*, quando o inseto foi submetido à dieta contendo inibidores de endopeptidases de soja. O consumo de dieta artificial, contendo o inibidor de soja, não reduziu o crescimento e o desenvolvimento dos insetos. Este fato está relacionado à adaptação das lagartas aos inibidores de endopeptidases de soja, permitindo a estes insetos o mesmo desempenho das lagartas alimentadas em dieta sem o inibidor.

Posteriormente, Brioschi et al. (2007), mostraram que a adaptação da *S. frugiperda* aos inibidores de endopeptidases de soja envolve a síntese “de novo” de endopeptidases e também a indução de enzimas já existentes. As enzimas digestivas desta lagarta são sensíveis tanto a inibidores exógenos quanto a inibidores endógenos (LWALABA et al., 2010). Lagartas de sexto instar, alimentadas com inibidor exógeno de tripsina de soja da família Kunitz (SBTI), reduziram a atividade trípica no lúmen, nas células e nas secreções destas células. Já os inibidores endógenos de tripsinas e aminopeptidases estão presentes no lúmen e ventrículos. Neste estudo, foram avaliadas lagartas submetidas aos seguintes tratamentos: ausência de alimentação; dieta artificial; e dieta artificial com celulose. Como resultado observou-se que os níveis de tripsina não foram alterados e, portanto foi constatado que há um nível basal de enzimas digestivas em lagartas de *S. frugiperda* no sexto instar. Manter os níveis de tripsina constante é interessante para o inseto, uma vez que altas quantidades de aminoácidos são necessárias para o crescimento e reprodução dos adultos (LWABALA et al., 2010). Recentemente, Oliveira et al. (2013) constataram que *S. frugiperda* responde de maneira similar a inibidores de peptidase das famílias Kunitz e Bowman-Birk. Tais autores verificaram

que há um aumento da atividade proteolítica das tripsinas, além de algumas tripsinas se tornarem insensíveis a ambos os tipos inibidores.

2.10 Mecanismo epigenético em insetos

O termo epigenética, significa toda alteração que ocorre fora da genética convencional (JAENISCH; BIRD, 2003). São alterações herdáveis por um curto período, não envolvendo mutações no próprio DNA. Aparentemente, os mecanismos epigenéticos permitem ao organismo responder a alterações ambientais a partir de mudanças na expressão gênica (JAENISCH; BIRD, 2003). Respostas fisiológicas normais a determinados estímulos ambientais também podem ser mediadas por mecanismos epigenéticos. O processo de metilação do DNA, que envolve a adição covalente de grupos metil ao carbono 5 da citosina, está intrinsecamente ligado a regulação epigenética.

Os insetos estão sendo considerados modelos inovadores para estudos funcionais da metilação do DNA, uma vez que seus genomas são relativamente pequenos e seus sítios de metilação se encontram, quase que exclusivamente, nos corpos gênicos (LYKO; MALESKA, 2011). Houve um grande progresso na identificação de alvos de metilação do DNA em insetos (ELANGO et al., 2009; XIANG et al., 2010; ZENG; YI, 2010; GLASTAD et al., 2011; PARK et al., 2011; BONASIO et al., 2012; FORET et al., 2012; HERB et al., 2012), no entanto, pouco é conhecido sobre o contexto epigenético maior da metilação.

Em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) a metilação ocorre principalmente no corpo dos genes, próximos aos éxons com *splicing* alternativo, sugerindo que modificações epigenômicas regulam a quantidade e variedade dos transcritos (WANG et al., 2006; FORET et al., 2009; LYKO et al., 2010). De Leo e Gallerani (2002), em experimentos com plantas transgênicas para o MTI-2, constataram que em insetos alimentados com as plantas transgênicas há um aumento na expressão das peptidases já existentes no intestino, ou a expressão de novas peptidases. Eles verificaram que o padrão das peptidases, assim como suas atividades não foram transferidos para as larvas da segunda geração. As larvas se adaptam ao inibidor de tripsina de mostarda (MTI-2), mas não transmitem essa característica para seus descendentes.

Para compreender como diferentes informações epigenéticas estão ligadas à regulação dos genes em insetos, Hunt et al. (2013) compararam os padrões de

metilação em *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae) e *A. mellifera*, com o dados de modificações das histonas em *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae). Os autores mostraram que a metilação do DNA é o único componente conservado, integrado e regulatório no genoma dos insetos. A conservação do padrão de metilação, assim como a porcentagem de metilação no genoma de insetos, tem instigado à curiosidade de outros grupos (MANDRIOLI; VOLPI, 2003; FIELD et al., 2004; HUNT et al., 2010; FORET et al., 2012; GLASTAD et al., 2013).

Desta forma, uma questão relevante é compreender a função da metilação no controle dos genes de tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda*, ligados à resposta ao inibidor de endopeptidase da soja. Ou seja, insetos expostos à presença dos inibidores manteriam elevada expressão dos genes que codificam as endopeptidases nas gerações seguintes, mesmo na ausência dos inibidores.

2.11 Transcriptomas de insetos

O transcriptoma é um conjunto completo de transcritos de RNA produzidos pelo genoma em qualquer momento (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Os dados gerados dão uma visão global do processo estudado e possibilita novas abordagens. Por isso o interesse na obtenção de transcriptomas do intestino de insetos. O intestino dos insetos está envolvido em processos fisiológicos e toxicológicos, incluindo a digestão e alocação de nutrientes, desintoxicação, resposta imune e defesa contra patógenos (BROADWAY et al., 1994; XIE et al., 2012).

Em estudos recentes em *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), o transcriptoma permitiu identificar os genes que codificam as proteínas produzidas no intestino durante fase de não alimentação do inseto (XU et al., 2012). Xie et al. (2012) estudando o transcriptoma de *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae), identificaram os genes, do intestino do inseto que estão envolvidos na resistência a toxina produzida por *Bacillus thuringiensis*. Já Pauchet et al. (2010) utilizaram dessa ferramenta para identificar em *Manduca sexta* os genes envolvidos nos processos de digestão, desintoxicação e imunidade. Em *Maruca vitrata* (Lepidoptera, Crambidae) os dados obtidos a partir do transcriptoma serão fundamentais no desenvolvimento de plantas transgênicas para o controle do inseto (MARGAN et al., 2011). Celorio-Mancera et al. (2011) identificaram transcritos das glândulas salivares

de *H. armigera* com a finalidade de entender a função da saliva na digestão e na indução de resposta nas plantas hospedeiras. Contudo, até o momento, não há na literatura relatos de transcriptoma de Lepidoptera submetido à ingestão de inibidores de peptidases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração dos inibidores de endopeptidases de soja

Os inibidores de endopeptidases de soja foram extraídos a partir de sementes da variedade IAC-8. As sementes foram homogeneizadas (100 g) com auxílio de um liquidificador em solução salina (1 l de NaCl 0,15 M) durante uma hora, a temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se o homogeneizado em oito camadas de gaze, a fim de remover o material sólido. O filtrado foi centrifugado a 3000xg durante 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, mediu-se o volume do sobrenadante e ajustou-se para 70 % com acetona gelada, em condições de agitação. Por fim, a solução foi centrifugada 6000xg durante 20 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi liofilizado durante 72 horas para remoção da acetona residual, fornecendo um extrato semipurificado de inibidores de endopeptidases de soja.

3.2 Estimativa da concentração dos inibidores

Para o cálculo da atividade remanescente da tripsina e quantidade de inibidor presente no extrato semi purificado, foi preparado 1mg/ml de tripsina em 0,001M de HCl, tomando o cuidado de manter a solução sempre no gelo. A quantidade de tripsina foi medida no espectrofotômetro a 280nm. O resultado da leitura foi multiplicado por 0,7 (fator de correção). A concentração ideal de tripsina é de 1 a 2µg/100µl.

Foi preparada uma solução de 1mg de inibidor em 1ml de água, após ressuspender, a solução foi rapidamente centrifugada e apenas o sobrenadante foi coletado. A temperatura do espectrofotômetro deve ser de 25°C. As leituras foram realizadas durante 4 min em intervalos de 30s.

O controle foi realizado sempre no início e no fim de cada experimento. Ele também foi utilizado durante todas as leituras para zerar a medição. O controle foi preparado adicionando-se 200µl buffer (Tris 0,046 mM e CaCl₂ 0,0115M em pH 8,1); 100µl 0,01M HCl; 2,4ml buffer e 0,3ml TAME(p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester). Já a amostra foi composta por 200µl de buffer; 100µl de tripsina; X µl inibidor e incubada durante 3min. Após o período de incubação foram adicionados ao mesmo tempo: 2,4ml buffer e 0,3ml TAME. Foram utilizados os seguintes volumes da solução de extrato semi purificado de inibidores (X): 1; 5; 10; 15; 30; 60; 80; 100 e 120 µl.

Os resultados das leituras foram plotados no gráfico, onde o eixo y foi o valor da leitura e o eixo x o tempo. O valor de “b” da equação da reta ($a+bx$) foi utilizado para os cálculos da atividade remanescente da tripsina. Os valores de “b” do controle no início e no fim tem que ser semelhantes. Fez-se uma média com os dois controles e esse valor foi considerado como 100% de atividade da tripsina. Para os demais valores de “b” foi feita uma regra de três. Os valores encontrados são a atividade remanescente da tripsina. Os valores foram plotados em um gráfico com a concentração de inibidor usada. Então traçou-se uma reta que melhor explicasse a curva. Ver em que concentração de inibidor há 50% da atividade remanescente.

