

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

**Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos  
inibidores de proteinase de plantas**

**Larissa Cristina Deppmann Nadalini**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em agronomia. Área de concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba  
2007**

**Larissa Cristina Deppmann Nadalini**

**Bióloga**

**Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de  
proteínase de plantas**

**Orientador:**

**Dr. Daniel Scherer de Moura**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre  
em agronomia. Área de concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba  
2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Nadalini, Larissa Cristina Deppmann

Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de  
proteínase de plantas / Larissa Cristina Deppmann Nadalini. - - Piracicaba, 2007.  
58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Inibidores de enzimas 2. Insetos nocivos 3. Lagartas 4. Plantas 5. Proteínases  
I. Título

CDD 632.78

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

**AOS MEUS PAIS IVETE E VALTER,  
POR TODO O INCENTIVO, AMOR,  
E PACIÊNCIA**

**DEDICO**

**AOS MEUS FAMILIARES E AMIGOS  
PELO APOIO E NOVOS APRENDIZADO**

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Daniel Scherer de Moura, pela indispensável orientação, apoio, incentivo, amizade e paciência durante a execução desta pesquisa;

Ao Prof. Marcio de Castro Silva Filho, pela oportunidade, apoio e orientação durante a realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas Figueira, do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA-USP, pelo uso do equipamento de PCR em tempo real;

Ao Prof. Dr. José Roberto P. Parra, pelo apoio laboratorial com o fornecimento dos insetos e do material da dieta;

À Sra. Neide Graciano Zério, técnica do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, por todo auxílio e boa vontade durante o preparo das dietas artificiais e ajuda na identificação dos instares das larvas;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

Aos funcionários e professores do Departamento de Genética da ESALQ-USP, pela ajuda e atenção durante a realização da pesquisa.

Aos colegas de disciplinas e de departamento pelo companheirismo, auxílio e incentivo durante a realização dessa dissertação.

Aos técnicos, Carlos Alberto de Oliveira e Rafael Colombi, ambos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela amizade, carinho e apoio;

A todas as novas amigadas que fiz em Piracicaba, pelos bons e maus momentos que passamos durante o período da execução da pesquisa;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela convivência, amizade, apoio, ensinamentos e incentivo em todos os momentos, sendo indispensáveis na execução da pesquisa. Em especial à Ane, Camila, Christine, Juliana, Luis, Joze e Celso.

À Kátia Fernanda Claudino, pela amizade, convivência e ajuda na extração dos inibidores de batata.

A todos os amigos que acompanharam os momentos noturnos nos laboratórios durante a realização do trabalho;

À Camila Borgonove Motta e André Raposo pelo inestimável acolhimento, apoio emotivo e material, convivência, amizade e incentivo.

Ao funcionário Fernando do Departamento de Genética, pelas trufas energéticas.

Às amigas de moradia, pela paz no convívio, amizade, aprendizagem, incentivo, paciência, em especial a Camila e Helen pelas confissões e incentivos incansáveis nos momentos difíceis.

À minha madrinha Ivone pelo valoroso apoio, carinho e dedicação.

Aos meus pais, pelo vital apoio, dedicação, estímulo, carinho e orações em todas as etapas da pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ-USP, pelos auxílios prestados.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Inibidores de proteinases vegetais.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases de plantas.....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Obtenção e caracterização dos inibidores de proteinase.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. Extração dos inibidores de proteinase de soja (IPS).....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Extração dos inibidores de proteinase de batata (IPB).....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Ensaio enzimático.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3.1 Tripsina .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3.2 Quimotripsina .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.4 Estimativa da concentração dos inibidores.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Atividade das proteinases das larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1 Criação das larvas .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2 Extração dos intestinos e obtenção das enzimas digestivas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.3 Ensaio enzimático de inibição das proteinases digestivas.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Análise da expressão das proteinases com PCR em tempo real .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.1 Criação das larvas.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2 Extração de RNA e obtenção de cDNA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.3 PCR em tempo real.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.4 Análise dos dados.....</b>	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Caracterização dos extratos contendo inibidores de proteinase.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1 Inibidores de proteinase de soja (IPS).....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.2 Inibidores de proteinase de batata (IPB).....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Atividade das proteinases intestinais das larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1 Ensaio enzimático de inibição com IPS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.2 Ensaio enzimático de inibição com IPB.....</b>	<b>28</b>

<b>4.3 Expressão gênica das proteinases digestivas de <i>Spodoptera frugiperda</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.1 Ingestão crônica do inibidor a partir do 3° instar.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.1.1 Expressão relativa dos genes de tripsinas.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.1.2 Expressão relativa dos genes de quimotripsinas.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2 Ingestão crônica do inibidor a partir da eclosão das larvas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2.1 Expressão relativa dos genes de tripsinas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2.2 Expressão relativa dos genes de quimotripsinas.....</b>	<b>42</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>



## Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de proteinase de plantas

### RESUMO

A existência de uma família gênica diversa de serino proteinases em Lepidóptera sugere que essas proteinases desempenham um papel importante na adaptação desses insetos à presença de inibidores de proteinases vegetais. Essas enzimas têm se revelado estarem envolvidas no processo digestivo de larvas de insetos. Larvas de *Spodoptera frugiperda* foram alimentadas com uma dieta suplementada com inibidor de proteinase de soja (IPS) e a expressão gênica de proteinases intestinais foi avaliada através de PCR em tempo real. Análises de transcrição anteriores mostraram a existência de dois grupos de serino proteinases: um grupo de genes constitutivamente expressos em larvas controle que é induzido pela dieta contendo IPS e um segundo grupo que está ausente no controle, mas que é também induzido por uma dieta rica em IPS. No presente trabalho foi observado um terceiro grupo de proteinases que não são nem induzidas nem reprimidas pela presença do IPS na dieta. Essa observação sugere que a adaptação de *S. frugiperda* ao IPS envolve a síntese de novas proteinases, a indução de enzimas preexistentes e ainda um terceiro grupo insensível à presença dos inibidores. Proteinases dos intestinos de larvas crescidas em dieta com IPS mostraram insensibilidade ao inibidor. As proteinases também foram insensíveis quando a atividade foi verificada com um inibidor de proteinases de amplo espectro. Os resultados aqui apresentados propõem que a adaptação de *S. frugiperda* ao IPS segue uma estratégia generalizada, baseada na indução geral de um grande grupo de endoproteinases.

Palavras-chave: Inibidores de proteinase; Adaptação dos insetos; Serino proteinases; *Spodoptera frugiperda*

## **Characterization of the adaptive mechanism of *Spodoptera frugiperda* to plant proteinase inhibitors.**

### **ABSTRACT**

The existence of a diverse serine proteinase gene family in lepidopteran insects has suggested its significant role in the insect adaptation to plant proteinase inhibitors. These enzymes have been shown to be involved in the proteolytic digestion process of insect larvae. *Spodoptera frugiperda* larvae were fed on a diet supplemented with soybean proteinase inhibitor (SPI) and the gene expression of intestinal proteinases was evaluated by real time PCR. Previous transcription analyses found two groups of intestinal serine proteinases: one group of genes constitutively expressed in the control larvae that is induced by the SPI-containing diet during the experiment, and a second group that is absent in the control but also induced by the SPI rich diet. Herein was observed a third group of proteinases that are neither induced nor repressed by the presence of SPI in the diet. This observation suggests that adaptation of *S. frugiperda* to SPI involves *de novo* synthesis, up regulation of existing enzymes and that there is a third group insensitive to the presence of the inhibitors. Proteinases from intestines of larvae reared on a diet with SPI showed insensitivity to the inhibitor. The proteinases were also insensitive when the activity was checked with a broad-spectrum potato proteinase inhibitor. The results here presented propose that adaptation of *S. frugiperda* to SPI follows a “shotgun” approach, based on a general up regulation of a large set of endoproteinases.

**Keywords:** Proteinase inhibitors; Insect adaptation; Serine proteinase; *Spodoptera frugiperda*

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as plantas têm se defendido do ataque de insetos e de outros organismos através de inúmeros mecanismos, entre os quais destacam-se a síntese e o acúmulo de proteínas de defesa tais como os inibidores de proteinases (RYAN, 1990). Desde a descoberta dos inibidores de proteinases como agentes de defesa vegetal, inúmeras tentativas têm sido feitas para a sua utilização no melhoramento vegetal. Um dos problemas do uso dessas proteínas para a proteção de plantas cultivadas é que alguns insetos-praga adaptam-se rapidamente a presença dos inibidores em suas dietas, não mostrando os efeitos adversos como retardo no desenvolvimento e eventual morte (PURCELL et al., 1992). Os insetos podem se adaptar aos inibidores de diferentes formas. Pelo menos três estratégias de adaptação têm sido relatadas: o aumento da atividade e expressão dos genes das enzimas digestivas (BROADWAY; DUFFEY, 1986), a mudança no espectro das enzimas digestivas (JONGSMA et al., 1995; VOLPICELLA et al., 2003) e a produção de enzimas que hidrolisam os inibidores (MICHAUD; CANTIN; VRAIN, 1995).

A rápida adaptação a uma condição adversa tal como a presença de inibidores tem atraído o interesse de muitos pesquisadores, cujos objetivos vão desde o entendimento dos aspectos evolutivos e fisiológicos básicos, até o entendimento do mecanismo de adaptação visando a elaboração de uma melhor estratégia para utilização dos inibidores de proteinase como agentes de proteção.

*Spodoptera frugiperda* é um inseto polífago que causa perdas econômicas a inúmeros cultivos agrícolas (LEIDERMAN; SAUER, 1953; CRUZ et al., 1999). Esse inseto mostra-se capaz de adaptar-se a presença do inibidor de soja em sua dieta através de uma mudança no padrão de expressão de genes que codificam proteinases, principalmente serino-proteinases, servindo de organismo modelo em estudos dos mecanismos adaptativos (PAULILLO et al., 2000; BRIOSCHI, 2006). A presente pesquisa teve como objetivo maior o entendimento do processo adaptativo dos insetos a presença de inibidores de proteinases em suas dietas. O modelo utilizado é a *Spodoptera frugiperda* exposta à presença do inibidor de proteinase presente em sementes de soja. O objetivo específico é esclarecer o papel das serino proteinases, tripsinas e quimotripsinas, no processo adaptativo descrito acima.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Inibidores de proteinases vegetais

Os inibidores de proteinases são uma das mais abundantes classes de proteínas e são encontrados em praticamente todas as formas de vida existentes. O conhecimento da existência desses peptídeos/proteínas em plantas remonta a quase 70 anos (READ; HAAS 1938). Essas proteínas formam complexos com as proteinases e inibem sua atividade proteolítica. No reino vegetal, a maioria dos órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, contém altas concentrações desses inibidores (RYAN, 1989). Os inibidores exibem peso molecular abaixo de 50 kDa e são normalmente encontrados entre 5 e 25 kDa, muitas vezes formando dímeros ou tetrâmeros (LASKOWSKI; KATO, 1980). Várias revisões têm enfatizado que os inibidores de proteinases fazem parte de um arsenal de armas químicas para defender as plantas do ataque de herbívoros e também de microorganismos (RYAN, 1989, RYAN, 1990, HAQ; ATIF; KHAN, 2004).

Devido a grande diversidade e abundância dos inibidores na natureza, adota-se um complexo sistema de classificação de acordo com a proteinase inibida, da homologia entre as estruturas primárias e terciárias e também do aspecto evolutivo. Os inibidores são classificados em: 1) inibidores de serino proteinases: família Kunitz (inibidora de tripsina); família Bowman-Birk (inibidora tanto de tripsina como quimotripsina); família inibidores tipo I (específica para quimotripsina e subtilisina) e II (específica para tripsina como quimotripsina) de batata; família inibidores de tripsina de cevada; família inibidores *squash*; 2) inibidores de  $\alpha$  amilase: família de inibidores *Ragi 1-2/Maize bifunctional*; 3) família dos inibidores de carboxipeptidase A e B; 4) família dos inibidores de cisteína (cistatinas); e 5) família dos inibidores de aspartil proteinase; entre outras (RYAN, 1990). Uma classificação mais detalhada e extensa é apresentada no banco de dados MEROPS mantido pelo “Wellcome Trust Sanger Institute” (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004).

Diversas famílias de plantas possuem um grande e complexo grupo de inibidores de proteinases que atuam na defesa do vegetal. Essas proteínas estão presentes em diversas partes da planta como as folhas, os tubérculos e as sementes (MOSOLOV; VALUEVA, 2005). Membros das diversas famílias de inibidores têm sido estudados, entre eles, os inibidores de serino e cisteino proteinases têm grande destaque. No caso dos insetos da ordem Lepidóptera e Díptera, os inibidores de serino proteinases se mostraram mais eficientes (JONGSMA; BOLTER, 1997),

uma vez que esses insetos usam proteinases do tipo serina (tripsina, quimotripsina), para proteólise das proteínas ingeridas. Sivakumar; Mohan E Thayumanavan (2005) demonstraram que as proteinases dos insetos da ordem Lepidóptera, apresentam pH ótimo entre 8,5 a 10, os quais são ótimos para atividade desta classe de enzima. Em contrapartida, nas ordens hemíptera e coleóptera, os inibidores de cisteína proteinases se mostram mais eficientes, as quais têm importante papel na digestão das proteínas da alimentação (RYAN, 1990).

