Daniela Brioschi
Engenheira Agrônoma

Identificação e caracterização de genes envolvidos na adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) aos inibidores de proteinase da soja

Orientador:

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho

**Tese apresentada, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2006

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

Brioschi, Daniela

Identificação de genes envolvidos na adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) aos inibidores de proteinase de soja / Daniela Brioschi. -- Piracicaba, 2006.
86 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Inibidores de proteinase da soja 2. Interação planta-inseto 3. Lagarta-do-cartucho
I. Título

CDD 632.78

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

Aos meus familiares e amigos que
continuamente me apóiam e
incentivam,
DEDICO

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela orientação, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao Dr. Daniel Scherer de Moura, jovem pesquisador do Departamento de Genética da ESALQ - USP, pela orientação e incentivo;

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar e ao Dr. Mário Henrique Bengtson, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química – USP, pela colaboração e orientação na elaboração das bibliotecas subtrativas de *Spodoptera frugiperda*;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, e à Neide G. Zério do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ - USP, por fornecer as lagartas utilizadas neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ - USP, pelas análises de seqüenciamento;

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

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela amizade, ensinamentos e incentivo em todos os momentos;

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ – USP, pela oportunidade, apoio técnico e companheirismo;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos;

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão Bibliográfica.....	15
2.1.1 Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
2.1.2 Digestão de insetos.....	16
2.1.2.1 Serino-proteinases.....	17
2.1.3 Inibidores de proteinase.....	18
2.1.3.1 Inibidores de serino-proteinases.....	19
2.1.4 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase.....	20
2.1.5 Métodos de análise de expressão gênica diferencial	22
2.2 Material e Métodos	25
2.2.1 Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase da soja.....	25
2.2.2 Criação das lagartas em laboratório.....	25
2.2.3 Preparo do extrato intestinal de <i>S. frugiperda</i> para testes bioquímicos.....	26
2.2.4 Quantificação de proteína	26
2.2.5 Determinação da atividade enzimática.....	26
2.2.6 Gel de atividades.....	27
2.2.7 Preparação das bibliotecas subtrativas.....	28
2.2.7.1 Construção das bibliotecas de subtração pelo método de SSH.....	28
2.2.7.1.1 Extração do RNA das lagartas (controle e alimentadas com IP).....	28
2.2.7.1.2 Isolamento do RNA mensageiro (RNAm)	29
2.2.7.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA.....	30
2.2.7.1.4 Síntese da segunda fita de cDNA e amplificação.....	31
2.2.7.1.5 PCR subtrativo supressivo.....	31
2.2.7.1.6 Purificação e Clonagem dos produtos de PCR	34
2.2.7.2 Construção das bibliotecas de subtração por RDA.....	34
2.2.7.2.1 Síntese de cDNAs.....	34

2.2.7.2.2 Hibridização subtrativa	35
2.2.8 Sequenciamento dos clones	36
2.2.8.1 Extração dos plasmídeos	36
2.2.8.2 Sequenciamento utilizando "Big Dye Terminator"	38
2.2.8.3 Sequenciamento utilizando "DYEnamic ET Terminator"	38
2.2.9 Caracterização das seqüências obtidas via estudo comparativo com seqüências depositadas em bancos de dados.....	39
2.2.10 Confirmação da expressão diferencial	39
2.2.10.1 PCR em tempo real.....	39
2.3.2.4.4 Curvas de calibração e eficiência	40
2.2.10.2 Extração do RNA total e preparação do cDNA	41
2.2.10.4 Análise de resultados de PCR em tempo real.....	41
2.3 Resultados	42
2.3.1. Atividade de tripsina em lagartas de <i>S. frugiperda</i>	42
2.3.2 Atividade de quimotripsina em lagartas de <i>S. frugiperda</i>	42
2.3.3 Detecção das proteinases digestivas por gel de atividade	43
2.3.4 Construção das bibliotecas de SSH	47
2.3.5 Construção das bibliotecas por RDA	50
2.3.6 Caracterização das bibliotecas subtrativas	52
2.3.7 Alinhamento das seqüências de proteases diferencialmente expressas	53
2.3.8 PCR em tempo real.....	60
2.3.8.1 Expressão relativa dos transcritos	60
2.4 Discussão	70
2.4.1 Ensaio enzimáticos	70
2.4.2 Bibliotecas Subtrativas.....	72
2.4.3 Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real	73
3 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