Já para o cálculo da quantidade de inibidor presente no extrato de soja foi calculada com base nas seguintes premissas: (a) somente 50 % da concentração da enzima ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) utilizada no ensaio estão ativas; (b) a concentração equivalente a 50 % da inibição da enzima (IC_{50}) é igual à metade da tripsina ativa e (c) a razão molar entre enzima e inibidor equivale a um para o inibidor de soja. Considerando-se essas premissas, a estimativa da concentração é obtida multiplicando-se a quantidade da endopeptidase utilizada no ensaio, pela razão entre as massas moleculares da peptidase e do inibidor. O produto deste cálculo é multiplicado pela constante 0,25 (metade da endopeptidase é ativa e trabalha-se com a estimativa do IC_{50}). A determinação da quantidade necessária do inibidor para redução da atividade da endopeptidase em 50 % (IC_{50}) resultou dos ensaios de inibição, a concentração do inibidor foi incrementada até a obtenção de 100 % de inibição da enzima (MOURA; RYAN, 2001).

3.3 Experimentos realizados para averiguar o mecanismo de resposta dos genes de tripsinas e quimotripsinas a exposição aguda e crônica aos inibidores de peptidases de soja

Os insetos utilizados, em todos os ensaios, foram cedidos pelo professor Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. As colônias de insetos foram criadas em dieta artificial e mantidas sob um fotoperíodo de 14:10 horas (Dia:Noite) a 26 ± 1 °C, com umidade relativa 70 ± 10 %. A fim de confirmar a veracidade dos dados, foram realizados três experimentos independentes. Os resultados apresentados são a média ponderada dos experimentos e o erro é o

desvio padrão dos resultados entre os experimentos. Assim, a criação das lagartas é apresentada na figura 1:

Figura 1 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas nos experimentos de exposição aguda e crônica aos inibidores de endopeptidases de soja

Para averiguar crônico, após a eclosão das larvas, as mesmas foram divididas em dois grupos. Um grupo foi inoculado em dieta controle e o outro em dieta controle acrescida de 0,5% dos inibidores de endopeptidases de soja. Os tratamentos foram conduzidos até o sexto instar, período no qual as procedeu-se a extração dos intestinos das lagartas para extração do RNA.

A fim de entender melhor o mecanismo de defesa da *S. frugiperda* aos inibidores de endopeptidases de soja, foi realizado um experimento com exposição aguda aos inibidores. Para tal as larvas recém-eclodidas foram inoculadas em dieta controle, onde permaneceram até atingirem o sexto instar. A partir daí metade das lagartas foram transferidas para dieta controle acrescida de 0,5% dos inibidores, por

um período de 48 horas. Após esse período os intestinos das lagartas foram removidos para extração do RNA.

3.4 Experimentos para investigação do mecanismo de retroalimentação dos genes de tripsinas e quimotripsinas

Foram realizados três experimentos biológicos, a fim de confirmar os resultados obtidos. Em cada experimento amostraram-se 15 lagartas por repetição, totalizando três repetições por tratamento. A criação das lagartas de *S. frugiperda* procedeu-se conforme descrito a seguir (Figura 2):

Figura 2 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas no mecanismo de retroalimentação

(a) As lagartas de primeiro instar foram divididas em dois grupos; um alimentado em dieta artificial padrão (MISHFELDT; PARRA, 1999) (Tabela 1), e o outro em dieta artificial padrão acrescida de 0,5 % (p/v) do extrato ativo do inibidor de endopeptidase de soja (ingestão crônica do inibidor a partir da eclosão das larvas). Extraíu-se o intestino das lagartas, dos dois tratamentos, quando elas atingiram o sexto instar.

(b) Ao atingirem o terceiro instar, as lagartas criadas em dieta artificial padrão acrescida de 0,5 % (p/v) de inibidores de endopeptidases de soja, foram divididas em dois grupos: um continuou a alimentar-se em dieta artificial padrão com a presença dos inibidores de soja, até o sexto instar. Já o outro grupo de lagartas, foi transferido para uma dieta sem inibidor. O intuito da mudança da dieta, com inibidores de endopeptidases de soja para dieta padrão, foi verificar se após a remoção do agente estressante haveria alteração nos níveis de expressão dos genes estudados.

Em todas as etapas dos experimentos, que envolviam o sacrifício dos insetos, as lagartas foram imobilizadas em gelo. Os intestinos das lagartas foram removidos com auxílio de pinças, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C para serem usados na extração do RNA.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial para criação de *Spodoptera frugiperda* (MISHFELDT; PARRA,1999)

Componentes	Quantidade
Feijão	75 g
Germe de trigo	60 g
Proteína de soja	30 g
Caseína	30 g
Levedura de cerveja	37,5 g
Complexo vitamínico*	9 ml
Ácido ascórbico	3,6 g
Ácido sórbico	1,8 g
Metil-parahidroxibenzoato (nipagin)	3 g
Tetraciclina	113 mg
Formaldeído	3,6 ml
Agar	23 g
Água	1200 ml

* complexo vitamínico diluído em 1 l de água destilada: 1 g de niacina, 1 g de pantotenato de cálcio, 0,5 g de tiamina, 0,25 g de piridoxina, 0,1 g de ácido fólico, 0,02 g de biotina, 2 ml de vitamina B₁₂(1000mg/ml).

3.5 Extração de RNA e obtenção de cDNA

Os intestinos foram macerados até a obtenção de um fino homogeneizado. O RNA total presente nos extratos intestinais foi extraído utilizando-se o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, 100 mg de macerado foi adicionado a 1 ml de trizol, a mistura foi então agitada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. À mistura foram adicionados 200 µl de clorofórmio, o tubo foi agitado e então procedeu-se a centrifugação durante 15 minutos por 4 °C a 12.000 rpm. Coletou-se a fase aquosa, a qual foram adicionados 500 µl de isopropanol e em seguida tal mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se então a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 750 µl de etanol a 75 % e centrifugado durante 5 minutos a 4 °C em 7.500 rpm. Uma vez extraído, o RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I (Fermentas) para evitar contaminação com DNA genômico. Com o intuito de melhorar a qualidade do RNA e remover os resíduos da DNase, procedeu-se uma segunda extração com o reagente TRIZOL, desta vez utilizando apenas metade do volume indicado pelo fabricante. As amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro a 260 nm, sendo a integridade do RNA verificada pela razão das leituras em 260/280 nm e por intermédio de gel desnaturante. O cDNA foi obtido a partir de 1 µg de RNA total, 1 µl do primer oligo(dT) 18 (50 µM) e água para um volume final de 5 µl. O ciclo utilizado para a síntese do cDNA foi 70 °C por 5 minutos, seguidos de 4 °C por mais 5 minutos, a reação foi colocada no gelo. Após essa etapa foram adicionados 15 µl da seguinte mistura: 6,6 µl de água Mili-Q; 4 µl de tampão 5X; 2,4 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dNTPs (10 mM) e 1 µl da enzima transcriptase reversa Superscript TM III (Promega). Para amplificação foi adotado o ciclo de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C durante 15 minutos.

3.6 PCR em tempo real

Todos os experimentos seguiram as diretrizes do MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (BUSTIN et al., 2009). Para as reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizou-se o aparelho StepOne da Applied Biosystems. Cada reação foi composta de 12,5 µl da mistura Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas); 7,9 µl de água Mili-Q; 0,3 µl de cada iniciador (10 µM) (Anexo) e 4 µl do cDNA diluído 1:100. O programa de

amplificação foi composto por um ciclo a 50 °C por 2 minutos, um ciclo 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e mais 40 ciclos de 58 - 62,5 °C (dependendo da temperatura de anelamento do iniciador) por 30 segundos. Após o término da amplificação dos fragmentos foi realizada a curva de “melting”, a qual se iniciava sempre na temperatura de anelamento do primer utilizado, adicionando-se 1 °C até atingir 95 °C. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicatas.

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir dos genes obtidos do transcriptoma, realizado no laboratório (Tabela 2). Para tal, foi utilizado o software OligoArchitectTM da Sigma-Aldrich[®] (<http://www.oligoarchitect.com/ShowToolServlet?TYPE=SYBR>). Informações como a formação de estruturas secundárias, auto-complementaridade e complementaridade com outros primers, foram verificados pelo software NetPrimer (Premier Biosoft) (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>). Para averiguar a especificidade dos iniciadores, foi realizado um blastn no site PubMed.gov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, US National Library of Medicine National Institutes of Health) entre as sequências dos iniciadores e todas as sequências dos genes utilizados. Este mesmo parâmetro foi confirmado por PCR normal, assim como a temperatura de anelamento. Já a eficiência de amplificação de cada iniciador foi obtida para cada corrida, por meio do software LinReg (RAMAKERS et al., 2003).