As pesquisas sobre os efeitos dos inibidores de proteinases de plantas sobre as proteinases digestivas dos insetos iniciaram por volta de 1950; sendo que seu envolvimento como agente protetor contra insetos recebeu forte suporte nos anos de 1960 a 1970 (RYAN, 1973).

Os inibidores de proteinase constituem uma das barreiras químicas de defesa da planta e atuam no intestino dos insetos herbívoros pela inibição da digestão de proteínas da planta ou devido à super produção de enzimas digestivas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para produção de outras proteínas (JONGSMA; BOLTER, 1997).

Experimentos *in vitro* com extratos intestinais de diferentes larvas e inibidores purificados mostram que os inibidores são eficientes se incorporados na dieta dos insetos (POMPERMAYER et al., 2001; FRANCO et al., 2003; POMPERMAYER et al., 2003).

Em contrapartida, outras pesquisas demonstram que o papel defensivo desses inibidores, embora seja eficiente em muitos experimentos, é apenas parte de uma complexa interação de adaptação entre plantas e insetos.

As plantas de soja apresentam os inibidores de proteinase distribuídos em duas classes: os inibidores Kunitz e Bowman-Birk. A primeira classe contém proteínas com peso molecular ao redor de 20kDa e ação dirigida predominantemente às enzimas tripsinas; na segunda classe as proteínas possuem de 6 a 10kDa e têm atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina. (LIENER, 1994). Em relação às plantas de batatas, os tubérculos são uma rica fonte de inibidores de tripsinas, quimotripsinas e carboxipeptidase (PEARCE et al., 1982).

## **2.2 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases de plantas**

Ao longo do tempo, os insetos têm desenvolvido diferentes estratégias de adaptação para contornar o efeito negativo dos inibidores de proteinase de plantas, sendo estas o maior obstáculo no manejo de pragas (MELLO; SILVA-FILHO, 2002; MOON, et.al., 2004).

Uma estratégia adaptativa é o aumento da atividade das enzimas digestivas após a ingestão do inibidor. Broadway; Duffey (1986) foram um dos primeiros pesquisadores a examinar os efeitos fisiológicos dos inibidores sobre as proteinases digestivas dos insetos. Nesse trabalho os autores estudaram larvas de *Helicoverpa zea* e *Spodoptera exigua* alimentadas em dieta artificial contendo inibidor de tripsina de soja e inibidor II de proteinase de batata e verificaram que após uma ingestão crônica do inibidor de tripsina de soja e inibidor II de proteinase de batata os insetos aumentaram o nível de atividade das tripsinas, umas das proteinases intestinais primárias, que participam de seu processo digestivo. Também Brito et al. (2001) estudando *Heliothis virescens* observaram que a resistência a inibidores de folhas de tabaco era fruto da expressão de novas moléculas de tripsinas.

Outra estratégia é através de enzimas hidrolíticas que fragmentam os inibidores. Michauld; Cantin E Vrain (1995) pesquisando a interação bioquímica entre as proteinases digestivas do coleóptera *Otiorynchus sulcatus* e dois inibidores de proteinase (Oryzacystatin I e II) verificaram que proteinases desses insetos foram capazes de clivar o inibidor oryzacystatin II gerando um composto intermediário instável que subsequente é totalmente hidrolisado.

Os insetos podem ainda sintetizar enzimas insensíveis ou menos sensíveis aos inibidores. Jongasma et al. (1995) estudando larvas de *Spodoptera exigua* cronicamente expostas à folhas de tabaco transgênicas expressando IPBII demonstraram que os insetos se adaptam a ingestão dos inibidores pela mudança do repertório das proteinases, induzindo 2,5 a 3 vezes a atividade das proteinases insensíveis. No mesmo ano Bolter; Jongasma avaliaram os efeitos da ingestão crônica de folhas de batata contendo altos níveis de inibidores em proteinase intestinais das larvas do coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (BOLTER; JONGSMA, 1995). Os resultados mostraram que a atividade geral das proteinases caiu 42% nas larvas alimentadas em plantas onde os inibidores foram induzidos. Em contrapartida houve uma indução de 2,5 vezes na atividade das enzimas insensíveis ao inibidor.

Paulillo et al. (2000), mostraram que após a ingestão crônica dos inibidores de proteinase de soja, as larvas de *Spodoptera frugiperda* eram capazes de se adaptar através da alteração das enzimas proteolíticas presentes em seus intestinos. Os resultados mostram a presença de nova atividade tríptica e um considerável aumento da atividade quimotríptica, as quais provavelmente são menos sensíveis ao inibidor. Também Lara et al. (2000) estudaram a adaptação das larvas de *Spodoptera exigua*, após serem alimentadas em plantas transgênicas de tabaco expressando altos

níveis de inibidores de tripsina de cevada. Pela pesquisa verificaram que os insetos se adaptaram compensando a redução de 25% na atividade das tripsinas pelo aumento da atividade de exopeptidases insensíveis específicas ao inibidor testado.

Volpicella et al. (2003) caracterizando as tripsinas presentes nos intestinos de larvas de *Helicoverpa zea* alimentadas com 0,5% de inibidor de tripsina de soja (SKTI), verificaram a presença de uma nova tripsina (Hz15) a qual, nos ensaios enzimáticos, se mostrou insensível aos inibidores testados (SKTI, Bowman Birk – SBBI, PI-2 inibidor de batata tipo II e MTI-2 inibidor de mostarda). Além disso, através da determinação da massa dos peptídios das diferentes isoformas de tripsina, os autores determinaram a seqüência de aminoácidos das enzimas sensíveis e insensíveis aos inibidores e verificaram a presença de 5 regiões que diferiam entre as isoformas e que sobrepunham com os resíduos de contato entre enzima e inibidor.

As estratégias adaptativas estão diretamente relacionadas à expressão dos genes que codificam as enzimas responsivas aos inibidores. Bown; Wilkinson e Gatehouse (2004) detectaram expressão diferencial nos genes de tripsina presentes nos intestinos de larvas do mesmo gênero (*Helicoverpa armigera*) alimentadas com inibidores SKTI e SBBI. Através de análises semiquantitativas com Northern blotting, os pesquisadores observaram que durante as oito primeiras horas de exposição há um aumento no nível das espécies de RNAm estudadas. Este padrão se mantém depois de 72h de exposição e o nível dos RNAs correspondentes à tripsinas insensíveis aumenta quase 3 vezes mais que o controle, enquanto que o da tripsina sensível retorna ao mesmo nível que o controle e depois decai 2 vezes. Paralelamente a isso, os ensaios enzimáticos de atividade da tripsina mostram alteração na quantidade e característica desta proteinase no decorrer do tempo que corroboram com as mudanças nas espécies de RNAm.

Brioschi (2006), estudando expressão gênica diferencial de larvas de *Spodoptera frugiperda* submetidas a dieta suplementada com inibidor de proteinase de soja, observou que 38% dos genes expressos diferencialmente estavam relacionados ao processo digestivo. Nesse estudo foram identificados dois grupos de proteinases diretamente envolvidos no processo de adaptação: um grupo preexistente e um grupo induzido. Ambos os grupos são formados por tripsinas e quimotripsinas. Foi observado também que as larvas de *S. frugiperda* adotam uma estratégia de aumento geral das proteinases intestinais, tanto as já presentes no intestino quanto as induzidas a partir do contato com o inibidor. Essa estratégia opõe-se a estratégia chamada de

seletiva, onde somente as proteinases intestinais insensíveis aos inibidores seriam induzidas e mantidas em alto nível de expressão.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética e no Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ambos pertencentes à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba/SP. As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Melhoramento de Plantas II, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Piracicaba/SP.

#### **3.1 Obtenção e caracterização dos inibidores de proteinase**

##### **3.1.1. Extração dos inibidores de proteinase de soja (IPS)**

Os inibidores de proteinase de soja (IPS) foram extraídos a partir de sementes da variedade IAC-8. As sementes foram homogeneizadas (100g) com auxílio de um liquidificador em solução salina (1L de NaCl 0,15M) durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em 8 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 o qual foi ajustado a 70% com acetona gelada, em condições de agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6000xg durante 20 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi liofilizado durante 72 horas para remoção da acetona residual, fornecendo um extrato semi-purificado de inibidores de soja. Os inibidores semi-purificados foram resuspendidos em água para uma concentração final de 1mg/mL.

##### **3.1.2 Extração dos inibidores de proteinase de batata (IPB)**

Os inibidores de proteinases foram extraídos de tubérculos de batata através do método proposto por Melville e Ryan (1972) com as seguintes alterações. Dois quilos de batatas com casca foram cortadas em pedaços e colocadas em bandejas de plástico contendo solução de ditionite de sódio (7g por litro). Os pedaços de batata foram então homogeneizados em liquidificador com cerca de 500ml de solução de ditionite de sódio. O produto da homogeneização (pasta) foi filtrado utilizando-se oito camadas de gaze e uma de tecido “miracloth”, com auxílio de uma prensa. O extrato obtido foi ajustado para pH 3,0 com HCL e centrifugado a 1000xg por 15 minutos a 5°C para precipitar as proteínas insolúveis. Ao sobrenadante claro foi adicionado vagarosamente 70% de sulfato de amônia sólido (472g/litro),

sob condições de agitação a 5°C. A mistura foi agitada por 1 hora, em seguida foi centrifugada a 6000 rpm durante 15 minutos a 5°C. O pellet resultante foi dissolvido em 87ml de solução de sulfato de amônia 70% e filtrado a temperatura ambiente através de papel filtro Whatman nº1, com auxílio de bomba de vácuo. O produto filtrado foi lavado com 43,5ml de solução de sulfato de amônia 70% para remover o ditonite de sódio residual. O precipitado foi dissolvido a temperatura ambiente em 87ml de água destilada sob condições de agitação por uma hora.

Após esta etapa a amostra foi aquecida em banho maria à 80°C por 5 minutos em condições de agitação. Posteriormente ao tratamento térmico, a amostra foi rapidamente esfriada no gelo e filtrada por sucção através de papel filtro Whatman nº1. O filtrado resultante foi liofilizado. O extrato liofilizado foi dissolvido em água destilada e dialisado contra água destilada por 48 horas, para remoção dos sais. O extrato semi-purificado de inibidores de batata utilizado nos ensaios foi obtido após a liofilização do produto da diálise. Os inibidores semi-purificados foram resuspendidos em água para uma concentração final de 1mg/mL.

### **3.1.3 Ensaios enzimáticos**

#### **3.1.3.1 Tripsina**

Os ensaios de inibição da tripsina foram feitos utilizando-se o espectrofotômetro da Molecular Devices (modelo SpectraMaxPlus) com o substrato p-tolueno-sulfonil-L-arginina metil ester – TAME (Sigma), de acordo com Hummel (1959). As leituras de absorbância para avaliação da atividade da tripsina foram feitas em cuvetas de quartzo de 3mL. A cuveta são adicionados 100µL de tripsina (15,4 µg/mL em 0,001N HCl), 2,6mL de tampão (0.046M Tris-HCL, pH 8,1 com 0.0115M CaCl<sub>2</sub>), até 100µL do extrato a ser avaliado e 0.3mL do substrato TAME (0.01M). Para preparação da solução de tripsina parte-se de uma solução concentrada de 1mg/ml de tripsina (Sigma) em 0.001M HCL. A confirmação da concentração da enzima é feita por absorbância a 280nm ( $\text{mg tripsina por mL} = \text{Abs}_{280} \times 0,70$ ). O espectrofotômetro é zerado com uma solução contendo todos os componentes do ensaio menos a tripsina e o extrato a ser avaliado. Para a tomada de medidas de inibição, o extrato contendo o inibidor, juntamente com a enzima e 200µL do tampão, foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, antes da adição do restante do tampão e do substrato. As leituras de absorbância (247 nm) foram feitas a cada 30 segundos durante os 4 minutos que sucederam a adição do substrato. Os valores obtidos de absorbância foram plotados em um gráfico de forma a obter o incremento da absorbância a

247nm ao longo dos 4 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes de forma a obter uma média dos incrementos. Para a obtenção da atividade total da tripsina é feito o mesmo ensaio sem a adição dos inibidores.