Identificação e caracterização de genes envolvidos na adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) aos inibidores de proteinase de soja

As plantas produzem inibidores de proteinase como forma de defesa contra o ataque de insetos. Esses inibidores atuam ligando-se as proteinases localizadas no aparelho digestivo dos insetos fitófagos, impedindo assim a atividade proteolítica. No entanto, um número crescente de estudos tem mostrado que algumas espécies de insetos são capazes de adaptar-se aos inibidores de proteinase. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar genes de *Spodoptera frugiperda* envolvidos na adaptação da lagarta aos inibidores de proteinase da soja. Para tanto, foram realizados experimentos onde lagartas de último instar alimentaram-se com dieta artificial contendo inibidores de soja na concentração de 0 e 0.5% (p/p). Após 12 horas de alimentação o trato digestivo destas lagartas foi removido e a partir deste tecido foram construídas bibliotecas de cDNA subtrativo. Destas bibliotecas foram analisadas mais de 2000 seqüências gênicas, onde se destacaram as proteinases digestivas (provenientes da biblioteca "Forward") como possíveis responsáveis pela adaptação. Todas as seqüências de tripsinas e quimotripsinas foram alinhadas e comparadas, resultando na escolha de oito quimotripsinas e três tripsinas para confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Os resultados encontrados demonstram que as lagartas de *S. frugiperda* conseguem se adaptar fisiologicamente aos inibidores de proteinase da soja através da indução de quimotripsinas e tripsinas já existentes e também pela produção "de novo" destas enzimas.

Palavras-chave: Interação planta-inseto; Inibidores de proteinase; *Spodoptera frugiperda*; Adaptação, Biblioteca subtrativa.

ABSTRACT

Identification and characterization of genes involved in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) adaptation to soybean proteinase inhibitors

Plants produce proteinase inhibitors as a form of defense against insect attack. These inhibitors act by binding to insect midgut proteolytic enzymes, rendering them inactive by competitive inhibition. However, an increasing number of studies shown that some species of insects are able to adapt to proteinase inhibitors. The objective of this study was to identify and characterize genes involved in *Spodoptera frugiperda* adaptation to soybean proteinase inhibitors. Experiments were carried out using last instar larvae fed on artificial diet containing 0 and 0.5% (w/w) soybean inhibitors. After 12 hours the larvae guts were excised and used to construct cDNA subtractive libraries. More than 2000 sequences from these libraries were analyzed and indicated that digestive proteases (from "Forward" library) could be responsible for the adaptation. All trypsin and chymotrypsin sequences were aligned and compared, resulting in the selection of eight chymotrypsin and three trypsin genes for quantitative analysis in real time PCR. The results demonstrated that *S. Frugiperda* larvae is able to adapt to soybean proteinase inhibitors by up-regulating trypsin and chymotrypsin genes and also for "de novo" production of these enzymes.

Keywords: Plant-insect interaction; Proteinase inhibitors; *Spodoptera frugiperda*; Adaptation, Subtractive hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos.....	17
Figura 2 – Diagrama esquemático da metodologia de SSH.....	33
Figura 3 – Diagrama esquemático da metodologia de RDA.....	37
Figura 4 - Atividade das enzimas tipo tripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	44
Figura 5 - Atividade das enzimas tipo quimotripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	45
Figura 6 – Visualização da atividade das proteinases digestivas de <i>S. frugiperda</i>	46
Figura 7 – Eletroforese dos cDNAs de <i>S. frugiperda</i> antes e após a digestão com <i>Rsa</i> I, em gel de agarose 1%.....	48
Figura 8 – Teste da eficiência de ligação aos adaptadores, em gel de agarose 1%.....	49
Figura 9 – Validação da biblioteca pela confirmação da presença do inserto no clone recombinante.....	49
Figura 10 – Fragmentos de cDNA de <i>S. frugiperda</i> alimentadas em dieta artificial, amplificados por PCR por um número variado de ciclos.....	51
Figura 11 – Produtos diferenciais (DP) obtidos pela subtração por RDA, em gel de 1% agarose Produtos provenientes da biblioteca “Forward”.....	51