As análises da expressão relativa dos genes, por sua vez, foram obtidas a partir do software Relative Expression Software Tool 384 (Rest 384[®]), desenvolvido por Pffaf (2001). Realizou-se teste estatístico por meio de 2.000 randomizações entre os padrões de fluorescência (CTs: *cycle threshold*) dos controles e tratamentos de cada gene e teste de t ($P < 0,05$). Adotou-se também a normalização dos dados com relação aos genes de referência GAPDH e S30. Tal normalização é importante, uma vez que as amostras foram tomadas de *pools* de indivíduos diferentes, tendo por intuito minimizar os erros da variação, na quantidade de material entre as amostras coletadas.

Tabela 2 - Primers de tripsinas e quimotripsinas desenhados a partir do transcriptoma de *S. frugiperda*

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
SfChy2	CGTCTCAGGAAAACCCAGTC	AGGGACGTTGGAAATGTCAG
SfChy4	TGCTCCAGCTCAGCTCGGTC	CGTCATTTTCGGACTAGACTTGGAG
SfChy5	TTACCGCTAACCGTGTGCTT	CGATGACATCTGACAAGGCG
SfChy7	TTCCTGAGCCACGTTAGCTT	CAAGACAGGCTCGTTGTTGA
SfChy8	TATGGTACTAGCGTCGCAAG	GAGCAATAGGAGCGAGGTTAT
SfChy9	GGATCTCAGCTCGGAGAAAA	GCAAGAGGACCACCAGAGTC
SfChy11	GGCTCCACCACTCTCTTCAC	GCAATGGGTTGGATGTTAGC
SfChy12	CATGATCAGGCTGAACTCCA	ATACCACCACCAGCACCATC
SfChy15	CAATACCGTCTTCGGCTACC	ATGATTCCAGCCTGATACGG
SfChy17	CTTTAGTGGCGGTGTCTTCC	GCTTCTATCTCGGCTTGTCG
SfChy19	ACGAACCCACGACTAACAC	TCCCTGGCAAATACCAACTC
SfChy21	CAATTTGCCGTCTTCAGT	CACCACCGAGTATAGGATT
SfChy22	CTTGCCCTACGCTAATGTTG	CTGCTCCTCTACCTTACG
SfChy23	CTAACCTCAACAACGACATC	TGCCCAGTTTCCTACAAA
SfTry1	ACGAGGTGGCAATTAGGAAG	GATCATGCTGCTGGTGACAG
SfTry2	TCTTAAACGTCGGAGGCAAG	CCAGGGTAGAAAGCATCAGC
SfTry6	TTGTGTTTCTGGCTCTGTGC	GGATCGGTTGTTTCAAGATGG
SfTry7	TCGAGAATTACCCAGCATC	AGGTACCGGCTCTGATACGA
SfTry8	TCTTCTTTTCGCACACAGTGG	GAAGGCAGATGGAGAGTGGA
SfTry9	CAGAGGATTGTGGGTGGTTC	TGGGCAGCAGTAAGGATAGC
SfTry10	GAATATCGTCCACGGCTCAT	AGCAGTTGTACCCCATCCTG
SfTry11	AGCCTTAGGTGTGCCTCAGA	GAAGGTCGCCATAAAAGCAG
SfTry12	CCTCGATTACCGCTCTCTTG	GCCATCTGTTCACTTGGTCA
S30	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT
GAPDH	CGGTGTCTTCACAACCACAG	TTGACACCAACGACGAACAT

A porcentagem da participação de cada gene, no processo de digestão, foi calculada em relação ao gene S30. Foram realizadas análises para a participação dos genes em lagartas criadas em dieta controle e aquelas mantidas ou transferidas para dieta com 0,5% do inibidor de serina endopeptidase de soja. Para tal, foram utilizados os valores de CTs das lagartas controles do S30 e de cada gene, os valores foram analisados pelo software Rest®. O processo foi repetido para as lagartas criadas com 0,5% do inibidor.

3.7 Transcriptoma de *S. frugiperda*

As lagartas foram criadas, da eclosão das larvas ao quinto instar, em dieta acrescida de 0,5% (p/v) do extrato semipurificado dos inibidores de endopeptidases de soja. Foram coletados 50 intestinos, para a extração do RNA total por Trizol (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. O transcriptoma foi obtido a partir da plataforma Illumina/Solexa, pela empresa FASTERIS SA, Suíça. A anotação das sequências foi realizada por Dias¹ (informação pessoal), utilizando duas abordagens diferentes: o software CLCBIO Workbench e o VELVET. As sequências foram anotadas usando Blast2GO. Dados obtidos do Spodobase foram usados para complementar os obtidos pelo Illumina por meio do software CAP3. Apenas as sequências caracterizadas como serina endopeptidases foram utilizadas neste trabalho.

3.8 Alinhamento de sequências e árvore filogenética

Para a identificação dos resíduos envolvidos na função enzimática, as sequências correspondentes as proteínas ativas de tripsinas e quimotripsinas, da *S. frugiperda*, foram alinhadas a tripsina (PDB: 4I8H) e quimotripsina (PDB: 1YPH) bovina, utilizando-se o software T-coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O SPODOBASE Apenas as sequências completas e que apresentavam a tríade catalítica característica das serina endopeptidases foram utilizadas. Como critério de separação das tripsinas e quimotripsinas, foi utilizado o resíduo do aminoácido localizado na posição 189 das sequências.

As proposições filogenéticas foram realizadas no software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), conforme o método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). O suporte estatístico foi calculado pelo percentual de replicatas, nas quais as proteínas foram agrupadas entre si no teste de bootstrap (100 replicatas) (FELSENSTEIN, 1985) e as distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de p-distance (NEI; KUMAR, 2000). Por fim, as árvores foram analisadas no software FigTree.

¹ DIAS, R.O. USP/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

3.9 Experimento para avaliação da existência de controle epigenético

As larvas de *S. frugiperda* foram criadas como no item 3.3 e o intestino das lagartas, de ambos os tratamentos, foram extraídos no sexto instar (1º geração). Em paralelo, um lote de cada ensaio foi acasalado entre si, visando obter uma nova geração (2º geração). Os novos indivíduos da 2º geração foram divididos em dietas padrão e com inibidores de endopeptidases de soja (Figura 3).

Reações de qRT-PCR foram realizadas como descrito no item 3.6, sendo que os mesmos iniciadores foram utilizados. Se as lagartas da segunda geração alimentadas com dieta padrão, as quais vieram da primeira geração com inibidores de endopeptidases de soja, continuarem expressando altos níveis de tripsinas e/ou quimotripsinas, haverá evidências da ocorrência de um controle epigenético na expressão desses genes.

Figura 3 - Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas no controle epigenético

4 RESULTADOS

4.1 Transcriptoma

A partir dos dados do transcriptoma de *S. frugiperda*, alimentada em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja, foram obtidas 41 sequências de serina endopeptidases. Destas, as que não possuíam sequência completa, ou que estavam envolvidas em outros processos, que não a digestão, não foram analisadas. Nove delas foram preditas como prováveis tripsinas (Figura 4). Além disso, outras 14 sequências foram caracterizadas como prováveis quimotripsinas (Figura 5).

Figura 4 - Alinhamento das sequências de tripsinas de *S. frugiperda* a tripsina bovina. Asteriscos: resíduos envolvidos na tríade catalítica; setas: posições dos aminoácidos supostamente responsáveis pela separação das tripsinas em dois grupos, segundo Lopes et al. (2004). SfTry1...SfTry12: genes de tripsinas numerados em ordem crescente

Figura 5 - Alinhamento das sequências de quimotripsinas de *S. frugiperda* a quimotripsina bovina. Asteriscos: resíduos envolvidos na tríade catalítica. SfChy2...SfChy23: genes de quimotripsinas numerados em ordem crescente

4.2 Perfil transcricional das serina endopeptidases de *S. frugiperda* submetidas à ingestão aguda dos inibidores de endopeptidases de soja

A partir de análises de PCR em tempo real, foram obtidos os perfis transcricionais dos nove genes de tripsinas (Figuras 6A e B). A análise de expressão relativa dividiu as tripsinas em dois grupos, um grupo que não respondeu à presença dos inibidores de soja na dieta (Figura 6A), e um outro no qual houve um aumento significativo da expressão relativa (Figura 6B). As tripsinas com maior aumento de expressão relativa foram a SfTry6, SfTry8 e SfTry9 (3,1; 4,8 e 3,6 vezes respectivamente) (Figura 6B). A SfTry10 e a SfTry12 também responderam ao inibidor, porém com menor intensidade (1,5 e 1,3 vezes, respectivamente) (Figura 6B). Por outro lado, as SfTry1, SfTry2, SfTry7 e SfTry11 não apresentaram aumento de expressão relativa significativo (Figura 6A).

Outra informação relevante é a porcentagem de participação de cada gene no processo estudado. Esse dado indica a dimensão da importância biológica de cada endopeptidase no processo digestivo de *S. frugiperda*. Para as tripsinas não houve diferença significativa entre a contribuição de cada gene nos diferentes tratamentos (Figura 6C e D). Aquelas com maior participação foram as SfTrys 8, 9 e 7 as quais contribuíram cada uma com aproximadamente 20%, e a Sftry10 com 14% (Figura 6C e D). Desse modo, pode-se notar que tripsinas que apresentaram uma alta expressão relativa como SfTry6, por exemplo, tem baixa quantidade de transcritos (5%) (Figura 6C e D).