### 3.1.3.2 Quimotripsina

Os ensaios de inibição da quimotripsina foram feitos utilizando-se o espectrofotômetro da Molecular Devices (modelo SpectraMaxPlus) com o substrato benzoil-L-tirosina etil ester – BTEE (Sigma), de acordo com Hummel (1959). As leituras de absorbância para avaliação da atividade da quimotripsina foram feitas em cuvetas de quartzo de 3mL. A cuvetas são adicionados 100 $\mu$ L de quimotripsina (15,4  $\mu$ g/mL em 0,001N HCl), 1,5mL de tampão (0,08M Tris-HCL, pH 7,8 com 0,1M CaCl<sub>2</sub>), até 100 $\mu$ L do extrato a ser avaliado e 1,4mL do substrato BTEE (0,00107M). Para preparação da solução de quimotripsina parte-se de uma solução concentrada de 1mg/ml de quimotripsina (Sigma) em 0,001M HCL. A confirmação da concentração da enzima é feita por absorbância a 280nm (mg quimotripsina por mL = Abs<sub>280</sub> x 0,49). O espectrofotômetro é zerado com uma solução contendo todos os componentes do ensaio menos a enzima e o extrato a ser avaliado. Para a tomada de medidas de inibição, o extrato contendo o inibidor , juntamente com a enzima e 200 $\mu$ L do tampão, foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, antes da adição do restante do tampão e do substrato. As leituras de absorbância (256nm) foram feitas a cada 30 segundos durante os 4 minutos que sucederam a adição do substrato.. Os valores obtidos de absorbância foram plotados em um gráfico de forma a obter o incremento da absorbância a 256nm ao longo dos 4 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes de forma a obter uma média dos incrementos. Para a obtenção da atividade total da quimotripsina é feito o mesmo ensaio sem a adição dos inibidores.

### 3.1.4 Estimativa da concentração dos inibidores

A quantidade de inibidor presente nos extratos de soja e batata foi calculada com base nas seguintes premissas: somente 50% da concentração da enzima ( $\mu$ g/ $\mu$ l) utilizada no ensaio é ativa; a concentração equivalente a 50% da inibição da enzima (IC<sub>50</sub>) é igual a metade da tripsina ativa; e a razão molar entre enzima e inibidor equivale a 1 para o inibidor de soja e 2 para o inibidor de batata (Peso molecular do inibidor Kunitz da soja e batata aproximadamente 20kDa, peso molecular inibidor I e II de batata aproximadamente 10kDa, peso molecular da tripsina e

quimotripsina aproximadamente 25 kDa). Considerando-se essas premissas, a estimativa da concentração é obtida multiplicando-se a quantidade da proteinase utilizada no ensaio pela razão entre as massas moleculares da protease e do inibidor. O produto dessa multiplicação é ainda multiplicado pela constante 0,25 (metade da proteinase é ativa e trabalha-se com a estimativa do  $IC_{50}$ ). Para o cálculo da quantidade necessária do inibidor para inibir 50% da atividade da proteinase ( $IC_{50}$ ) foram feitos vários ensaios de inibição onde a concentração do inibidor foi incrementada até a obtenção de 100% de inibição da enzima (MOURA; RYAN, 2001).

### **3.2 Atividade das proteinases das larvas de *Spodoptera frugiperda***

#### **3.2.1 Criação das larvas**

As larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797), Lepidoptera: Noctuidae, foram criadas no Laboratório de Biologia de Insetos (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – ESALQ/USP), sob a coordenação do Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, à 25°C, 60±10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14/10 horas de claro/escuro.

Os insetos de primeiro instar foram mantidos (1/tubo) em tubos de vidro de 2,5cm de diâmetro e 8.0cm de altura, tampados com algodão. Parte das larvas foi alimentada com dieta artificial padrão a base de feijão, germe de trigo, levedura de cerveja e aditivos, conforme tabela abaixo (MIHSFELDT ; PARRA,1999) e parte foi alimentadas em dieta padrão acrescida de 0,5% (p/p) do inibidor ativo de proteinase soja.

Tabela1 - Composição da dieta artificial para criação das larvas de *Spodoptera frugiperda* (MIHSFELDT; PARRA,1999)

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Feijão Branco	75 g
Germe de trigo	60 g
Farelo de soja	30 g
Caseína	30 g
Levedura de cerveja	37,5 g
Ácido ascórbico	3,6 g
Ácido sórbico	1,8 g
Metil-parahidroxibenzoato (nipagin)	3 g
Tetraciclina	113 mg
Formaldeído	3,6 ml
Complexo Vitamínico(*)	9 ml
Ágar	23 g
Água	1200 ml

\* Complexo vitamínico diluído em 1litro de água destilada: 1 g de niacina, 1g de pantotenato de cálcio, 0,5g de tiamina, 0,25g de piridoxina, 0,1g de ácido fólico, 0,02g de biotina, 2ml de vitamina B<sub>12</sub> (1000mg/ml)

### 3.2.2 Extração dos intestinos e obtenção das enzimas digestivas

As larvas de *Spodoptera frugiperda* ao atingirem o último instar (6º instar) foram imobilizadas em gelo para extração dos intestinos. A imobilização consiste em colocar as larvas sobre uma placa de vidro sobre gelo. Os intestinos foram removidos com auxílio de pinças em uma solução 125mM de NaCl gelada. Lotes de 5 intestinos foram homogeneizados em Potter-Elvehjen com 2mL de água Milli-Q gelada. Após homogeneização, a amostra foi centrifugada

por 30 minutos a 20.000 x g a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado e usado nos ensaios enzimáticos.

### **3.2.3 Ensaios enzimáticos de inibição das proteinases digestivas**

O efeito dos inibidores de soja e batata sobre as proteinases intestinais de larvas alimentadas em dieta contendo ou não o inibidor de soja foi determinado através de ensaios enzimáticos conforme descrito no item 3.1.3.1 A proteinase adicionada aos ensaios foi substituída pelos extratos intestinais, sendo que a atividade proteinásica dos extratos intestinais foi avaliada e equiparada a dos ensaios para atividade de tripsina, 15,4µg/mL. Extratos protéicos intestinais foram obtidos conforme descrito anteriormente (item 3.2.2) e os inibidores foram acrescentados em concentrações crescentes. Os ensaios enzimáticos foram repetidos cinco vezes para cada tipo de dieta e inibidor testado.

## **3.3 Análise da expressão das proteinases com PCR em tempo real**

### **3.3.1 Criação das larvas**

Para as análises de expressão das proteinases as larvas foram criadas de duas formas:

1. As larvas de primeiro instar foram alimentadas parte em dieta artificial padrão (tabela 1) e parte em dieta com 0,5% (p/p) do inibidor ativo de proteinase soja (Ingestão crônica do inibidor a partir da eclosão das larvas).

2. As larvas permaneceram na dieta padrão até atingirem o terceiro instar. A partir do terceiro instar foram transferidas parte em dieta artificial padrão e parte em dieta com 0,5% (p/p) do inibidor ativo de proteinase soja (Ingestão crônica do inibidor a partir do 3 instar).

Em ambos os experimentos lotes de 5 intestinos das larvas de 3, 4, 5 e 6° instares foram removidos com auxílio de pinças, congelados em nitrogênio e armazenados em freezer -80°C para serem usados na extração do RNA

### **3.3.2 Extração de RNA e obtenção de cDNA**

O RNA total presente nos extratos intestinais foram extraídos utilizando-se o reagente TRIZOL® (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. Uma vez extraído, o RNA total foi submetido ao tratamento com DNase I (Fermentas) para evitar contaminação com DNA genômico. As amostras foram tratadas com 2 unidades de DNase I, durante 20 minutos a 37°C.

Após o tratamento com a enzima foi feita novamente a extração com o reagente trizol, porém utilizando metade dos volumes indicado pelo fabricante. As amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro a 260nm e a integridade do RNA foi verificada por intermédio de gel desnaturante. O cDNA foi obtido a partir de 1µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa Superscript™ III (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos foram diluídos 1/800 em água milli-Q e utilizados diretamente nas reações de PCR em tempo real. Para cada tratamento analisado foram feitos no mínimo dois cDNAs (duas repetições).

### **3.3.3 PCR em tempo real**

As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando-se o aparelho Rotor Gene 3000 da Corbett. Cada reação foi composta de 10µL da mistura Platinum® SYBR®GreenqPCR (Invitrogen), 5,2µL de água milli-Q, 0,4µL de cada iniciador (10uM) (ver Tabela 2) e 4µL do cDNA diluído. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicatas. Foram utilizados dois ciclos para realização do PCR. Para os iniciadores do gene SfChy10 o seguinte ciclo foi usado: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Foi realizada uma única aquisição da fluorescência a cada ciclo. A curva de desnaturação foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Para os demais iniciadores o ciclo foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 61-62°C -dependendo da temperatura de anelamento do primer- e 72°C por 30 segundos. A aquisição da fluorescência e curva de desnaturação foram idênticas para todos os iniciadores. A especificidade dos iniciadores, bem como os parâmetros temperatura de anelamento, diluição dos cDNAs e eficiências de amplificação foram obtidos de Brioschi (2006). O gene de referência utilizado foi o que codifica a proteína ribossomal S30.

Tabela 2- Pares de iniciadores para os genes de quimotripsinas (SfChy) e tripsinas (SfTry) e gene de referência (S30) de *Spodoptera frugiperda* usados nas análises de PCR em tempo real (BRIOSCHI, 2006)

Gene	Iniciadores (5' a 3')	
SfChy1	AAGTCATCATGCACCCACAA	GACACGTGGCTTACCACAGA
SfChy2	TCATCTCTCACAAACCGCATC	AACAGSGCTAATGCGGAGGA
SfChy3	AAGCTGGAACCCCAGTAACA	TTTTCGTTGAGCTGGCTACC
SfChy4	TGCTCCAGCTCAGCTCGGTC	CGTCATTTCCGGACTAGACTTGGAG
SfChy5	TTACCGCTAACCGTGTGCTT	CGATGACATCTGACAAGGCG
SfChy6	TCGGAGCATGACAGTTGTTC	AGATGCTGTGGCGGTAAAAC
SfChy8	TATGGTACTAGCGTCGCGAG	GAGCAATAGGAGCGAGGTTAC
SfChy10	TGCAGCTCTTATCTCCCACA	CAACATCACCAGCAAAGCTC
SfTry3	ACGTCCATTGACAAGTTCCC	AGCTTGGGTCGTAGAAGACG
SfTry4	AACTTATGGCGGCTAGCGTA	AAGGGACCTCCAAAGTCACC
Sftry5	CGGGCGACAGTACGAGAATA	CGGCGTATCTCACATCAGCA
S30	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT

### 3.3.4 Análise dos dados

A expressão gênica foi obtida de modo relativo, observando-se as eficiências de amplificação de acordo com Pfaffl (2001). Para cada iniciador foi adotada a eficiência de amplificação previamente obtida por Brioschi (2006). A expressão relativa de um determinado gene (alvo) é calculada com base na eficiência de amplificação do gene alvo e do número de ciclos de amplificação que são necessários para atingir uma determinada fluorescência (arbitrária). A expressão do gene alvo é expressa em comparação com um gene de referência Pfaffl (2001).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização dos extratos contendo inibidores de proteinase

Com o objetivo de padronizar os extratos obtidos a partir de sementes de soja e tubérculos de batata, os inibidores de proteinases presentes nos extratos protéicos tiveram sua atividade inibitória contra tripsina e quimotripsinas quantificadas. Essa quantificação foi utilizada não somente na elaboração da dieta das larvas de *S. frugiperda*, mas também foi utilizada na avaliação da sensibilidade das proteinases intestinais de *S. frugiperda* após serem expostas a dieta com e sem inibidor de soja. A escolha da quantificação somente da atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina é baseada em estudos prévios que mostram que a atividade de serino proteinases (tripsina e quimotripsina) é responsável por mais 90-95% da atividade proteolítica em intestinos de lepidóptera (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006).

#### 4.1.1 Inibidores de proteinase de soja (IPS)

O extrato protéico semi-purificado obtido da extração de sementes de soja apresentou atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina conforme observado na figura 1A e B. De acordo com as curvas de inibição, observa-se que o extrato de inibidores de soja apresenta um predomínio de atividade anti-tripsina. Com menos de 5 $\mu$ L de extrato foi possível inibir mais de 60% da atividade trípica constante no ensaio. Com esse mesmo volume, a atividade residual de quimotripsina foi superior a 80%.

A estimativa da perda de 50% da atividade remanescente da tripsina (IC<sub>50</sub>) ocorreu com a adição de 3,7 $\mu$ l do inibidor (Figura 1A). Em contrapartida, foram necessários cerca de 57 $\mu$ L do extrato para atingir o IC<sub>50</sub> da quimotripsina (Figura 1B).