Figura 12 – Comparação funcional das seqüências encontradas nas bibliotecas subtrativas de <i>S. frugiperda</i> “Forward” e “Reverse”	59
Figura 13 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	62
Figura 14 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	63
Figura 15 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	63
Figura 16 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	64
Figura 17 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	64
Figura 18 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	65
Figura 19 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	65
Figura 20 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	66
Figura 21 – Comparação do nível de expressão entre as diferentes isoformas de quimotripsinas.....	67
Figura 22 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	68
Figura 23 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	68
Figura 24 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real.....	69
Figura 25 – Comparação do nível de expressão entre as diferentes isoformas de tripsinas.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes de lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas à dieta contendo (0.5%) IP de soja, biblioteca “Forward”	54
Tabela 2 – Genes de lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas à dieta sem IP de soja, biblioteca “Reverse”	57
Tabela 3 – Seqüência dos iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo real..	62

1 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) é uma espécie polífaga, que ataca culturas de importância econômica em diversos países. No Brasil, está entre as principais pragas da cultura do milho (VIANA, 1994). Em condições climáticas favoráveis aumenta sua população, destruindo folhas e cartucho, comprometendo assim, a produção de grãos (PENCOE; MARTIN, 1981). Os seus danos podem chegar a 34% de quebra de produção, comprometendo severamente a rentabilidade da cultura (CARVALHO, 1970).

O controle desta praga tem sido realizado principalmente pelo uso de produtos químicos. Tal controle é dificultado pelo hábito da praga, que permanecendo dentro do cartucho das plantas, torna difícil o contato com os inseticidas. Sabe-se, porém, que o uso indiscriminado de um produto químico pode levar à evolução da resistência a níveis bastante críticos, além de provocar desequilíbrio biológico, contaminação do ambiente, distúrbios toxicológicos e também econômicos.

Diante disso, novas alternativas estão sendo buscadas para o manejo das pragas. Uma das possibilidades envolve o uso dos inibidores de proteinases (IP) de plantas. Os IP são proteínas de defesa, que podem ser constitutivas ou sintetizadas em resposta ao ataque dos insetos. Estas proteínas estão presentes em diversas plantas e são capazes de se ligar às enzimas digestivas dos insetos e inibir a ação destas de uma forma competitiva (RYAN, 1990).

No entanto, muitos insetos são capazes de se adaptar a presença dos IP. Para isso utilizam diversos mecanismos, entre eles (1) superprodução de enzimas digestivas (DE LEO et al., 1998); (2) expressão de enzimas insensíveis ao inibidor (BOLTER; JONGSMA, 1995; BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; BRITO et al., 2001; MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY, 2001; JONGSMA et al., 1995; PATANKAR et al., 2001); ou (3) ativação de enzimas hidrolíticas que degradam os inibidores (GIRARD

et al., 1998; GIRI et al., 1998 MICHAUD; CANTIN; VRAIN, 1995; ZHU-SALZMAN et al., 2003).