As análises apresentadas na figura 7A mostram um aumento praticamente generalizado da expressão relativa, referente às quimotripsinas estudadas. As endopeptidases que apresentaram maior expressão relativa foram SfChy5 e SfChy21 (6,4 e 5,21 vezes, respectivamente), enquanto o restante apresentou um aumento significativo de aproximadamente duas vezes (Figura 7A). Como pode ser observado na figura 7A, apenas três genes, SfChy7, SfChy19 e SfChy23, não responderam a ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja.

Figura 6 - (A e B) Expressão relativa dos genes de tripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). (C) Porcentagem da participação dos genes de tripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta controle. (D) Porcentagem da participação dos genes de tripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja.

A porcentagem de participação dos genes de quimotripsinas também foi calculada. Assim como as tripsinas o comportamento nos diferentes tratamentos foi o mesmo. As SfCh5 e SfChy21 que foram as quimotripsinas com maior aumento de expressão relativa, participam com menos de 1% cada na defesa das endopeptidases digestivas com os inibidores de endopeptidases de soja (Figura 7B e C). Contudo as com maior participação (SfChy2 - 43% e SfChy12 - 23%), também foram induzidas pelo inibidor.

Figura 7 - (A) Expressão relativa dos genes de quimotripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle, comparadas com lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). (B) Porcentagem da participação dos genes de quimotripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta controle. (C) Porcentagem da participação dos genes de quimotripsinas em relação ao gene de referência S30, das lagartas criadas em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. Genes com menos de 1 % de participação não foram colocados nos gráficos B e C.

4.3 Relação entre filogenia e expressão relativa

No intuito de verificar se havia uma correlação entre a expressão relativa dos genes de tripsinas e quimotripsinas e a evolução das mesmas foram propostas árvores filogenéticas (Figuras 8 e 9).

Como mostrado na figura 8, as tripsinas foram divididas em dois grupos distintos. Em um dos grupos encontram-se os genes SfTry1, SfTry2, SfTry7 e SfTry11 (Grupo 1). Já no outro estão as tripsinas SfTry6, SfTry8, SfTry9, SfTry10 e SfTry12 (Grupo 2). Para as tripsinas os dados de expressão relativa (Figuras 6A e B) assim como os dados de filogenia (Figura 8) dividiram os genes em dois grupos, nos quais estão contidos os mesmos genes.

Obteve-se então uma árvore filogenética para os genes de quimotripsinas estudados (Figura 9). Contudo, não há uma relação entre a expressão relativa dos genes de quimotripsinas (Figura 7A) e a evolução dessas proteínas (Figura 9).

Figura 8 - Árvore filogenética das tripsinas de *S. frugiperda* pelo método de Neighbor-Joining. Os números próximos aos nós representam os valores resultantes da análise de bootstrap. SfTry1...SfTry12: genes de tripsinas numerados em ordem crescente

Figura 9- Árvore filogenética das quimotripsinas de *S. frugiperda* pelo método de Neighbor-Joining. Os números próximos aos nós representam os valores resultantes da análise de bootstrap. SfChy2...SfChy23: genes de quimotripsinas numerados em ordem crescente

4.4 Comparação da expressão relativa de lagartas criadas com ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja e transferidas para dieta controle

As lagartas que estavam se alimentando em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja, foram transferidas, durante o terceiro instar, para dieta controle e mantidas na mesma até atingirem o sexto instar. Dentre os genes de tripsinas que apresentaram um aumento significativo da expressão relativa (SfTry6, SfTry8, SfTry9 e SfTry10), apenas a SfTry10 não apresentou redução na expressão relativa (Figura 10). Já os genes que não sofreram aumento na sua regulação com a presença dos inibidores de endopeptidases de soja, mantiveram sua expressão relativa constante (Figura 10). Das quimotripsinas analisadas, exceto as SfChy7, SfChy19 e SfChy23, as de mais apresentaram uma redução significativa na regulação de seus genes (Figura 11).

Figura 10 - Análise da expressão relativa dos genes de tripsinas, de lagartas criadas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja até o terceiro instar, as quais foram transferidas para dieta controle até o sexto instar (barras tracejadas), comparadas com lagartas mantidas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja desde a eclosão das larvas (barras não tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos, ao lado do nome dos genes, indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns resultados não significativos ($p > 0,05$).

Figura 11 - Análise da expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas criadas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja até o terceiro instar, as quais foram transferidas para dieta controle até o sexto instar (barras tracejadas), comparadas com lagartas mantidas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja desde a eclosão das larvas (barras não tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos, ao lado do nome dos genes, indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns resultados não significativos ($p > 0,05$).

4.5 Perfil transcricional das serina endopeptidases de *S. frugiperda* submetidas à ingestão aguda dos inibidores de endopeptidases de soja

O mecanismo adaptativo das tripsinas e quimotripsinas aos inibidores de endopeptidases de soja foi avaliado, também em exposição aguda ao inibidor. Das nove tripsinas estudadas, quatro tiveram um aumento de expressão relativa significativo, SfTry6, SfTry8, SfTry10 e SfTry11 (Figura 12). Os aumentos foram de 4,0; 3,8 e 3,6 respectivamente. Para as demais, não houve alteração no padrão de expressão. Do mesmo modo das 14 quimotripsinas analisadas, apenas três apresentaram aumento da expressão relativa após 48 horas de exposição aos inibidores de endopeptidases de soja (Figura 13). Os aumentos foram de 4,8; 2,3 e 2,8, para as quimotripsinas cinco, nove e 22 respectivamente (Figura 13).

Figura 12 - Expressão relativa dos genes de tripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas, durante 48 horas, em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$).

Figura 13 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas, a partir de lagartas de sexto instar, alimentadas em dieta controle comparadas com lagartas criadas, durante 48 horas, em dieta com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja. As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos no topo das colunas indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). ns: resultados não significativos ($p > 0,05$).

4.6 Mecanismo epigenético

Para verificar a ocorrência de um mecanismo epigenético no controle da expressão das serina endopeptidases estudadas, uma amostra de indivíduos de cada tratamento, referentes a primeira geração, foi conduzida até a fase adulta e acasalada entre si. A nova geração de lagartas foi denominada de segunda geração. Cada tratamento foi dividido em dois lotes. Um lote foi inoculado em dieta artificial controle e outro em dieta artificial acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja (Figura 3).

Visando confirmar a validade dos experimentos realizados o efeito da ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja foi comparado na primeira e segunda geração. Para tal, lagartas de segunda geração, que vieram de lagartas controle da primeira, foram inoculadas em dieta controle e dieta com 0,5% dos inibidores de soja. Obteve-se a expressão relativa dos genes entre os dois tratamentos na primeira e na segunda geração (Figuras 14 e 15). As análises apresentadas confirmam a eficácia do experimento, uma vez que não houve diferença significativa, entre as duas gerações, na expressão relativa de todos os genes analisados (Figuras 14 e 15).

Figura 15 - Comparação da expressão relativa dos genes de tripsinas, dos experimentos realizados na primeira (barras não tracejadas) e segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.

Figura 14 - Comparação da expressão relativa dos genes de quimotripsinas, dos experimentos realizados na primeira (barras não tracejadas) e segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.

As análises de expressão relativa dos genes de tripsinas, aparentam não ter um controle epigenético (Figura 16). Todos os genes de tripsinas analisados, que tiveram aumento significativo de expressão na primeira geração, apresentaram uma queda na expressão relativa na segunda geração.

Figura 16 - Expressão relativa dos genes de tripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5% inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram transferidas para dieta sem inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes.

Contudo, quando a expressão relativa dos genes de quimotripsinas, de lagartas criadas com 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja na primeira geração e que foram transferidas para dieta controle na segunda geração, foram comparados com as lagartas controle da primeira geração, três deles, SfChy5, SfChy15 e SfChy17, mantiveram seu alto nível de expressão (Figuras 17).

Figura 17- Expressão relativa dos genes de quimotripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5 % inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram transferidas para dieta sem inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio três experimentos independentes. ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). Tracejado em preto indica um gene com possível controle epigenético

A fim de confirmar esses dados, lagartas criadas nas duas gerações, em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja, foram comparadas com aquelas criadas em dieta controle na primeira geração. Houve um aumento de expressão de praticamente duas vezes para as quimotripsinas SfChy5, SfChy15 e SfChy17 (Figura 18).

Figura 18 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas a partir de lagartas da primeira geração criadas com ingestão crônica de 0,5% inibidores de endopeptidases, comparadas com lagartas criadas em dieta controle (barras não tracejadas). Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas mantidas em dieta com 0,5% inibidores de endopeptidases da primeira geração, comparadas com lagartas que vieram de dieta com inibidor da primeira geração e que foram mantidas em dieta com 0,5% de inibidor na segunda geração (barras tracejadas). As barras de erro correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. ns: resultados não significativos ($p \leq 0,05$). Tracejado em preto indica um possível gene com controle epigenético

5 DISCUSSÃO

5.1 Sensibilidade das serina endopeptidases estudadas aos inibidores de endopeptidases de soja

A partir das sequências obtidas do transcriptoma e classificadas como tripsinas, foram identificados resíduos de aminoácidos que podem ser considerados os possíveis responsáveis pela separação dessas enzimas (Figura 4). A partir da evolução desses genes, foi feita uma árvore filogenética, na qual é possível visualizar um grupo de enzimas consideradas sensíveis aos inibidores de endopeptidases de soja (Grupo1) e outro grupo de tripsinas insensíveis (Grupo 2) ao inibidor (Figura 8). Essa classificação foi proposta por Lopes et al. (2004) e permite classificar as tripsinas, em relação a sua interação com inibidor, em sensíveis ou insensíveis.