Sementes de leguminosas são fontes ricas de inibidores de proteinases (LASKOWSKI; KATO, 1980). Embora existam outros inibidores, há um predomínio de inibidores do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk em sementes de soja. Inibidores do tipo Kunitz possuem um peso molecular de 20,5kDa, um único sítio inibitório e inibem fortemente tripsina e fracamente quimotripsina (KIM et al., 1985). Os inibidores da família Bowman-Birk são menores, aproximadamente 8kDa, possuem dois sítios reativos e se ligam (inibem) tripsina e quimotripsina com a mesma afinidade (BIRK et al., 1963, ODANI; IKENAKA, 1973). Os resultados de inibição obtidos para os extratos de sementes de soja indicam que a extração resultou

principalmente em inibidores do tipo Kunitz. A atividade anti-quimotripsina observada nos extratos pode ser devida somente a fraca atividade inibitória dos inibidores Kunitz.

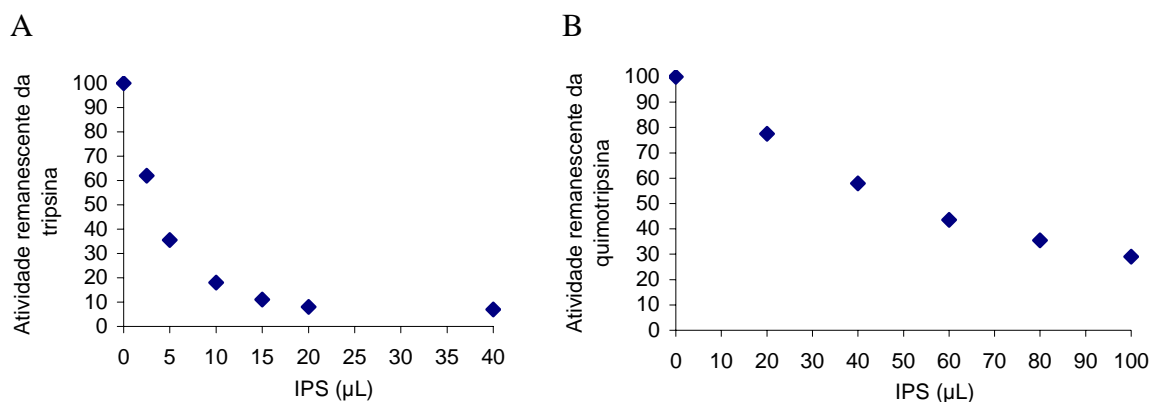


Figura 1. Atividade inibitória dos extratos protéicos de soja para tripsina (A) e quimotripsina (B). IPS, inibidor de proteinase de soja

A estimativa da concentração dos inibidores presentes nos extratos de sementes de soja (ver Material e métodos) resultou em 10mg de inibidor de tripsina por 100mg de extrato protéico (10%, p/p) e 0,6mg de inibidor de quimotripsina por 100mg de extrato protéico (0,6% p/p).

#### 4.1.2 Inibidores de proteinase de batata (IPB)

Os resultados dos ensaios enzimáticos para as atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina para o extrato protéico de tubérculos de batata encontra-se na figura 2. Os gráficos mostram um comportamento inibitório mais equilibrado para tripsina e quimotripsina, principalmente se comparado aos extratos de sementes de soja. A atividade anti-tripsina é reduzida em aproximadamente 40% com a adição de 5µL do extrato (Figura 2A), enquanto que a atividade anti-quimotripsina apresenta uma redução de cerca de 80% para esse mesmo volume (Figura 2B).

A estimativa do  $IC_{50}$  para as atividades anti proteinases revela uma diferença da ordem de aproximadamente 3,5 vezes de quimotripsina em relação a tripsina, 1,7µL e 6µL do inibidor respectivamente.

Tubérculos de batata possuem uma grande variedade de inibidores de proteinase. Dentre os inibidores há dois do tipo Kunitz que possuem um peso molecular de aproximadamente 20 e 20,5 kDa (WALSH; TWICHELL, 1991). A proteína menor é um potente inibidor de quimotripsina e um fraco inibidor de tripsinas, já a proteína maior é um potente inibidor de

tripsina. Outro inibidor encontrado em batata e que também é termoestável é o chamado inibidor de proteinase I, o qual possui um peso molecular de 9,5kDa e é um forte inibidor de quimotripsinas (MELVILLE; RYAN, 1972). Por fim, existe ainda um outro inibidor cujo peso molecular é de aproximadamente 10,5kDa (chamado inibidor de proteinase II), e que é um forte inibidor de ambas as quimotripsinas e tripsinas (BRYANT et al., 1976). O extrato obtido pelo método aqui descrito reflete a heterogeneidade dos inibidores esperados e a predominância da atividade anti-quimotripsina devido ao inibidor de proteinases tipo I.

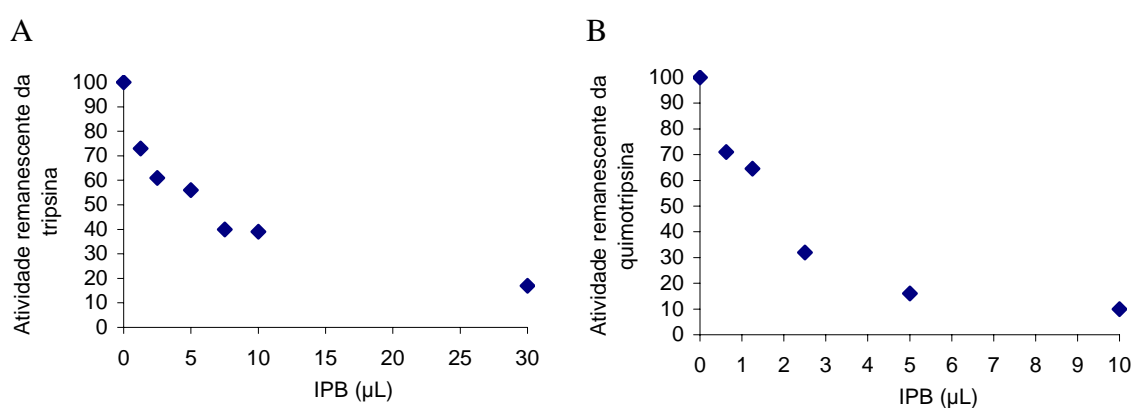


Figura 2. Atividade inibitória dos extratos protéicos de batata para tripsina (A) e quimotripsina (B). IPB, inibidor de proteinase de batata

A estimativa da concentração dos inibidores de batata, considerando o menor peso molecular dos inibidores (9,5kDa) resultou em valores da ordem de 2,6% (p/p) para a atividade anti-tripsina e 9% (p/p) para a atividade anti-quimotripsina.

A comparação de ambos os extratos de sementes de soja e tubérculos de batata mostra que o primeiro apresenta uma atividade quase que exclusiva anti-tripsina enquanto que o segundo apresenta uma maior variedade de atividades inibitórias, com uma clara predominância para a atividade anti-quimotripsina. A escolha desses dois tipos de fontes de inibidores foi justamente para que fosse possível a obtenção de extratos contendo inibidores com ações e composições distintas. Os resultados obtidos comprovam a heterogeneidade dos extratos com relação a composição e atividade inibitória. Os extratos contendo inibidores específicos (soja) e inibidores de amplo espectro (batata) foram utilizados para avaliar a diversidade de proteinases induzidas pelas larvas quando expostas à dieta contendo IPS.

Os resultados mostraram que o extrato semi-purificado obtido de sementes de soja apresenta preponderantemente atividade anti-tripsina (10%) enquanto que a atividade anti-quimotripsina foi apenas residual. Corroborando com os resultados encontrados, Paulillo (1999) mostrou que o extrato semi-purificado extraído de sementes de soja apresentou atividade inibitória semelhante ao inibidor Kunitz (anti-tripsina) e que a quantidade de inibidores de proteinases presente nos extratos protéicos foi de cerca de 12%. Em relação ao extrato de batata a atividade inibitória foi presente tanto para tripsina (2,6%) quanto para as quimotripsinas (9%). A presença de maior atividade anti-quimotrípica nesses extratos provavelmente está relacionada a técnica usada que promove a extração de inibidores de batata do tipo I, cuja atividade é anti-quimotripsinas (MELVILLE; RYAN,1972; PEARCE et al., 1982).

#### **4.2 Atividade das proteinases intestinais das larvas de *Spodoptera frugiperda***

A variabilidade das proteinases intestinais de *S. frugiperda* quanto a insensibilidade a inibidores de proteinases foi testada utilizando-se dois extratos enriquecidos em inibidores: extrato de soja, contendo predominantemente atividade anti-tripsina, e o extrato de batata, contendo uma diversidade maior de inibidores com atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina. A atividade dos inibidores de proteinase de soja e batata foi testada contra as enzimas digestivas extraídas das larvas controle e das larvas cronicamente expostas ao inibidor de soja. As larvas foram alimentadas desde o 1º instar em dieta sem ou com de inibidor de soja. No sexto instar seus intestinos foram removidos e usados nos ensaios enzimáticos de inibição. O objetivo desse experimento é avaliar se as proteinases induzidas pela presença do inibidor de soja são ou não insensíveis aos inibidores. Caso a estratégia adotada pela larva seja a seletiva, ou seja, seleção de proteinases insensíveis ao inibidor de soja adicionado a dieta, haveria uma grande probabilidade, devido às diferenças entre os inibidores, que os inibidores de batata fossem capazes de inibir as novas proteinases. A estratégia contrária, ou seja, o aumento generalizado de proteinases sem a seleção, tornaria improvável que os inibidores de batata, por mais diversos e diferentes que fossem do inibidor de soja, inibissem o novo conjunto de proteinases intestinais.

#### 4.2.1 Ensaio enzimáticos de inibição com IPS

O efeito do inibidor de soja sobre as proteinases intestinais existentes e induzidas pela dieta com inibidor é mostrado na figura 3. Os resultados mostram que o inibidor foi efetivo em inibir a atividade proteolítica dos extratos obtidos de larvas alimentadas em dieta livre do IPS, comprovando que as proteinases intestinais preexistentes são sensíveis aos inibidores de soja. Larvas que cresceram na dieta com o IPS apresentaram uma atividade proteolítica insensível ao inibidor, mantendo-se praticamente constante ao longo das diferentes concentrações do inibidor.

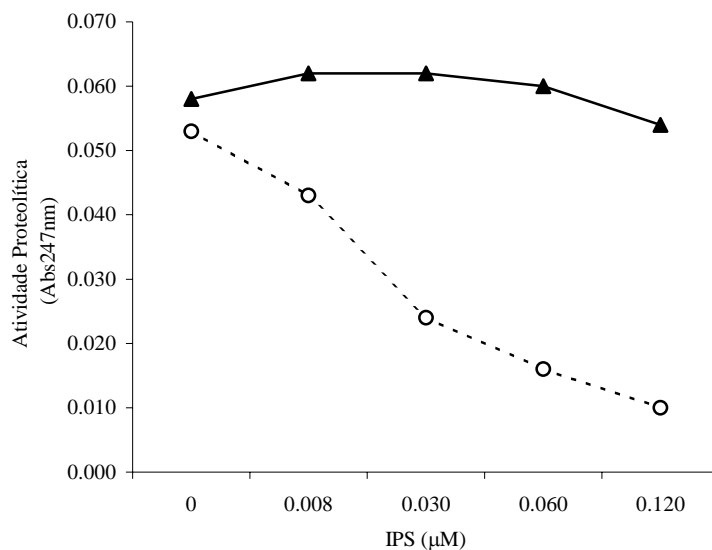


Figura 3. Atividade das enzimas proteolíticas intestinais de *S. frugiperda* avaliada através de ensaio da atividade triptica. Larvas foram alimentadas em dieta sem inibidor de proteinase de soja (círculos) e com inibidor de proteinase de soja (triângulos). A inibição da atividade triptica intestinal foi avaliada em concentrações crescentes de inibidor de soja (IPS)

#### 4.2.2 Ensaio enzimáticos de inibição com IPB

Os extratos intestinais contendo atividade proteolítica foram também avaliados quanto à sensibilidade ao inibidor de amplo espectro extraído de tubérculos de batata. Os resultados mostraram um comportamento semelhante ao obtido com IPS (Figura 4). Observou-se que o IPB também foi efetivo contra a atividade proteolítica dos extratos obtidos de larvas alimentadas em dieta livre do IPS. Nessas larvas a atividade triptica foi sensível ao IPB atingindo uma perda de aproximadamente 68% em relação à atividade inicial. Nas larvas que cresceram na dieta

enriquecida com o IPS a atividade triptica se mostrou insensível as diferentes concentrações do inibidor de batata.