Paulillo et al. (2000), observaram alterações na atividade enzimática de *S. frugiperda*, quando o inseto foi submetido à dieta contendo IP de soja. Tais alterações foram relacionadas à adaptação das lagartas aos IP, visto que o consumo de dieta artificial contendo IP de soja não reduziu o crescimento, nem tão pouco o desenvolvimento dos insetos. Todos os parâmetros biológicos avaliados (mortalidade inicial, comprimento do período larval e peso pupal) não apresentaram diferenças significativas entre as lagartas do tratamento controle e aquelas que se alimentaram da dieta contendo IP de soja.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo verificar com mais profundidade o mecanismo de adaptação de *S. frugiperda* aos efeitos dos inibidores de proteinase da soja. Buscando identificar e analisar os genes envolvidos nesta adaptação e também analisar a cinética das respostas transcricionais das proteases digestivas desta praga em presença do inibidor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda*

S. frugiperda é uma espécie com ampla distribuição nas Américas, ocorrendo preferencialmente em regiões de clima quente (PEDIGO, 1989). No Brasil, este lepidóptero é popularmente conhecido como lagarta-do-cartucho do milho, e possui o hábito de infestar e danificar as folhas jovens da cultura do milho.

Apesar de preferir infestar gramíneas, *S. frugiperda* é uma espécie polífaga, com ocorrência em milho, sorgo, trigo, amendoim, arroz, pastagem, linho, algodão, berinjela, batata além de plantas ornamentais e silvestres (RIZZO; LA ROSSA, 1992).

As mariposas de *S. frugiperda* apresentam reprodução sexuada. Em dieta artificial, Nalim (1991) obteve média de 254 ovos por postura num total de 2174 ovos por fêmea, o que evidencia a alta capacidade reprodutiva desta espécie. Os ovos são depositados na página superior das folhas, após três dias nascem às lagartas que passam a alimentarem-se, de preferência, das folhas mais novas do milho. Nessa fase atacam as folhas centrais, destruindo-as completamente. A duração do período larval é de 12 a 30 dias, sendo que na fase final a lagarta mede 50mm de comprimento. Sua coloração varia de verde até parda escura, apresentando três linhas longitudinais branco-amareladas na parte dorsal do corpo. Ao final do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em crisálidas. O período pupal é de 21-50 dias (GALLO et al., 2002).

Devido ao canibalismo é comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho. Nalim (1991) estudando a biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *S. frugiperda* concluiu que ocorre canibalismo em lagartas

criadas em dietas naturais e artificiais e que o canibalismo é inversamente correlacionado com a qualidade nutricional do alimento.

2.1.2 Digestão de insetos

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídeos e esteróides. Desta forma, a quantidade e qualidade do alimento consumido afetam o desenvolvimento biológico dos insetos, influenciando taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento, sobrevivência, fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos (PARRA, 1991).

A digestão é realizada por uma série de enzimas que atuam em seqüência e vão reduzindo os polímeros presentes no alimento a moléculas cada vez menores. As enzimas digestivas são denominadas hidrolases, sendo peptidases enzimas que atuam sobre ligações peptídicas, glicosilases enzimas que clivam ligações internas em polissacarídeos e as lipídeo-hidrolases que quebram lipídeos (TERRA et al., 1996).

As proteases (peptídeo-hidrolases) incluem as proteinases (endopeptidases) e as exopeptidases. As proteinases são divididas em sub-classes com base no seu mecanismo catalítico em: serino-proteinase, cisteino-proteinase, aspartato-proteinase e metaloproteinase. Por sua vez, as exopeptidases incluem enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou da extremidade C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica. As enzimas específicas para desmembrar dipeptídeos são chamadas de dipeptídeo-hidrolases (TERRA; FERREIRA, 1994).

O tubo digestivo dos insetos é dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. O intestino médio corresponde à parte responsável pela maior parte da digestão, onde ocorrem a absorção de nutrientes e a secreção das enzimas digestivas. No intestino médio da maioria dos insetos, o bolo alimentar é envolvido por uma camada acelular semipermeável composta por quitina e proteínas, denominada membrana peritrófica (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos

Fonte: Adaptado de TERRA, 1991.