Dois dos resíduos de aminoácidos propostos por esse grupo foram encontrados nas sequências de tripsinas analisadas neste trabalho. Esses resíduos estão localizados nas posições 188 e 215. Para o grupo das tripsinas sensíveis há um resíduo de lisina na posição 188, enquanto que para as insensíveis encontra-se um resíduo de arginina na mesma posição. No grupo 2 as tripsinas sensíveis possuem um resíduo de triptofano na posição 215, já nas insensíveis o resíduo que ocupa essa posição é a fenilalanina (Figura 4).

Além disso, a divisão das tripsinas em dois grupos, também foi observada na expressão relativa dessas enzimas (Figura 6). As SfTrys 1, 2, 7 e 11 não responderam a ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja, sendo consideradas sensíveis ao inibidor (Grupo 1) (Figura 6A). As demais tripsinas tiveram sua expressão relativa significativamente aumentada após as lagartas terem ingerido dieta com 0,5 % dos inibidores de soja. Por isso são consideradas insensíveis ao inibidor e se enquadram no grupo 2 (Figura 6B). Esses dados estão de acordo com os verificados para expressão de tripsinas para outros lepidópteros (LOPES et al., 2004).

Contudo outros estudos são menos criteriosos ao classificar tripsinas e quimotripsinas quanto à sensibilidade ao inibidor (JONGSMA et al., 1995; GIRI et al., 1998; MAZUMDAR-LEIGHTON; BOWN et al., 2004; CHOUGULE et al., 2005; VOLPICELA et al., 2006). Segundo esses autores, uma endopeptidase é dita sensível quando não responde a ingestão do inibidor ou quando há uma queda no

nível do seu transcrito. Desse modo, as enzimas que tem um aumento na sua expressão, são consideradas insensíveis ao inibidor de peptidase de plantas. Pelas análises de expressão relativa, das quimotripsinas aqui utilizadas, é possível denominar as quimotripsinas 7, 19 e 23 como sensíveis, uma vez que elas mantêm sua expressão inalterada (Figura 7). As demais quimotripsinas analisadas foram consideradas insensíveis aos inibidores de endopeptidases de soja, pois apresentaram aumento significativo na sua expressão relativa (Figura 7).

5.2 Efeito da ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja as tripsinas e quimotripsinas do intestino de *S. frugiperda*

A ingestão de inibidores de peptidases de plantas pelos insetos pode prejudicar absorção de aminoácidos ou, em alguns casos, ocasionar a morte. *S. frugiperda* é capaz de se adaptar aos efeitos ocasionados pelos inibidores de endopeptidases (Paulilo et al. 2000; Brioschi et al., 2007). Buscando entender o mecanismo adaptativo de *S. frugiperda* aos inibidores de endopeptidases de soja, as lagartas foram submetidas à ingestão crônica dos inibidores de endopeptidase de soja (larvas criadas em dieta acrescida de 0,5% de inibidores de endopeptidases de soja desde a eclosão das larvas). Houve uma expressão gênica diferencial das endopeptidases (tripsinas e quimotripsinas) presentes no trato digestivo de *S. frugiperda*. Enquanto algumas serina endopeptidases respondem aos inibidores de endopeptidases de soja, outras mantem sua quantidade de transcritos (Figuras 6 e 7).

Outros trabalhos também verificaram uma expressão diferencial das endopeptidases de insetos. Segundo Bown, Wilkinson e Gatehouse (1997) a ingestão de SBTI por *Helicoverpa armigera* induz a atividade de endopeptidases sensíveis e insensíveis ao inibidor. Em *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera, Noctuidae) e *Helicoverpa zea* também ocorreu um padrão de expressão diferencial das tripsinas e quimotripsinas estudadas, quando foi acrescido 1% do inibidor de tripsina de soja na dieta desses insetos (MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY 2001).

A composição do extrato semipurificado dos inibidores de endopeptidase de soja, utilizado neste trabalho, é constituído principalmente do tipo Kunitz (SBTI) (NADALINI, 2007). Os aumentos das expressões relativas aqui apresentadas para os genes de quimotripsinas (Figura 7), corroboram com o trabalho de Erlandson et al. (2010). Segundo esses autores, as quimotripsinas são menos sensíveis do que

as tripsinas aos inibidores de endopeptidase SBTI, e devido a esse fato, elas são induzidas na presença desses inibidores.

Brioschi et al. (2007), utilizando o mesmo extrato semipurificado dos inibidores de endopeptidases de soja, também observou aumento na expressão relativa, para quase todos os genes, de quimotripsinas analisados. Além disso, os autores encontraram um grupo de genes que só foram expressos após a ingestão dos inibidores de endopeptidases de soja (“de novo”). Nenhum dos genes analisados neste trabalho apresentou expressão “de novo”. Esse fato provavelmente ocorreu devido ao diferente tempo de exposição aos inibidores de endopeptidases de soja, as distintas metodologias utilizadas na obtenção das sequências e aos critérios utilizados como nível mínimo de transcritos considerado. Os genes de tripsinas descritos no trabalho de Brioschi et al. (2007) não foram utilizados neste trabalho porque não foram encontrados no transcriptoma e as sequências obtidas pelos autores não estavam completas. Vale frisar que o transcriptoma foi obtido apenas de lagartas alimentadas com ingestão crônica dos inibidores de endopeptidase de soja e as sequências analisadas pelos autores citados a cima foram obtidas a partir de bibliotecas subtrativas de cDNA.

Neste trabalho, alguns dos genes de tripsinas analisados, não apresentaram diferenças significativas na sua expressão relativa (Figura 6). Segundo Lwalaba, Hoffmann e Woodring (2010), manter os níveis das tripsinas em lagartas de *S. frugiperda* é importante, uma vez que são proteínas essenciais para o desenvolvimento larval e a produção de ovos pelas mariposas. É interessante notar que também foram encontradas quimotripsinas com igual expressão relativa entre controle e tratamento (Figura 7). Em insetos as serina endopeptidases desempenham funções como resposta imune (KANOST et al., 2004), processos de muda (HE et al., 2009), digestão de proteínas (MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY, 2001; BROEHAN et al., 2008) entre outros. Assim, pode-se inferir que as enzimas que não responderam aos inibidores de endopeptidases de soja, podem estar ligadas a funções como processos de muda ou resposta imune. Novos experimentos precisam ser realizados para comprovação da função dessas serina endopeptidases.

Outra abordagem utilizada foi calcular a porcentagem de participação de cada gene no processo estudado. Tanto para os genes de tripsinas como para os genes de quimotripsinas, as proporções de participação dos genes foi mantida tanto para

lagartas criadas em dieta controle, quanto para lagartas criadas com ingestão crônica do inibidor (Figuras 6 e 7). No entanto, Paulilo et al. (2000) constatou a atividade enzimática de duas tripsinas e três quimotripsinas em lagartas de *S. frugiperda*, criadas com dieta padrão. Quando as lagartas foram expostas a ingestão crônica do extrato semipurificado dos inibidores de endopeptidases de soja, notou-se a atividade de três tripsinas e uma quimotripsina. Essas alterações na atividade enzimática entre lagartas criadas em dieta controle e dieta com inibidores de endopeptidases de soja, pode ser explicada pelo perfil cromatográfico dos resultados. Picos mais pronunciados podem conter duas ou mais enzimas, e dois picos próximos, não muito bem definidos, podem representar apenas uma enzima. Há também o fato de poder ocorrer modificações pós-traducionais dessas proteínas.

5.3 Comparação da expressão relativa de lagartas criadas com ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja e transferidas para dieta controle

A produção dos mRNAs, dos genes de serina endopeptidases aqui estudados, possivelmente é regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback*). Evidências indicam que há uma redução nos níveis dos transcritos uma vez que níveis suficientes de endopeptidases são alcançados. Uma maneira proposta para testar essa hipótese, foi transferir lagartas de terceiro instar alimentadas com inibidores de endopeptidases de soja desde a sua eclosão, para dieta sem o inibidor (Figura 2). As análises aqui apresentadas mostram que, de uma maneira geral, houve uma queda na expressão dos genes que responderam a ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja (Figuras 10 e 11). Resultados semelhantes foram encontrados para *Manduca sexta* quando lagartas alimentadas com *Brassica napus* foram transferidas para dieta sem inibidor (ERLANDSON et al., 2010).