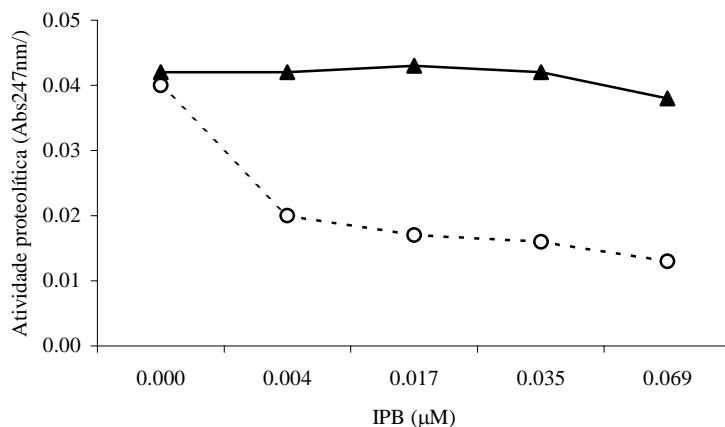


Figura 4. Atividade das enzimas proteolíticas intestinais de *S. frugiperda* avaliada através de ensaio da atividade triptica. Larvas foram alimentadas em dieta sem inibidor de proteinase de soja (círculos) e com inibidor de proteinase de soja (triângulos). A inibição da atividade triptica intestinal foi avaliada em concentrações crescentes de inibidor de batata (IPB)

Os resultados da avaliação da atividade proteolítica intestinal preexistente e induzida pela exposição ao IPS revelaram uma insensibilidade generalizada das proteinases de *S. frugiperda* após o contato com o IPS na dieta. Essa insensibilidade generalizada é deduzida pelo comportamento de total falta de inibição tanto pelo inibidor adicionado a dieta (IPS, triângulos na figura 3) quanto pelo inibidor de amplo espectro (IPB, triângulos na figura 4).

Um dos frequentes questionamentos a estudos de expressão gênica que objetivam avaliar as respostas de insetos a inibidores de proteinases é que a detecção de uma mudança no perfil gênico, não necessariamente acarretaria uma mudança no perfil protéico. Devido ao fato das proteinases necessitarem de processamento pós-traducional para adquirirem atividade, não há garantia de correlação entre uma mudança na expressão gênica e uma alteração na atividade proteolítica. Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4, quando tomados em conjunto, comprovam uma alteração do perfil protéico comprovada pela alteração na atividade proteolítica intestinal das larvas de *S. frugiperda* após a ingestão do IPS. Não somente é demonstrada uma aquisição de insensibilidade ao inibidor ingerido, uma adaptação direta ao fator anti-nutricional, mas também observa-se uma estratégia generalizada de adaptação, evidenciada pela insensibilidade aos inibidores de maior espectro obtidos de tubérculos batata.

As larvas de *Spodoptera frugiperda* mostram ser capazes de se adaptar a presença de diferentes inibidores de plantas através da mudança de seu grupo original de enzimas digestivas, este fato pode ser observado através dos resultados dos ensaios enzimáticos de inibição com IPS e IPB (figuras 3 e 4).

Os ensaios enzimáticos sugerem que o grupo original das enzimas digestivas das larvas é sensível aos inibidores testados (soja e batata). A atividade proteolítica cai 80% (inibidor de soja) e 68% (inibidor batata) quando são ensaiados os intestinos de lagartas alimentadas em dieta controle. Silva et al. (2006) estudando larvas de *Ceratitis capitata* também verificaram um grupo inicial de proteinases sensível ao inibidor de tripsina de soja as quais em ensaios de inibição *in vitro* mostraram uma inibição de 90% da atividade proteolítica.

Após larvas serem submetidas à condição de estresse (o inibidor de soja) elas se adaptam gerando um grupo de enzimas que são insensíveis. A insensibilidade ocorre tanto ao próprio inibidor incorporado na dieta quanto a outros tipos de inibidores (batata)

#### **4.3 Expressão gênica das proteinases digestivas de *Spodoptera frugiperda***

Brioschi (2006) identificou, através de bibliotecas subtrativas, dois grupos de proteinases digestivas de *S. frugiperda*. Um grupo formado por proteinases já existentes no trato digestivo das larvas, e um segundo grupo formado por proteinases novas, induzidas pela presença do inibidor na dieta as quais foram induzidos quando as larvas foram expostas ao IPS. Os dois grupos são compostos de 3 tripsinas (SfTry3, 4 e 5) e 8 quimotripsinas (SfChy1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, e 10) que, embora distintas, preservam entre si um nível elevado de conservação de estrutura primária. Os resultados de Brioschi (2006) mostraram que quando as larvas do sexto instar são transferidas para dieta contendo IPS, observa-se um aumento da expressão gênica das onze proteinases estudadas. Esses resultados levaram a formulação da hipótese de que *S. frugiperda* adotaria uma estratégia de aumento generalizado das proteinases intestinais para adaptar-se a presença de IPS na dieta. Uma outra hipótese existente para a adaptação aos inibidores na dieta estabelece que as proteinases intestinais sofrem uma seleção de acordo com a capacidade de serem inibidas (BOWN; WILKINSON ; GATEHOUSE, 2004). Assim, de acordo com a hipótese seletiva, após a ingestão dos inibidores, somente as proteinases insensíveis aos mesmos seriam produzidas, levando também a um processo adaptativo, porém específico ao inibidor presente na dieta. Porque os experimentos de Brioschi (2006) avaliaram a resposta adaptativa até 48h pós-

ingestão do IPS, resolveu-se analisar a adaptação de *S. frugiperda* ao IPS sob condições de exposição crônica. Dois experimentos foram feitos com a finalidade de investigar se a resposta de *S. frugiperda* alteraria seu padrão generalista uma vez exposta cronicamente à presença do inibidor. Larvas de terceiro instar e larvas recém eclodidas foram transferidas para dietas com IPS e o padrão de expressão gênica das onze proteinases foi avaliado.

#### **4.3.1 Ingestão crônica do inibidor a partir do 3° instar**

A primeira etapa da avaliação da ingestão crônica do IPS foi feita transferindo-se larvas de terceiro instar para a dieta com IPS e para dieta sem IPS (controle). Até o momento da transferência as larvas foram criadas em dieta padrão (ver material e métodos). Os tempos de coleta de material para extração de RNA e posterior análise da expressão gênica foram determinados pela troca de instar.

##### **4.3.1.1 Expressão relativa dos genes de tripsinas**

O padrão de expressão das tripsinas intestinais, em especial da SfTry4 e SfTry3, revelou a existência de um terceiro grupo de proteinases quanto a expressão em função da presença de inibidores de proteinases na dieta. Além do grupo das preexistentes e das novas proteinases induzidas pelos inibidores, as tripsinas SfTry4 e 3 formam um grupo de proteinases que não são afetadas pela presença do IPS. Não foi detectada nem uma indução nem tampouco uma repressão a ponto de serem consideradas parte de uma estratégia seletiva. A expressão do gene SfTry4 na dieta sem inibidor e na dieta com inibidor é representada na Figura 5. É possível notar um aumento progressivo na expressão do 4 ao 6° instar nas larvas alimentadas em ambas as dietas. Na dieta sem inibidor o aumento em relação o 3° instar foi respectivamente 7,25, 7,28 e 12,82 vezes. Na dieta com inibidor houve um aumento de 2,94, 3,86 e 10,81 vezes. Apesar de no início do experimento haver um aumento superior nas larvas em dieta controle, ao final do experimento os níveis de expressão são equivalentes. Brioschi (2006) observou que esse gene também apresentava um padrão de expressão similar entre larvas em dieta controle e larvas em dieta com IPS.



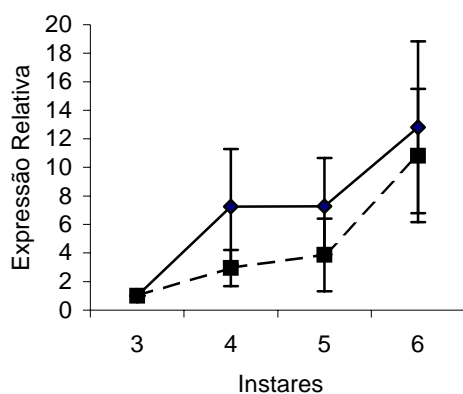


Figura 5- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfTry4 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

O gene SfTry3 apresentou uma flutuação na expressão relativa em ambas as dietas (Figura 6). Na dieta sem inibidor apareceu um pico de 2,35 vezes no 4º instar e um aumento de 1.35 vezes no 5º instar. O 6º instar mostrou queda de 25%. Na dieta com inibidor o pico de expressão ocorreu no 5º instar, nos demais a expressão é continua acima do 3º instar. O gene SfTry3, a exemplo do que foi observado com o gene SfTry4, não mostra o padrão típico de indução. Um comportamento semelhante foi observado quando as larvas foram alimentadas somente a partir do 6º instar (BRIOSCHI, 2006).

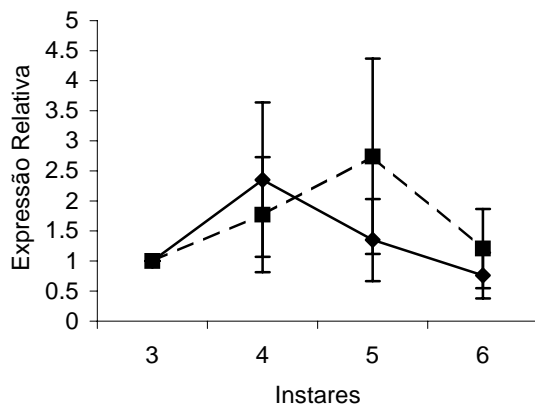


Figura 6- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfTry3 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

Para o gene SfTry5 a expressão foi detectada somente na dieta com inibidor conforme ilustra a Figura 7. Nesse gene a expressão foi calculada em relação ao 4º instar. É possível observar tanto no 5º quanto no 6º instar um aumento de aproximadamente 2 vezes o ponto de referência.

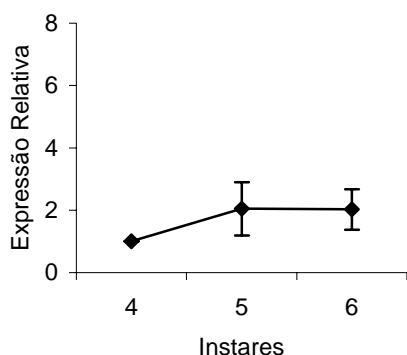


Figura 7- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfTry5 ao longo do 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor de soja

#### 4.3.1.2 Expressão relativa dos genes de quimotripsinas

Nas figuras 8 a 15 encontram-se os resultados das análises de expressão dos genes que codificam quimotripsinas no trato digestivo de *S. frugiperda*. Todos os genes avaliados mostraram um aumento da expressão quando as larvas foram transferidas para a dieta contendo IPS. Observou-se uma variação do aumento da expressão (ver escalas da expressão relativa) dos genes, sendo o de maior incremento o gene SfChy5 (aprox. 90 vezes, figura 8) e o de menor o SfChy2 (aprox. 3 vezes, figura 9).

O gene SfChy5 quando analisado em experimentos de curta exposição ao IPS não mostrou expressão em larvas controle (BRIOSCHI, 2006). Os resultados apresentados aqui revelam uma baixa, porém consistente expressão desse gene em larvas controle. Essa discrepância pode ser explicada pelos níveis de expressão do gene SfChy5 situarem-se no limite de detecção da técnica de PCR em tempo real, o que poderia causar variações na presença/ausência do gene. Na dieta com o inibidor o aumento da expressão foi gradativo, chegando a uma expressão de 87,8 vezes no 6º instar.

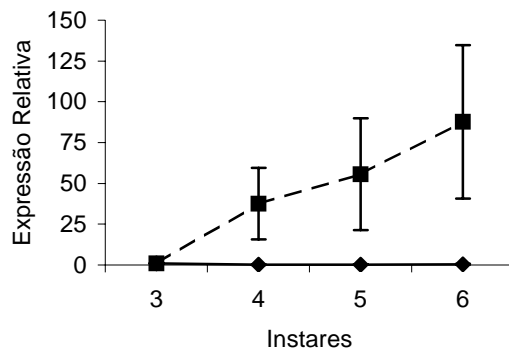


Figura 8 - Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy5 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

O gene SfChy2 (Figura 9) apresentou na dieta sem inibidor uma queda de expressão de 25% no 4º instar. No 5 e 6º instares a expressão aumentou para 1,08 vezes e 1,62 vezes. Na dieta com inibidor o aumento de expressão ocorreu em todos os instares, sendo o máximo de 3 vezes encontrado no 6º instar. Brioschi (2006) observou um aumento comportamento semelhante para o gene SfChy2, porém a magnitude do aumento observado foi de 20 vezes o existente no controle.