2.1.2.1 Serino-proteinases

As serino-proteinases são as principais enzimas hidrolíticas detectadas no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera (APPLEBAUM, 1985). Estas enzimas possuem em seu sítio ativo, a chamada tríade catalítica: serina, histidina e ácido aspártico. Esses aminoácidos apresentam propriedades especiais que permitem a ligação ao substrato e a conseqüente catálise. Dentre as serino-proteinases destacam-se as tripsinas, quimotripsinas e elastases que são importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (GEOFFROY; LEGRAND; FRITING, 1990).

As enzimas do tipo tripsina clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região da carboxila de aminoácidos básicos como lisina e arginina. A maioria das tripsinas de insetos possuem massa molecular na faixa de 20 a 35 kDa e pH ótimo de 8 a 10 (TERRA et al., 1996). Embora as tripsinas de insetos tenham semelhanças estruturais às tripsinas de vertebrados, nos insetos as tripsinas diferem quanto à

especificidade aos substratos e a interação com inibidores de proteinase (PURCELL; GREENPLATE; SAMMONS, 1992). Outra diferença marcante é que as tripsinas dos insetos não necessitam da presença de íons cálcio para serem ativadas ou estabilizadas (TERRA; FERREIRA, 1994).

As quimotripsinas são enzimas que clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região da carboxila de aminoácidos aromáticos. A maioria das quimotripsinas de insetos possui massa molecular na faixa de 20 a 30kDa e pH ótimo de 8 a 11 (TERRA; FERREIRA, 1994).

Elastases verdadeiras foram descritas para as espécies como *Teleogryllus commodus* (CHRISTELLER et al., 1990), *Lymantria dispar* (VALAITIS, 1995), *Solenopsis invicta* (WHITWORTH; BLUM; TRAVIS, 1998). Porém parte das elastases já descritas, para outras espécies podem ser na verdade quimotripsinas, devido a semelhança de especificidade destas enzimas para alguns substratos (TERRA; FERREIRA, 2005).

2.1.3 Inibidores de proteinase

Desde 1938 já se conhece que as plantas contêm peptídeos que atuam como inibidores de proteinases (READ; HAAS, 1938 apud LIENER, 1994). Os inibidores de proteinase de plantas são pequenas proteínas, geralmente presentes em alta concentração em tecidos de reserva, mas também detectadas em folhas, em resposta ao ataque de insetos (RYAN, 1990).

A atividade dos IP se deve a capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvos, bloqueando, alterando e prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima. São encontrados em várias plantas, principalmente naquelas pertencentes às famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae. Eles desempenham várias funções importantes, incluindo a regulação de proteinases endógenas relacionadas aos processos de dormência e germinação, o acúmulo de proteínas de reserva ricas em aminoácidos sulfurados e a proteção das plantas contra o ataque de insetos e microrganismos (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2004).

Estes inibidores de plantas funcionam como substratos específicos para as proteinases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (TIFFIN; GAUT, 2001). Os IP atuam causando uma deficiência em aminoácidos que interfere no crescimento e desenvolvimento dos insetos, podendo eventualmente causar a sua morte devido à inibição das proteinases digestivas ou devido à produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (JONGSMA; BOLTER, 1997).

Uma grande variedade de IP tem sido estudada para utilização na proteção das culturas. Hoje são reconhecidas 59 famílias distintas de inibidores de proteinase (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2004). Um considerável número de revisões já foi escrito sobre IP, cobrindo áreas específicas do conhecimento (BODE; HUBER, 1992; CHRISTELLER, 2005; DE LEO, et al., 2002; LASKOWSKI; QASIM, 2000; MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003; RYAN, 1990; XAVIER-FILHO, 1992). Existem quatro grandes famílias de IP, incluindo aqueles que inibem proteinases do tipo serina, cisteína, aspartato, e metalocarboxipeptidases.

2.1.3.1 Inibidores de serino-proteinases

Os inibidores de proteinase melhor caracterizados são os inibidores das serino-proteinases. Eles são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas e em quantidades menores em cereais e tubérculos (RICHARDSON, 1991). Os inibidores de serino proteinase são agrupados em 16 famílias, baseando-se na similaridade de sua seqüência e no mecanismo de ligação à proteína (RYAN, 1990).