Outra hipótese seria a de que tal fato ocorre por questões de desenvolvimento, uma vez que ao fim do sexto instar as lagartas de *S. frugiperda* entram em período de pré-pupa. Os experimentos foram realizados no segundo ou terceiro dia do sexto instar. Segundo Lwalaba, Hoffmann e Woodring (2010), estudando as peptidases digestivas de *S. frugiperda*, há um pico de atividade das tripsinas no terceiro dia do sexto instar. Então no quarto dia, fase de pré-pupa, ocorre uma queda brusca nos

níveis de atividade dessas enzimas. Assim, essa hipótese pode não ser a melhor explicação para a queda nos níveis dos genes aqui estudados.

Um dos mecanismos propostos para a adaptação dos insetos aos inibidores de peptidases de plantas é o *shotgun* (BRIOSCHI et al., 2007). As análises aqui apresentadas mostram que dos 23 genes analisados, 16 foram significativamente induzidos pelos inibidores de endopeptidases de soja, corroborando com o mecanismo de *shotgun*. Quando a fonte estressora foi removida, houve uma queda na expressão relativa, caracterizando um mecanismo adaptativo de retroalimentação (*feedback*) desses genes. Resultados semelhantes foram obtidos por Erlandson et al. (2010), ao transferir lagartas de *M. configurata* de *B. napus* para dieta artificial controle. Mahajan et al. (2013), estudando o efeito que o inibidor de peptidase multi-domínio de *Capsicum annuum* causa em *H. armigera*, constatou que primeiro há uma inicial indução dos genes de tripsinas e quimotripsinas, seguida por uma gradual estabilização desses genes. Assim, com os resultados obtidos até o momento, parece que o mecanismo de adaptação das tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda*, aos inibidores de endopeptidases de soja, é composto por um mecanismo de *shotgun* seguido de um mecanismo de retroalimentação. Por tanto, primeiro ocorre um aumento na quantidade dos transcritos dos genes, *shotgun*, até que sejam atingidos níveis suficientes de serina endopeptidases no intestino da lagarta. Uma parte dos genes induzidos ficaria responsável pela digestão das proteínas ingeridas pelo inseto, e a outra parte, tentaria inativar ou até mesmo degradar o inibidor. Quando há níveis suficientes de serina endopeptidases no intestino da lagarta, então entra o mecanismo de retroalimentação desses genes, pois não há mais necessidade de grandes quantidades de transcritos.

5.4 Mecanismo temporalmente regulado na expressão dos genes

Os mecanismos de resposta de *S. frugiperda*, a exposição aguda e crônica aos inibidores de endopeptidases de soja, evidenciaram um padrão de expressão distinto. Na exposição aguda, um pequeno conjunto de genes é ativado (Figuras 12 e 13). No entanto, quando a exposição aos inibidores é prolongada, ensaio crônico, há uma maior amplitude na expressão gênica (Figuras 6 e 7).

Comparando a expressão dos genes de serina peptidases estudadas, entre exposição aguda e crônica aos inibidores, é possível notar que há um mecanismo de regulação temporal dos mesmos. Para os genes de tripsinas estudados, os que responderam inicialmente aos inibidores de endopeptidases de soja foram SfTry6,

SfTry8, SfTry10 e SfTry11. Destes, a tripsina 11, apresenta apenas resposta inicial ao inibidor. Quando as lagartas foram submetidas ao efeito crônico dos inibidores, ela não foi responsiva. As tripsinas 6, 8, e 10 responderam tanto inicialmente quanto tardiamente ao inibidor. Já a SfTry12, apresentou apenas resposta tardia aos inibidores adicionados a dieta.

Já para as quimotripsinas analisadas, as SfChys 5, 9, 19 e 22 foram os primeiros genes que responderam ao inibidor. Destes, apenas a SfChy19 não apresentou resposta tardia aos inibidores de endopeptidases de soja.

Segundo Mahajan et al. (2013), analisando o efeito do inibidor multidomínio Pin-II, verificaram que há uma plasticidade na expressão dos genes de proteases em *H. armigera*. Este resultado é semelhante ao encontrado neste trabalho. No entanto, quando são analisados os resultados obtidos em curto período de tempo (horas), com um tempo maior (dias), os resultados encontrados pelos autores, são os opostos aos que foram verificados neste estudo. *H. armigera*, a qual também pertence à família Noctuidae, ativa um grupo maior de genes, poucas horas após a exposição ao inibidor de peptidase analisado. Em contraste, *S. frugiperda*, como discutido anteriormente, tem uma amplitude maior de expressão após um longo período de exposição aos inibidores. Contudo, os inibidores analisados não são os mesmos, e por isso, podem estar causando diferentes mecanismos de resposta.

Barillas-Mur, Noriega e Wells (1995) também verificaram tripsinas que respondiam inicialmente e outras que apresentavam apenas uma resposta tardia. Neste estudo, os autores investigaram em *Aedes aegypt* (Diptera, Culucidae), os efeitos da liberação de aminoácidos e outros produtos liberados durante a digestão. Eles concluíram que a atividade proteolítica de enzimas digestivas é parte do sistema de transdução do sinal, o qual regula expressão de genes secundários de tripsinas. Com os dados obtidos neste trabalho, não há como afirmar que os genes que responderam primeiramente aos inibidores, sejam responsáveis pela ativação dos genes com resposta tardia. Outros experimentos, como por exemplo, o silenciamento dos genes primários, são necessários para confirmar tal constatação. Com os dados obtidos até o momento, é possível afirmar que há um mecanismo de resposta de *S. frugiperda* aos inibidores de peptidases de soja, o qual é temporalmente regulado.

5.5 Controle epigenético dos genes de tripsinas e quimotripsinas

Uma questão relevante é compreender se o mecanismo adaptativo dos genes aqui estudados é mantido por um controle epigenético. É interessante ressaltar que este foi o primeiro estudo que caracterizou a expressão gênica de serina endopeptidases, em duas gerações seguidas de insetos, sob ingestão crônica de inibidores de peptidases. Segundo Hunt et al. (2013), a herança epigenética desempenha um importante papel na regulação gênica. Assim, a hipótese proposta era de que insetos expostos à presença do inibidores de endopeptidases de soja, manteriam elevada expressão dos genes que codificam as endopeptidases nas gerações seguintes, mesmo na ausência do agente estressor.

A partir das análises de expressão relativa dos genes de tripsinas, não houve nenhum gene que fosse expresso de maneira similar ou mais intensa que na primeira geração (Figura 16). Dos 23 genes de serina endopeptidases analisados, três genes de quimotripsinas aparentam ter controle epigenético, SfChy5, SfChy15 e SfChy17 (Figuras 17 e 18). Essa baixa quantidade de genes com suposto controle epigenético está de acordo com a porcentagem de metilação do genoma de outros insetos. Exceto para *Mamestra brassicae*, a qual tem 9 % do seu genoma metilado (MANDRIOLI; VOLPI, 2003). Nos demais insetos estudados até o momento, também foi observada baixa porcentagem de metilação no genoma, como é o caso de *Drosophila* jovem 0,3 % (LYKO; RAMSAHOYE; JAENISCH, 2000), 0,2 % em *Bombyx mori* (XIANG et al., 2010) e 0,7 % em *A. mellifera* (WANG et al., 2006; FORET et al., 2009).

Contudo, os dados obtidos apenas fornecem indícios da ocorrência de um controle epigenético, na adaptação dos genes de serina endopeptidases de *S. Frugiperda*, quando considerando os inibidores de endopeptidases de soja. Logo novas análises devem ser realizadas para confirmar esses dados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Ocorreu uma resposta diferenciada na ativação dos genes, dividindo-os em dois grupos: um responsivo ao inibidor de peptidase de soja e outro não responsivo;
- ✓ Os resultados da exposição aguda e crônica revelaram uma possível resposta temporalmente regulada dos genes estudados;
- ✓ Há um mecanismo de *shotgun* na adaptação das tripsinas e quimotripsinas de *S. Frugiperda*, a ingestão crônica dos inibidores de endopeptidases de soja.
- ✓ Após o mecanismo de *shotgun*, ocorre um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) na expressão relativa dos genes de tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda*.
- ✓ Os genes de tripsinas foram divididos em dois grupos, tanto pela a sua sensibilidade aos inibidores de endopeptidases de soja, quanto para seu padrão de expressão relativa.
- ✓ Evidências indicam que três genes de quimotripsinas (SfChy5, Sfchy15 e SfChy17) apresentam um controle epigenético.