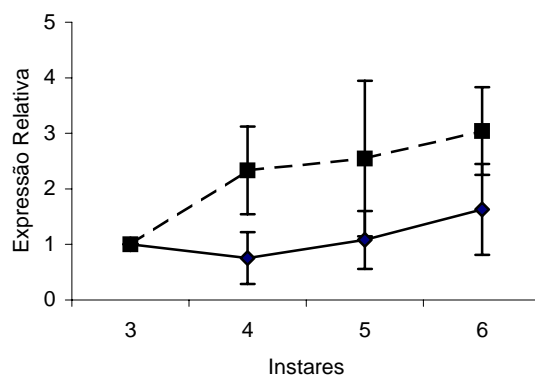


Figura 9- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy2 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

Os genes SfChy1, 3 e 4 apresentaram um comportamento semelhante para dieta com inibidor (Figuras 10, 11 e 12). Todos mostraram um aumento constante até o final do experimento, sendo que a magnitude do incremento da expressão também foi semelhante, aproximadamente 6 vezes o nível encontrado no controle (3<sup>o</sup> instar).

Na dieta sem inibidor o gene SfChy1 (Figura 10) mostrou um aumento de 1,19 vezes no 4<sup>o</sup> instar. No 5 e 6<sup>o</sup> instares ocorreu queda de 0,58 e 0,66 vezes. Na dieta com inibidor foi detectado um aumento próximo a 4 vezes no 4 e 5<sup>o</sup> instar. No 6<sup>o</sup> instar a expressão do gene foi de 5,28 vezes a encontrada no controle.

O gene SfChy3 na dieta com inibidor apresentou valores de expressão da ordem de 2,54, 3,23 e 4,56 vezes no 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> instares respectivamente (Figura 11). Comparando as duas dietas é possível observar que o gene é mais expresso na dieta com inibidor e que a diferença máxima entre as dietas ocorreu no 6<sup>o</sup> instar, o qual mostrou ser aproximadamente 2,5 vezes mais expresso.

O gene SfChy4, mostrou na dieta sem inibidor, um aumento de 1,9 vezes no 4 e 5<sup>o</sup> instares, e no 6<sup>o</sup> instar a expressão aumentou para 2,67 vezes (Figura 12). Na dieta com inibidor houve um aumento contínuo e maior. No 4<sup>o</sup> instar, a expressão foi de 4,66 vezes. No 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> instares os aumentos foram 5,5 e 7,04 vezes respectivamente. Comparando com a dieta sem inibidor há um aumento de em média 2,6 vezes quando o inibidor é ingerido.

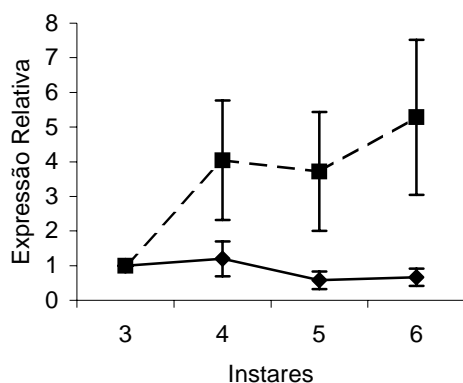


Figura 10- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy1 ao longo do 3, 4, 5 e 6<sup>o</sup> instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

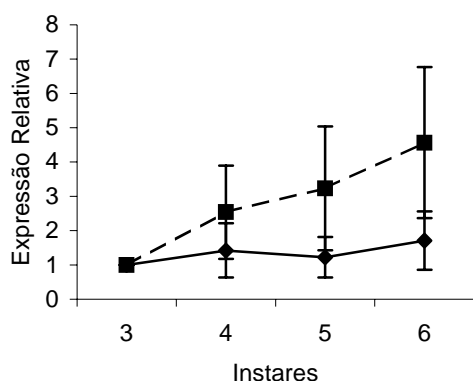


Figura 11- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy3 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

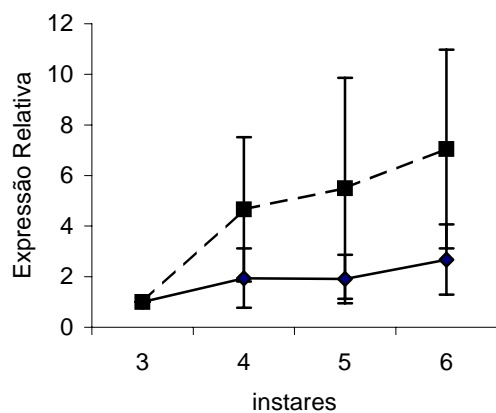


Figura 12- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy4 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

O gene SfChy10 (Figura 13) é expresso 1,73 vezes no 4º instar da dieta controle, nos demais instares a expressão é inferior a 1. Na dieta com inibidor o gene é mais expresso no 4º instar, apresentando um aumento de 16,22 vezes, mantendo-se estável até o final do experimento. O gene SfChy10 não mostrou expressão em lagartas controle segundo Brioschi (2006). A exemplo do que aconteceu com o gene SfChy5, os níveis de expressão desse gene em larvas alimentadas com a dieta padrão apresentaram-se no limite de detecção da técnica utilizada.

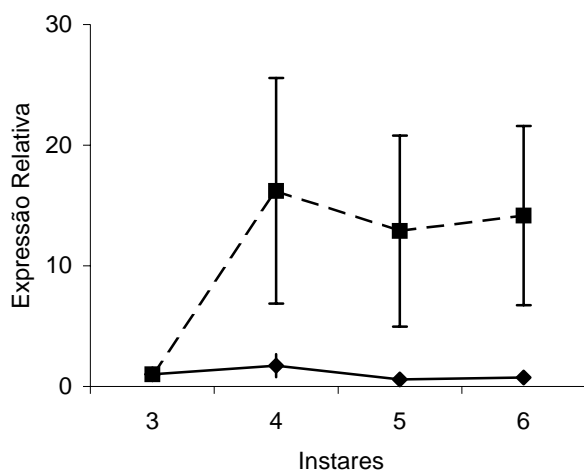


Figura 13- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy10 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada) ou dieta sem inibidor de soja (linha cheia)

Dentre as quimotripsinas avaliadas, os genes SfChy6 e SfChy8 não apresentaram níveis detectáveis de expressão na dieta controle (Figuras 14 e 15). Esses resultados estão de acordo com o observado por Brioschi (2006). Ambos os genes apresentam um comportamento muito semelhante. O gene SfChy8 mostra um aumento de 1,87 vezes no 5º instar e de 1,48 vezes no 6º instar (Figura 14). O gene SfChy6 apresentou um aumento de 1,99 vezes no 5º instar e de 1,84 vezes no 6º instar (Figura 15).

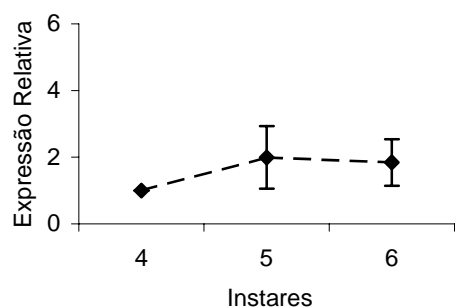


Figura 14- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy8 ao longo do 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada)

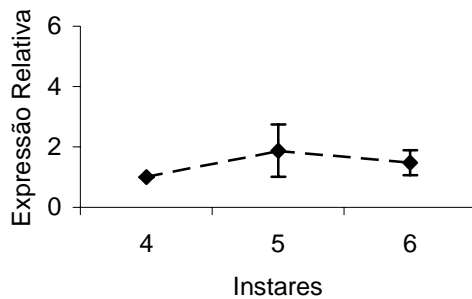


Figura 15- Expressão relativa do gene de quimotripsina SfChy6 ao longo do 4, 5 e 6º instares. Larvas de terceiro instar foram transferidas para dieta suplementada com inibidor (linha pontilhada)

O comportamento da expressão gênica das oito quimotripsinas intestinais mostrou que a estratégia de aumento generalizado das proteases de *S. frugiperda* observado por Brioschi (2006) também foi observado com a exposição crônica das larvas ao IPS. Uma estratégia seletiva deveria ter mostrado uma queda ou até mesmo a não detecção da expressão gênica de algumas proteinases, após as lagartas terem sido expostas ao inibidor. Esse padrão seletivo de expressão não foi observado.

#### 4.3.2 Ingestão crônica do inibidor a partir da eclosão das larvas

Em uma segunda etapa, testou-se o comportamento das proteinases quando as larvas foram expostas a um período ainda maior ao IPS. Nesse segundo experimento, larvas logo após a eclosão foram transferidas para dieta com IPS e dieta sem inibidor (controle). Por limitações de tamanho do modelo de estudo (larvas menores que 7mm), as amostras foram tomadas somente a partir do terceiro instar. Por não haver ponto comum aos dois tratamentos, os dados de expressão relativa são mostrados primeiro de cada gene com relação a si próprio e em segundo lugar de cada gene com relação à expressão observada no controle no mesmo instar. Em todas as análises foi atribuído o valor 1 para a expressão no terceiro instar.

##### 4.3.2.1 Expressão relativa dos genes de tripsinas

O nível de expressão do gene SfTry4 na dieta sem inibidor está representado na Figura 16A. A expressão na dieta padrão apresenta pouca variação ao longo do experimento. No 4º instar há um discreto aumento de 0,18 vezes. No 5 e 6º instares houve um aumento também

moderado de 1,33 e 1,46 vezes o controle respectivamente. Na dieta com inibidor ocorreu um pico de expressão de 2,07 vezes no 4º instar , seguido de uma queda progressiva até o final do experimento (Figura 16B). Na comparação dos níveis de expressão nas diferentes dietas e instares, foi observado uma maior expressão na dieta com IPS em todos os instares avaliados (Figura 17). Um alto pico de aproximadamente 5 vezes o nível de expressão na dieta controle ocorreu no 4º instar.

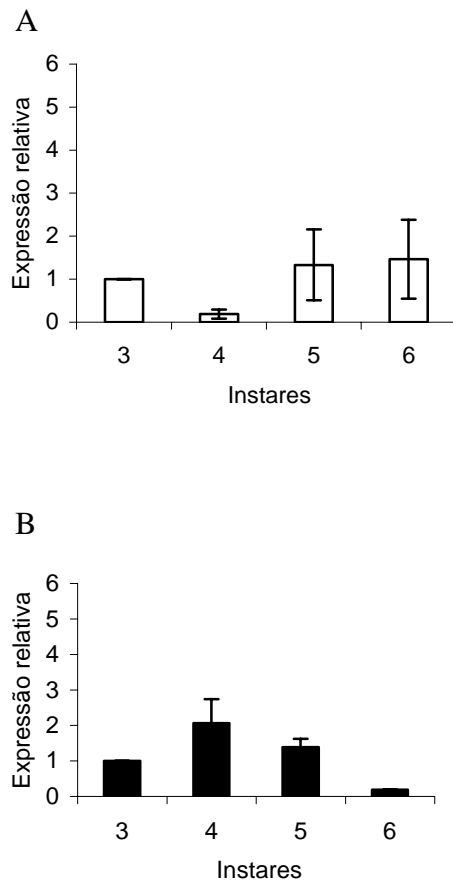


Figura 16- Expressão relativa do gene SfTry4 ao longo do 3, 4 , 5 e 6º instares para as larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja (A) e alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja (B)



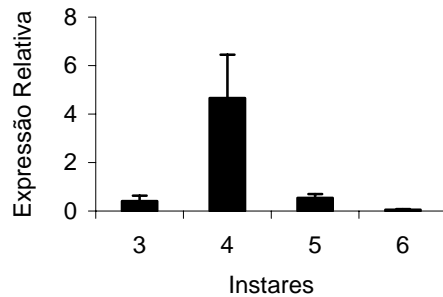


Figura 17- Expressão relativa do gene SfTry4 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O gene SfTry3 apresentou, para todos os instares, uma expressão menor que 0,5 vezes a detectada no terceiro instar na dieta sem inibidor (Figura 18A). Na dieta com inibidor o gene SfTry4 manteve a expressão no 4<sup>o</sup> instar e apresentou um declínio até o final do experimento (Figura 18B). Esse declínio pode estar relacionado ao desenvolvimento larval, indicando que apesar da presença do IPS na dieta, as proteinases podem estar também sendo reguladas pelo desenvolvimento. Na comparação das duas dietas o 3<sup>o</sup> instar apresentou expressão próxima a 1 (Figura 19). O 4<sup>o</sup> instar apresentou um pico de 3,5 vezes em relação ao controle, seguido de uma diminuição até o 6<sup>o</sup> instar.