No caso das plantas de soja em particular, duas classes de inibidores de proteinase são bem caracterizadas: os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk. O inibidor do tipo Bowman-Birk, apresenta peso molecular de 8 a 10kDa, alto conteúdo de cisteínas, alta proporção de pontes de dissulfeto, e possui atividade inibitória contra tripsinas e quimotripsinas. Já o inibidor do tipo Kunitz apresenta peso molecular da

ordem de 20kDa, duas pontes de enxofre, baixo conteúdo de cisteínas e possui especificidade contra a ação de tripsina. (LIENER, 1994). Além de sua atividade inibitória, o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz é uma das principais proteínas armazenadas nas sementes (LEE et al., 1999).

2.1.4 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase

Os IP reduzem a atividade proteolítica das enzimas digestivas de um grande número de insetos (CHRISTELLER; SHAW, 1989; TAMHANE et al., 2005). Alguns insetos apresentam uma redução significativa no crescimento em função da ingestão crônica destes inibidores incorporados em dietas artificiais (BROADWAY; VILLANI, 1995; FRANCO et al., 2004; JOHNSTON et al., 1993, POMPERMAYER, et al., 2001) ou quando presentes em níveis elevados na planta (OROZCO-CARDENAS et al., 1993; DE LEO et al., 2002). No entanto, tem-se observado que algumas espécies de insetos não são susceptíveis aos inibidores de proteinase.

Os insetos desenvolveram diferentes estratégias para superar os efeitos negativos causados pelos IP presentes em suas plantas hospedeiras. Uma das maneiras é a superprodução de enzimas digestivas. Broadway; Duffey (1986) verificaram que as *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea*, na presença do inibidor não apresentaram redução na atividade proteolítica e sim uma super produção das enzimas sensíveis ao inibidor. Também Gatehouse et al. (1999) observaram que a atividade proteolítica das lagartas de *Lacanobia oleracea* aumentava até quatro vezes quando em presença do inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (SKTI). Resultados semelhantes foram obtidos por De Leo et al. (1998), onde encontram enzimas sendo super expressas quando *Spodoptera littoralis* se alimentava de plantas transformadas com o inibidor de tripsina de mostarda tipo II.

Outro mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese de proteinases menos sensíveis ao inibidor. Estas enzimas podem ser proteinases secretadas normalmente no tubo digestivo ou podem ser ativadas após a ingestão de inibidores de proteinase (BROADWAY, 1996). Bolter; Jongsma (1995) observaram que lagartas de

Leptinotarsa decemlineata quando criadas em dieta à base de plantas de batata, apresentavam uma atividade proteolítica reduzida em 42%. Entretanto, os autores observaram o aumento de uma atividade triptica insensível ao inibidor, cerca de duas vezes maior quando comparadas aos insetos do tratamento controle. Broadway (1996) trabalhando com *Heliothis zea* alimentadas com IP incorporado na dieta observou que as lagartas foram capazes de aumentar de 2,5 a 3 vezes a produção de uma proteinase pouco sensível ao inibidor. Também Paullilo et al. (2000) demonstraram que lagartas de *S. frugiperda* não foram afetadas pela ingestão crônica de IP de soja, devido à presença de novas atividades proteolíticas insensíveis ao inibidor. Patankar et al. (2001) mostraram que lagartas de *Helicoverpa armigera* eram capazes de superar os efeitos de vários IP de plantas hospedeiras alterando a composição das enzimas do trato digestivo após a ingestão destes IP. Bown, Wilkinson; Gatehouse. (2004) analisaram o padrão de expressão de enzimas de *H. armigera* resistentes ao inibidor de soja tipo kunitz. Verificaram que 12 horas após a ingestão do inibidor as lagartas já estavam expressando enzimas insensíveis ao IP.