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A.; VIRGÓS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILÉS, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant endopeptidase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 57, p. 189-202, 2005.
- ALFONSO, J.; ORTEGO, F.; SANCHEZ-MONGE, R.; GARCIA-CASADO, G.; PUJOL, M.; CASTANERA, P.; SALCEDO, G. Wheat and barley inhibitors active towards α -amylase and trypsin-like activities from *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 7, p. 1729-1741, 1997.
- BARILLAS-MURY, C.V.; NORIEGA, F.G.; WELLS, M.A. Early Trypsin Activity is Part of the Signal Transduction System that Activates Transcription of the Late Trypsin Gene in the Midgut of the Mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, n.2, v. 25, p. 241-246, 1995.
- BIRK, Y; GERTLER, A; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soybean. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, n. 87, p. 281-284, 1963.
- BODE, R.F.; HALITSCHKE, R.; KESSLER, A. Herbivore damage-induced production and specific anti-digestive function of serine and cysteine peptidase inhibitors in tall goldenrod, *Solidago altissima* L. (Asteraceae). **Planta**, Berlin, n. 5, p. 1287-1296, 2013.
- BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. **Photochemistry**, New York, v. 34, p. 1453–1466, 1993.
- BOWMAN, D.E. Differentiation of soybean antitryptic factor. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 63, p. 547-550, 1946.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor sensitive and insensitive peptidase genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, p. 625-638, 1997.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Regulation of expression of genes encoding digestive peptidases in the gut of a polyphagous lepidoptera larva in response to dietary peptidase inhibitors. **Physiological Entomology**, London, v. 29, p. 278-290, 2004.
- BRIOSCHI, D.; NADALINI, L.D.; BENGTSON, M.H.; SOGAYAR M.C.; MOURA D.S.; SILVA-FILHO, M.C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean endopeptidase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.
- BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to endopeptidase inhibitors may be mediated by the synthesis of new endopeptidase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 128B, p. 365-75, 2001.
- BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant endopeptidase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, p. 107-116, 1995.

_____. Dietary endopeptidase inhibitors alter complement of midgut peptidases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 32, p. 39-53, 1996.

BROEHAN, G.; KEMPER, M.; DRIEMEIER, D.; VOGELPOHL, I.; MERZENDORFER, H. Cloning and expression analysis of midgut chymotrypsin-like endopeptidases in the tobacco hornworm. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, p. 1243-1252, 2008.

BUSTIN, A.S.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CELORIO-MANCERA, M.O.; COURTIADÉ, T.; MUCK, A.; HECKEL, D.G.; RICHARD, O.; MUSSER, R.O.; VOGÉ, H. Sialome of a generalist lepidopteran herbivore: identification of transcripts and proteins from *Helicoverpa armigera* labial salivary glands. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 6, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0026676>>. Acesso em: 02 jul. 2013.

CHOUGULE, N.P.; GIRI, A.P.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, p. 355-367, 2005.

CHRISTELLER, J.T.; FARLEY, P.C.; RAMSAY, R.J.; SULLIVAN, P.A.; LAING, W.A. Purification, characterization and cloning of an aspartic endopeptidase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 254, p. 160-167, 1998.

CHUNG, S.H.; FELTON, G.W. Specificity of induced resistance in tomato against specialist Lepidopteran and Coleopteran species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 37, p. 378-386, 2011.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide *Trichogramma pretiosum***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 98).

CRUZ, I.; VIANNA, P.A.; WAQUIL, J.M. **Manejo das pragas iniciais de milho: o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 1999. 39 p. (Circular Técnica, 31).

CRUZ, I.; WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; VALICENTE, F.H. Pragas: diagnóstico e controle. In: COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. **Pragas da cultura do milho em condições de campo: métodos de controle e manuseio de defensivos**. Piracicaba: POTAFOS, 1995. cap. 2, p. 10-14. (Arquivo do Agrônomo, 2).

CUI, J.; LUO, J.; WERF, W.V.D.; MA, Y.; XIA, J. Effect of pyramiding Bt and Cpti genes on resistance of cotton to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 104, n. 2, p. 673-684, 2011.

DAMLE, M.S.; GIRI, A.P.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S. Higher accumulation of endopeptidase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree). **Phytochemistry**, New York, v. 6, p. 2659-2667, 2005.

DE LEO, F.; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 489-496, 2002.

DE LEO, F.; BONADE-BOTTINO, M.A.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin endopeptidase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology**, Belmont, v. 118, p. 997-1004, 1998.

DUNSE, K.M.; KAAS, Q.; GUARINO, R.F.; BARTON, P.A.; CRAIK, D.J.; ANDERSON, M.A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II endopeptidase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15016-15021, 2010a.

DUNSE, K.M.; STEVENS, J.A.; LAY, F.T.; GASPAR, Y.M.; HEATH R.L.; ANDERSON M.A. Coexpression of potato type I and II endopeptidase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15011-15015, 2010b.

ELANGO, N.; HUNT, B.G.; GOODISMAN, M.A.D. AND YI, S.V. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 11206–11211, 2009.

ERLANDSON, M.A.; HEGEDUS, D.D.; BALDWIN D.; NOAKES, A.; TOPRAK U. Characterization of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larval midgut peptidase complement and adaptation to feeding on artificial diet, *Brassica* species, and peptidase inhibitor. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 75, n. 2, p.70–91, 2010.

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

FARMER, E.E.; JOHNSON, R.R.; RYAN, C.A. Regulation of expression of endopeptidase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid, **Plant Physiology**, Belmont, v. 98, p. 995-1002, 1992.

- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, New York, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FIELD, L.M.; LYKO, F.; MANDRIOLI, M.; PRANTERA G. DNA methylation in insects. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 109-115, 2004.
- FORET, S.; KUCHARSKI, R.; PITTELKOW, Y.; LOCKETT, G.A.; MALESZKA, R. Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 472-483, 2009.
- FORET, S.; KUCHARSKI, R.; PELLEGRINI, M.; FENG, S.; JACOBSEN, S.E.; ROBINSON, G.E.; MALESZKA, R. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, p. 4968-4973, 2012.
- FRANCO, O.L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J.A.N.; MENDES, A.C.M.; ARAÚJO, M. A.M.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FREITAS, S.M. Effects of blackeyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63, p. 343-349, 2003.
- FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; MAGALHAES, C.P.; MONTEIRO, A.C.S.; BLOCHJR, C.; MELO, F.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DESA, M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 81-89, 2004.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GATEHOUSE, A.M.L.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBE, S.M.; NEWELL, C.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*, effects of plant peptidase inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 45, p. 545-558, 1999.
- GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM -DELÈGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to endopeptidase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 229-237, 1998.
- GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive endopeptidase inhibitors can be inactivated by pod borer gut endopeptidases. **Plant Physiology**, Belmont, v. 116, p. 393-401, 1998.
- GLASTAD, K.M.; HUNT, B.G.; GOODISMAN, M.A.D. Evidence of a conserved functional role for DNA methylation in termites. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 143-154, 2013.

GLASTAD, K.M.; HUNT, B.G.; YI, S.V.; GOODISMAN, M.A.D. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 20, p. 553-565, 2011.

GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound induced endopeptidase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, Washington, v. 175, p. 776-777, 1972.

HARTL, M.; GIRI, A.; KAUR, H.; BALDWIN, I.T. Serine peptidase inhibitors specifically defend *Solanum nigrum* against generalist herbivores but do not influence plant growth and development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 4158-4175, 2010.

HE, W.Y.; ZHENG, Y.P.; TANG, L.; ZHENG, S.C.; BELIVEAU, C.; DOUCET, D., CUSSON, M.; FENG, Q.L. Cloning, expression and localization of a trypsin-like serine peptidase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Insect Science**, Victoria, v. 16, p. 455-464, 2009.

HERB, B.R.; WOLSCHIN, F.; HANSEN, F.D.; ARYEE, J.K.; LANGMEAD, B.; IRIZARRY, R.; AMDAM, G.V.; FEINBERG, A.P. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. **Nature Neuroscience**, New York, v. 15, n. 10, p. 1371-1375, 2012.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOUTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v. 333, p. 160-163, 1987.

HUNT, B.G.; BRISSON, J.A.; YI, S.V.; GOODISMAN, M.A.D. Functional conservation of DNA methylation in the pea aphid and the honeybee. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 2, p. 719-728, 2010.

_____. Patterning and regulatory associations of DNA methylation are mirrored by histone modifications in insects. **Genome Biology Evolution**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 591-598, 2013.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 245-254, 2003.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant peptidase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, p. 885-895, 1997.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant peptidase inhibitors by induction of gut endopeptidase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p. 8041-8045, 1995.

KANOST, M.R.; JIANG, H.; YU, X. Innate immune responses of a lepidopteran insect *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, p. 97–105, 2004.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of peptidase inhibitors and plant defense. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 2, p. 379-384, 1997.

LEE, M.J.; ANSTEE, J.H. Endopeptidases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, p. 49-61, 1995.

LI, Q.; LIAN, J.; MUTTI, N.S.; JIN, L.; ZHAO, H.; ZHANG, P.; WEN, P.; XIANG, H.; DING, Y.; JIN, P.; SHEN, S.S.; WANG, Z.; WANG, W.; WANG, J.; BERGER, S.L.; LIEBIG, J.; ZHANG, G.; REINBERG, D. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. **Current Biology**, London, n. 22, p. 1755-1764, 2012.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; BRETSCHKE, R.A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. **Molecular cell biology**. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 2012. 1152 p.

LOMATE, P.R.; HIVRALE, V.K. Wound and methyl jasmonate induced pigeon pea defensive endopeptidase inhibitor has potency to inhibit insect digestive endopeptidases. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 57, p. 193-199, 2012.

LOPES, A.R.; SATO, P.M.; TERRA, W.R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone specificity relative to possible coevolution adaptation of insects and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 70, n. 3 p. 188-1203, 2009.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Coevolution of insect trypsin and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 55, p. 140-152, 2004.

LYKO, F.; RAMSAHOYE, B.H.; JAENISCH, R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, London, v. 480, p. 538-540, 2000.

LWALABA, D.; HOFFMANN, K.H.; WOODRING J. Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 73, p.14-29, 2010.