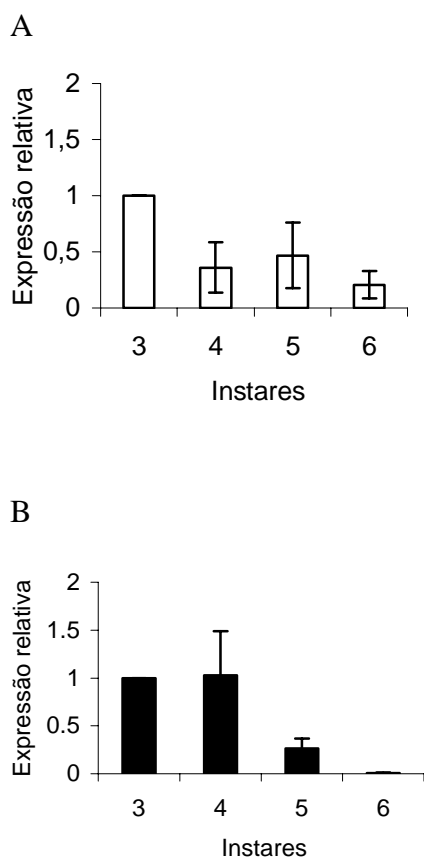


Figura 18- Expressão relativa do gene SfTry3 ao longo do 3, 4 , 5 e 6º instares para as larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja (A) e alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja (B)

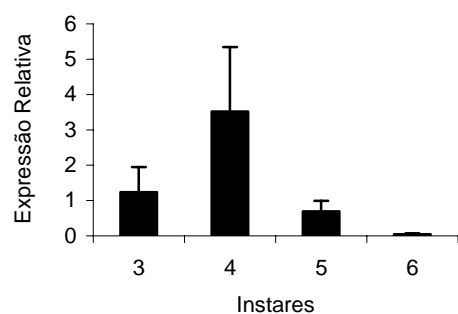


Figura 19- Expressão relativa do gene SfTry3 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O último gene de tripsina avaliado, o SfTry5, apresentou expressão detectável somente na dieta com inibidor (Figura 20). O padrão de expressão seguiu o mostrado para os genes SfTry3 e 4, com um pico de expressão, 1,77 vezes, no quarto instar.

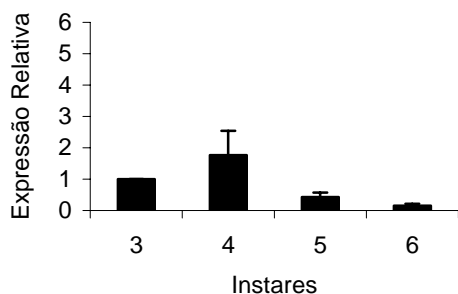


Figura 20- Expressão relativa do gene de tripsina SfTry5 na dieta com inibidor

#### 4.3.2.2 Expressão relativa dos genes de quimotripsinas

A avaliação da expressão dos genes de quimotripsinas do trato digestivo de larvas expostas de maneira crônica ao IPS, desde a eclosão das larvas, apesar de pequenas variações, não mostrou mudança significativa para o padrão observado no experimento onde as larvas foram alimentadas com IPS a partir do terceiro instar. Os oito genes apresentaram um padrão estável de expressão com relação aos níveis detectados no terceiro instar, tanto para a dieta com IPS quanto para a dieta sem o inibidor. Os genes de quimotripsina também apresentaram um aumento generalizado da expressão quando as larvas foram expostas ao IPS, particularmente no quarto instar. O padrão de aumento generalizado está de acordo com a estratégia de aumento da expressão de proteinases preexistentes e também da indução de novas proteinases.

O perfil de expressão do gene SfChy1 está representado na figura 21. Na dieta controle pode ser observado uma queda de expressão de 70% no 4° instar, 40% no 5° instar e 10% no 6° instar (Figura 21A). Na dieta com inibidor o 4° instar foi expresso 0,91 vezes o controle, no 5° instar a expressão caiu próximo à metade e no 6° instar foi de aproximadamente 30% (Figura 21B). Nas análises de comparação dos tratamentos a maior expressão foi no 4° instar, cerca de 25 vezes a dieta padrão (Figura 22).

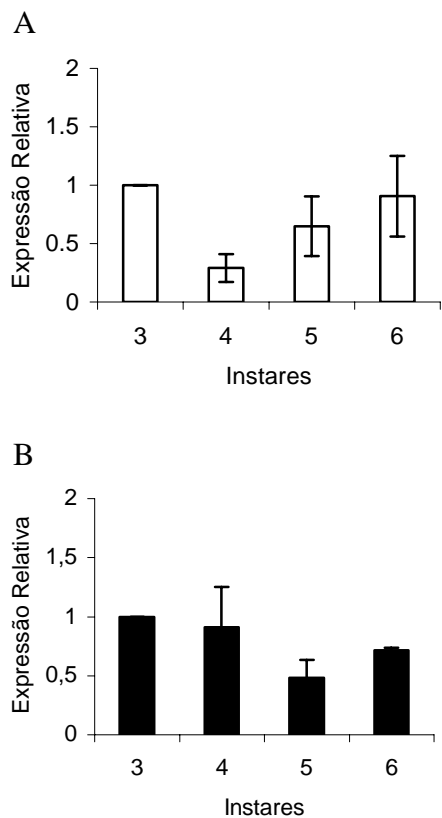


Figura 21- Expressão relativa do gene SfChy1 ao longo do 3, 4 , 5 e 6º instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

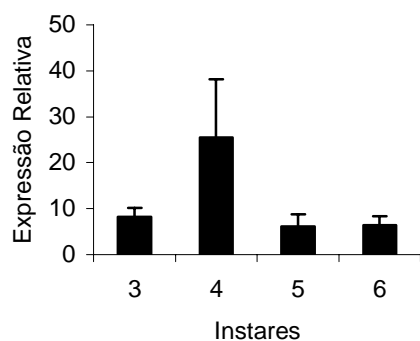


Figura 22- Expressão relativa do gene SfChy1 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O gene SfChy5 na dieta sem inibidor mostrou uma expressão no 4º instar próxima ao 3º instar (1,1 vezes), nos demais houve um aumento de 1,95 e 1,77 vezes (Figura 23A). Na dieta com inibidor o 4º instar também apresentou expressão foi semelhante ao ponto de comparação (Figura 23B). No 5 e 6º instar a expressão caiu 0,46 e 0,55 vezes. Na comparação entre as dietas

foram encontrados níveis de expressão maiores que 55 vezes, sendo predominantes picos de 234 vezes no 3º instar e de 244,5 vezes no 4º instar (Figura 24).

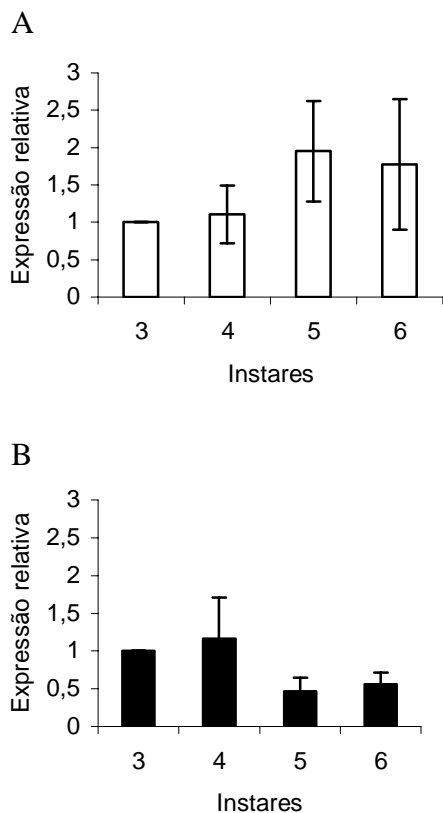


Figura 23- Expressão relativa do gene SfChy5 ao longo do 3, 4 , 5 e 6º instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

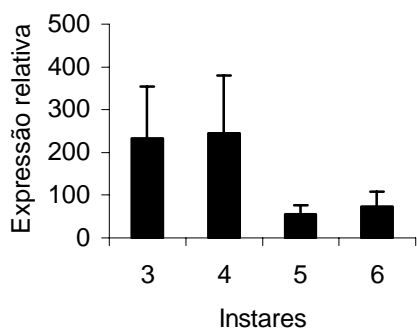


Figura 24- Expressão relativa do gene SfChy5 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O gene SfChy6 mostrou uma queda de expressão de 43% no 4º instar nos demais houve um aumento contínuo de 13 e 36% (Figura 25A). Na dieta com inibidor o 4º instar foi expresso 1,03 vezes o ponto de comparação (Figura 25B). No 5 e 6º instar a expressão caiu 0,34 e 0,32 vezes. Ao comparar o comportamento na dieta acrescida de inibidor em relação à dieta padrão os níveis de expressão observados foram de 141 vezes no 3º instar, 223 vezes no 4º, 50 vezes no 5º instar e 55 vezes no 6º instar (Figura 26).

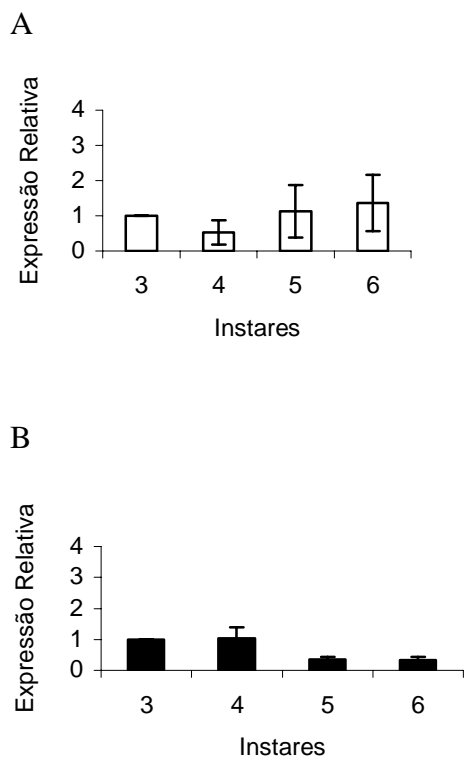


Figura 25- Expressão relativa do gene SfChy6 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

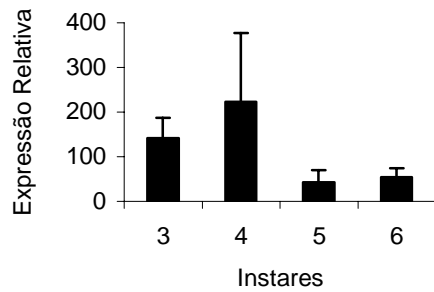


Figura 26 - Expressão relativa do gene SfChy6 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

No gene SfChy2 a expressão na dieta controle é representada na Figura 27A. Uma diminuição de 79% na expressão foi detectada no 4º instar. Nos estágios seguintes de desenvolvimento a expressão diminuiu apenas 36% no 5º instar e aumentou para 1,08 no 6º instar. Na dieta em que o inibidor foi incorporado, ocorreu um aumento de 1,72 vezes no 4º instar e 1,43 vezes no 6º instar (Figura 27B). O 5º instar mostrou queda de 5%. Comparando ambas dietas é possível notar que o pico de expressão ocorre no 4º instar sendo 30 vezes maior que o controle (Figura 28).

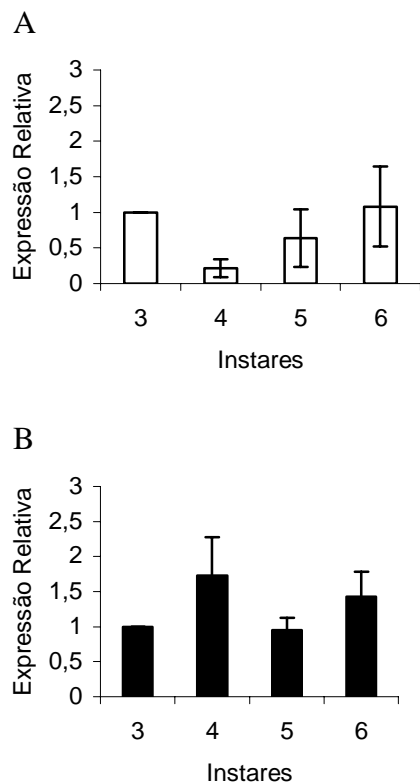


Figura 27- Expressão relativa do gene SfChy2 ao longo do 3, 4 , 5 e 6° instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

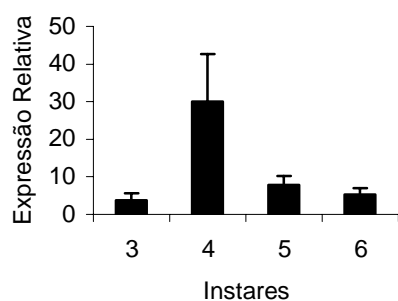


Figura 28- Expressão relativa do gene SfChy2 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O gene SfChy 4 mostrou para dieta sem inibidor queda 0,55 vezes no 4° instar e 0,81 vezes no 5° instar (Figura 29A). No 6° instar houve um aumento de 2.3 vezes. Na dieta com inibidor o gene aumentou a expressão 2,18 vezes no 4° instar, 1,11 vezes no 5° instar e 1,53 vezes no 6° instar (Figura 29B). Na comparação com o controle foi detectado um aumento de aproximadamente 3x no 3° instar, 12 x no 4° instar, 4x no 5° instar e 2x no 6° instar (Figura 30).