LWALABA, D.; WEIDLICH, S.; HOFFMANN, K.H.; WOODRING, J. Exogenous and endogenous peptidase inhibitors in the gut of the fall armyworm larvae, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 74, n. 2, p. 114-126, 2010.

LYKO, F.; MALESZKA, R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 27, p. 127-131, 2011.

LYKO, F.; FORET, S.; KUCHARSKI, R.; WOLF, S.; FALCKENHAYN, C.; MALESZKA, R. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. **PloS biology**, San Francisco, v. 11, 2010. Disponível em: <<http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000506>> Acesso em: 01 jul. 2013.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C.F.R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 158, p. 164-172, 2011.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; CABRINI, E.C.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest peptidases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1621, p. 170-182, 2003.

MAHAJAN, N.S.; MISHRA, M.; TAMHANE, V.A.; GUPTA V.S.; GIRI, A.P. Plasticity of peptidase gene expression in *Helicoverpa armigera* upon exposure to multi-domain *Capsicum annuum* peptidase inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1830, p. 3414–3420, 2013.

MANDRIOLI, M.; VOLPI, N. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. **Genetica**, Amsterdam, v. 119, p. 187-191, 2003.

MARGAM, V.M.; COATES, B.S.; BAYLES, D.O.; HELLMICH, R.L.; AGUNBIADE, T.; SEUFFERHELD, M.J.; SUN, W.; KROEMER, J.A.; BA, M.N.; BINSO-DABIRE, C.L.; BAOUA, I.; ISHIYAKU, M.F.; COVAS, F.G.; SRINIVASAN, R.; ARMSTRONG, J.; MURDOCK, L.L.; PITTENDRIGH, B.R. Transcriptome sequencing, and rapid development and application of snp markers for the legume pod borer *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0021388>> Acesso em: 02 jul. 2013.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 633-644, 2001.

MIHSFELDT, L.H.; PARRA, J.R.P. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) em dieta artificial. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 769-776, 1999.

MOURA, D.S.; RYAN, C.A. Wound-inducible endopeptidase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 289-298, 2001.

MURDOCK, L.L.; SHADE, R.E. Lectins and peptidase inhibitors as plant defense against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 660-661, 2002.

NADALINI, L.C.P. **Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de endopeptidase de plantas**. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press, 2000. 333 p.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-COFFEE. A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk endopeptidase inhibitor. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 4, p. 697-715, 1973.

OLIVEIRA, C.F.R.; SOUZA, T.P.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M.C.; MACEDO, M.L.R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 65, n.1, p. 19-25, 2013.

OLIVEIRA, C.F.R.; VASCONCELOS, I.M.; APARICIO, R.; FREIRE, M.D.G.M.; BALDASSO, P.A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, Barking, v. 47, p. 929-935, 2012.

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

PARK, J.; PENG, Z.; ZENG, J.; ELANGO, N.; PARK, T.; WHEELER, D. Comparative analyses of DNA methylation and sequence evolution using *Nasonia* genomes. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 28, p. 3345-3354, 2011.

PARRA, J.R.P.; MISHFELDT, L.J. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder: Westview Press, 1992.

PATEL, C.V.; GOPINATHAN, K.P. Determination of trace amounts of 5-methylcytosine in DNA by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Annals of Biochemistry**, London, v. 164, p. 164-169, 1987.

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 defense. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 61-75, 2010.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean endopeptidase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, p. 892-896, 2000.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean endopeptidase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

PRASAD, E.; MERZENDORFER, H.; MADHURAREKHA, C.; GUPTA, A.D.; PADMASREE, K. Bowman-Birk endopeptidase inhibitor from *Cajanus cajan* seeds: purification, characterization, and insecticidal properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 2838–2847, 2010.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA N.S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk endopeptidase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, Amsterdam, v. 263, p. 189-198, 2001.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, p. 62–66, 2003.

ROY, I.; GUPTA, M.N. Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/endopeptidase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, Boston, v. 9, p. 239-245, 2000.

RYAN, C. Peptidase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SILVA, W.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; MACEDO M.L.R. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed endopeptidase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry**, London, v. 47, p. 257-263, 2012.

SIMÕES, R.A.; SILVA-FILHO, M.C.; MOURA, D.S.; DELALIBERA, I. JR. Effects of soybean endopeptidase inhibitors on development of the soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 44, p. 239-248, 2008.

SINHA, D.K.; LAKSHMI, M.; ANURADHA, G.; RAHMAN, S.J.; SIDDIQ, E.A.; BENTUR, J.S.; NAIR, S. Serine peptidases-like genes in the Asian rice gall midge show differential expression in compatible and incompatible interactions with rice. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 12, p. 2842-2852, 2011.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; GATEHOUSE, J.A.; GUPTA, V.S. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 57, p. 359-374, 2005.

SRINIVASAN, T.; KUMAR, K.R.R.; KIRTI, P.B. Constitutive expression of a trypsin peptidase inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco plant. **Cell Physiology**, New York, v. 50, n. 3, p. 541-553, 2009.

STEPPUHN, A.; BALDWIN, I.T. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant peptidase inhibitors. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, p. 499-511, 2007.

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**, Chicago, v. 8, p. 2731-2739, 2011.

TELANG, M.A.; GIRI, A.P.; PYATI, P.S.; GUPTA, V.S.; TEGEDER, M.; FRANCESCHIV, R. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. **Gene**, Amsterdam, v. 431, p. 80-85, 2009.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 109B, p. 1-62, 1994.

_____. Biochemistry of digestion. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 4, p. 171-224.

TIFFIN, P.; GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine peptidase inhibitor wip1 in *Zea* and related genera. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 18, n. 11, p. 2092-2101, 2001.

VOLPICELLA, M.; CORDEWENER, J.; JONGSMA, M.A.; GALLERANI, R.; CECI, L.R.; BEEKWILDER, J. Identification and characterization of digestive serine peptidases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 833, p. 26-32, 2006.

VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to endopeptidase inhibitors. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 270, p. 10-19, 2003.

WANG, Y.; JORDA, M.; JONES, P.L.; MALESZKA, R.; LING, X.; ROBERTSON, H.M.; MIZZEN, A.; PEINADO, M.A.; ROBINSON, G.E. Functional CpG methylation system in a social insect. **Science**, Washington, v. 314, p. 645-647, 2006.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews. Genetic**, London, v. 10, p. 57-63, 2009.

WU, Y.R.; LLEWELLY, D.; MATHEWS, A.; DENNIS, E.S. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to an endopeptidase inhibitor expressed in transgenic tobacco. **Molecular Breeding**, Boston, v. 3, p. 371-380, 1997.

XIANG, H.; ZHU, J.; CHEN, Q.; DAI, F.; LI, X.; LI, M.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; LI, D.; DONG, Y.; ZHAO, L.; LIN, Y.; CHENG, D.; YU, J.; SUN, J.; ZHOU, X.; MA, K.; HE, Y.; ZHAO, Y.; GUO, S.; YE, M.; GUO, G.; LI, Y.; LI, R.; ZHANG, X.; MA, L.; KRISTIANSEN, K.; GUO, Q.; JIANG, J.; BECK, S.; XIA, Q.; WANG, W.; WANG, J. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, p. 516-520, 2010.

XIE, W.; LEI, Y.; FU, W.; YANG, Z.; ZHU, X.; GUO, Z.; WU, Q.; WANG, S.; XU, B.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Tissue-specific transcriptome profiling of *Plutella Xylostella* third instar larval midgut. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 8, p. 1142-1155, 2012.

- 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**, San Francisco, v. 8, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0043769>> Acesso em: 02 jul. 2013.
- ZAVALA, J.A.; PATANKAR, A.G.; GAS, K.; HUI, D.Q.; BALDWIN, I.T. Manipulation of endogenous trypsin endopeptidase inhibitor production in *Nicotiana attenuate* demonstrates their function as anti-herbivore defenses. **Plant Physiology**, Belmont, v. 134, p. 1181–90, 2004.
- ZEMACH, A.; MCDANIEL, I.E.; SILVA, P.; ZILBERMAN, D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. **Science**, Washington, v. 328, p. 916-919, 2010.
- ZENG, J.; YI, S.V. DNA methylation and genome evolution in honeybee: gene length, expression, functional enrichment covary with the evolutionary signature of DNA methylation. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 2, p. 770-780, 2010.
- ZHAO, J.Z.; FAN, Y.L.; FAN, X.L.; SHI, X.P.; LU, M.G. Evaluation of transgenic tobacco expressing two insecticidal genes to delay resistance development of *Helicoverpa armigera*. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 44, p. 1871-1874, 1999.
- ZHU, Y.C.; ABEL, C.A.; CHEN, M.S. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and endopeptidase inhibitors on the growth, development, and midgut endopeptidase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, New York, v. 87, p. 39-46, 2007.
- ZHU, Y.C.; WEST, S.; LIU, F.X.; HE, Y. Interaction of endopeptidase inhibitors with Cry1Ac toxicity and the presence of 15 chymotrypsin cDNAs in the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, p. 692-701, 2012.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.A.; SHADE, R.E.; AHN, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine peptidase inhibitor. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 135-145, 2003.