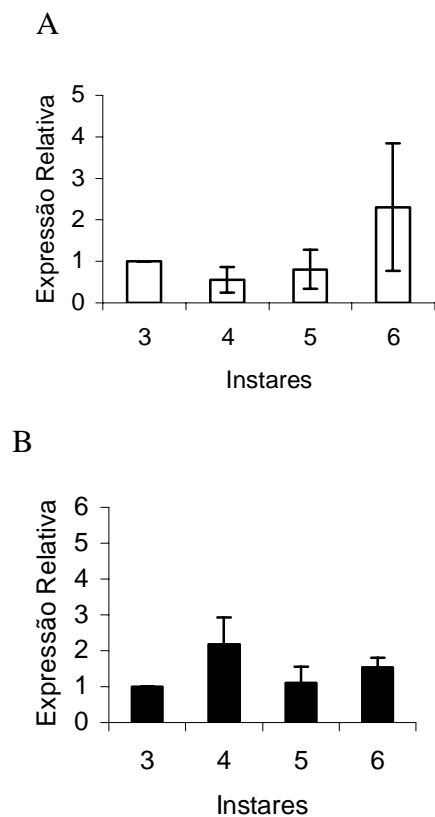


Figura 29- Expressão relativa do gene SfChy 4 ao longo do 3, 4 , 5 e 6° instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

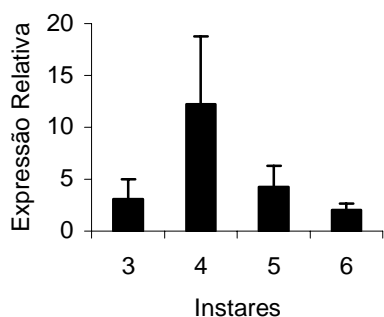


Figura 30- Expressão relativa do gene SfChy 4 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

Através da figura 31A pode ser verificado que o gene SfChy10 demonstra um aumento crescente na expressão do 4 para o 6 ° instar. Na dieta com o inibidor a expressão aumentou 2,06 vezes no 4° instar, se manteve no 5° instar (1,08 vezes) e caiu 0,2 vezes no último estágio (Figura

31B). Ao serem comparadas ambas fontes de alimento foi percebido níveis de expressão de 7,6 vezes no 3° instar e 14,5 vezes no 4° instar (Figura 32). Nos instares finais a expressão gênica foi de 3,6 vezes (5° instar) e 0,6 vez (6° instar).

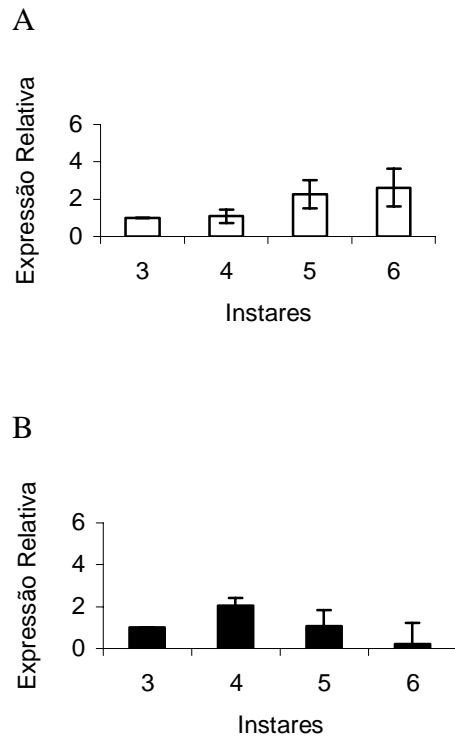


Figura 31- Expressão relativa do gene SfChy10 ao longo do 3, 4, 5 e 6° instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

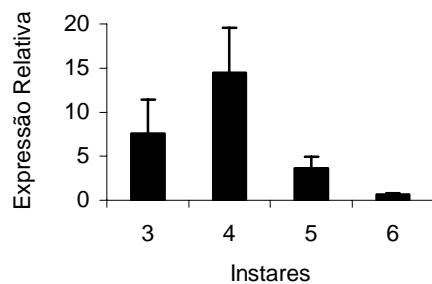


Figura 32- Expressão relativa do gene SfChy10 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

O gene SfChy3 na dieta controle diminuiu 48% a expressão no 4º instar (Figura 33A). Um aumento progressivo foi observado no 5 e 6º instar (1,37 e 1,65 vezes). Na presença do inibidor o gene aumentou 1,37 vezes no 4º instar, 1,56 vezes no 5º instar e 1,71 vezes no 6º instar (Figura 33B). Nas análises comparativas a maior expressão foi de 3,4x e ocorreu no 4º instar, as demais mostraram valores próximos a 1,5x no 3, 5 e 6º instar (Figura 34).

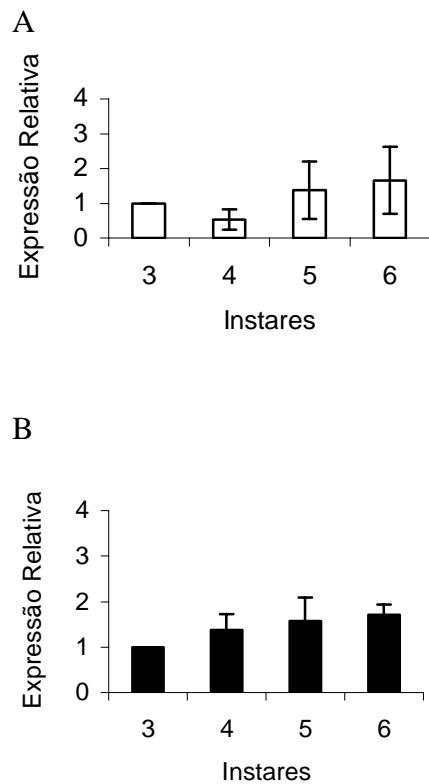


Figura 33- Expressão relativa do gene SfChy3 ao longo do 3, 4, 5 e 6º instares. A. Larvas alimentadas na dieta sem inibidor de soja. B. Larvas alimentadas na dieta com 0,5% de inibidor de soja

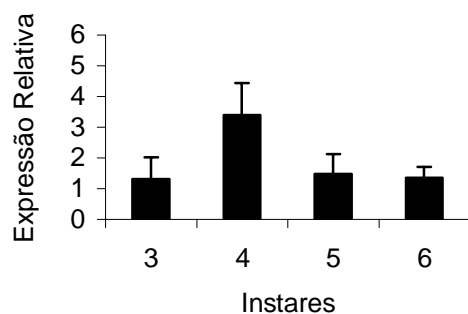


Figura 34- Expressão relativa do gene SfChy3 através da comparação dos dados obtidos para larvas alimentadas em 0,5% de inibidor de soja com relação aos dados obtidos pelas larvas alimentadas na dieta padrão

Por último o gene SfChy8 expresso apenas na dieta com inibidor (Figura 35). No 4<sup>o</sup> houve um aumento de quase 2 vezes em relação ao instar comparativo. Para o 5 e 6<sup>o</sup> instares uma queda progressiva de 0,67 e 0,33 vezes foi detectada.

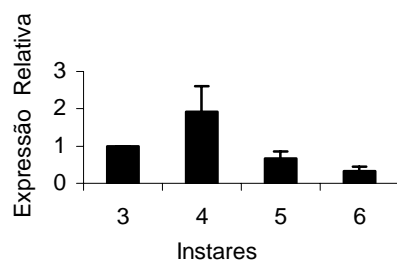


Figura 35- Expressão relativa do gene de tripsina SfChy8 na dieta com inibidor

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho aqui apresentado teve por objetivo esclarecer o papel que proteinases intestinais desempenham na adaptação de larvas de *Spodoptera frugiperda* à presença de inibidores de proteinases de soja (IPS) na dieta.

A avaliação da atividade proteolítica intestinal revelaram uma insensibilidade generalizada das proteinases de *S. frugiperda* após o contato com o IPS na dieta.

De um modo geral, todas as proteinases avaliadas foram induzidas pela presença do IPS, confirmando dados anteriores que haviam mostrado o mesmo comportamento das proteinases em experimentos de curta duração. A exposição crônica das larvas ao IPS fez com que as proteinases fossem induzidas de maneira semelhante e se mantivessem em nível elevado até o final do sexto instar. Em alguns casos, embora induzidas acima dos níveis do controle, algumas proteinases reduziram o nível de expressão com relação ao observado no quarto instar. Embora não tenha sido investigado pelo presente trabalho, suspeita-se que fatores relacionados ao desenvolvimento estejam alterando o padrão dessas proteinases.

Duas tripsinas que em trabalhos anteriores haviam sido relatadas como induzidas por IPS, no presente trabalho mostraram um padrão mais claro de insensibilidade quanto à presença do IPS na dieta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRYANT, J.; GREEN, T.B.; GURUSADDAIAH, I.; RYAN, C.A. Proteinase Inhibitor II from Potatoes: Isolation and Characterization of Its Protomer Components. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p.3418-3424.

BRIOSCHI, D. **Identificação e caracterização de genes envolvidos na adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) aos inibidores de proteinase de soja.** 2006. 86p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 128B, p. 365-75, 2001.

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n. 10, p. 827-833, 1986.

BOLTER, C.J.; JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 41, n. 12, p.1071-1078, 1995

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidoptera larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, London, v. 29, p. 278-90, 2004.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

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 black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 343-49, June 2003.

HAQ, S.K; ATIF, S.M; KHAN, RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 431, n. 1, p. 145-59, 2004.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, Washington, v. 92, n. 17, p. 8041-8045, Aug. 1995.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, n. 10, p. 885-895, Oct. 1997.

LARA, P.; ORTEGO, F.; GONZALEZ-HIDALGO, E.; CASTAÑERA, P.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, Amsterdam, v. 9, p. 169-178, 2000.

KIM, S.H; HARA, S; HASE, S.; IKENAKA, T; TODA, H.; KITAMURA, K; KAIZUMA, N., Comparative study on amino acid sequences of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Tia, Tib, and Tic. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 98, n.2, p. 435-48, 1985.

LASKOWSKI, M.J.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p.593-626, 1980.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H.F.G. A lagarta dos milharais. **O biológico**, São Paulo, v. 19, n.6, p.105-113, jun. 1953.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p.31-67, 1994.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 71-81, May/Aug. 2002.

MELVILLE, J.C.; RYAN, C.A. Chymotrypsin inhibitor I from potatoes. Large scale preparation and characterization of its subunit components. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 247, n. 11, p. 3445-3453, 1972

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T.C. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 322, n. 2, p. 469-474, Oct. 1995.

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, out./dez 1999

MOON, J.; SALZMAN, R.A.; AHN, J.E.; KOIWA, H.; ZHU- SALZMAN, K. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defense protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 283-91, June 2004.



MOSOLOV, V.V.; VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n.3, p. 227-246, 2005.

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

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 8. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 4, p.:697-715, 1973.

PAULILLO, L.C.M.S **Efeitos de inibidores de proteinase de soja sobre a ação, crescimento e metabolismo de proteinases intestinais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)** 1999. 72p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; PLÍNIO, T.C.; 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 proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 3, p 892-896, 2000.

PEARCE, G.; SY, L.; RUSSELL, C.; RYAN, C.A.; HASS, G.M. Isolation and Characterization from potato tubers of two polypeptide inhibitors of serine proteinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 213, n. 2, p. 456-462, Feb. 1982.

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, May 2001.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p.79-85, 2001.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz type soybean proteinase inhibitors effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, p. 217-24, 2003.

PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 22, n.1, p. 41-47, Jan. 1992.

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **The Biochemical Journal**, Colchester, v. 378, p. 705-716, 2004.

READ, J. W.; HAAS, W. Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Futher studies concerning potassium bromate and enzyme activity. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 15, 59, 1938.

RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 173-96, 1973.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. **BioEssays**, Cambridge, v. 10, n. 1, p.20-24, 1989.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-49, Sept.1990.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 11, p. 132-154, 2006.

SILVA, F.C.B.L.; ALCAZAR, A.; MACEDO, L.L.P.; OLIVEIRA, A.S.; MACEDO, F.P.; ABREU, L.R.D.; SANTOS, E.A.; SALES, M. P. Digestive enzymes during development of *Ceratitidis capitata* (Díptera:Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 7, p.561-569, July 2006.

SIVAKUMAR, S.; MOHAN, M.; THAYUMANAVAN, B. Characterization of insect proteinases and their inhibition by finger and little millet inhibitors. **Journal of Plant Biochemistry Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 167-71, 2005.

VOLPICELLA, M.; LUIGI, R.C.; CORDEWENER, J. AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **FEBS Journal**, Oxford, v. 270, p. 10-19, 2003.

WASH, T.A.; TWICHELL, W.P. Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 15-18, 1991