A síntese de enzimas que promovem a degradação dos IP de plantas no lúmen intestinal dos insetos, consiste em outra forma adaptativa. Michaud; Cantin; Vrain (1995) observaram a degradação proteolítica de orizacistatina II por proteinases de *Otiorynchus sulcatus*, praga que ataca cotilédones. Giri et al. (1998) observaram que *H. armigera*, além de ser capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, sintetizou proteinases capazes de degradar os inibidores de sementes de *Cicer arietinum*. O mesmo mecanismo foi encontrado por Girard et al. (1998) no trato digestivo de *Phaedon cochleariae*.

Aparentemente os insetos polípagos conseguem utilizar uma combinação destas diferentes estratégias para driblar os efeitos dos IP. Zhu-Salzman et al. (2003) verificaram que o coleóptero *Callosobruchus maculatus* se adapta ao inibidor remodelando quantitativa e qualitativamente suas proteases digestivas. Na presença do inibidor de cisteino-proteinase da soja o inseto aumentou sua atividade enzimática, produziu enzimas insensíveis e ativou proteases que degradaram o inibidor.

Em uma abordagem mais ampla sobre o efeito do inibidor de cisteino-proteinase da soja em *Callosobruchus maculatus*, Moon et al. (2004) observam uma série de

eventos relacionados à adaptação dos insetos aos IP. Além da ativação de enzimas envolvidas com a proteólise os insetos ativaram genes responsáveis pela defesa, detoxificação, genes com funções ainda desconhecidas e também genes ainda não descritos.

Entender as propriedades moleculares das proteinases digestivas dos insetos é fundamental para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela adaptação aos IP. Volpicella et al. (2003), estudando as enzimas do tipo tripsina de lagartas de *Helicoverpa zea* adaptadas e não adaptadas ao inibidor do tipo Kunitz de soja, constataram uma série de diferenças entre as enzimas. Os autores verificam que substituições e/ou inserções de aminoácidos nas regiões de interação entre a enzima e o inibidor são diferenças fundamentais entre enzimas sensíveis e insensíveis.

Novas tripsinas e quimotripsinas insensíveis aos IP estão sendo caracterizadas (GRUDEN et al., 2004; VOLPICELLA et al., 2006) com o intuito de ampliar o entendimento sobre esta estratégia adaptativa dos insetos.

2.1.5 Métodos de análise de expressão gênica diferencial

Diversas técnicas foram desenvolvidas, para a identificação de genes diferencialmente expressos, dentre as quais estão: "differential display", análise serial da expressão gênica (SAGE), microarranjos de DNA e técnicas baseadas em hibridização subtrativa, como "suppression subtractive hybridization" (SSH) e "representational difference analysis" (RDA).

O "differential display" compreende a amplificação de uma subpopulação de fragmentos dos genes expressos, usando iniciadores arbitrários. Os fragmentos amplificados são separados em gel e comparados entre as condições experimentais. As bandas diferenciais são cortadas, purificadas do gel e identificadas por seqüenciamento de DNA (LIANG; PARDEE, 1992).

O SAGE baseia-se no princípio de que seqüências curtas de 9 a 10 pares de base são suficientes para identificar, todos os RNAm expressos. Assim, os cDNAs são sintetizados a partir dos RNAm utilizando como iniciadores uma seqüência de oligo-

d(T) biotilado e digeridos com uma enzima que reconhece 4 pares de base. As frações dos cDNAs mais próximas as extremidades 3' são capturadas por estreptavidina ligada a partículas magnéticas, e seletivamente purificados. No sítio da enzima de restrição destas regiões é ligado um adaptador contendo um sítio para *BsmF1*, uma enzima que cliva a 12 pares de base de sua sequência de reconhecimento. Assim, após digestão com esta enzima, cada mensageiro gera um único "tag" (etiqueta) de 9 pares de base. Os "tags" são ligados entre si e sequenciados, gerando uma tabela de frequência de cada "tag". Comparando esta tabela entre as condições de diferentes tratamentos, os genes diferencialmente expressos são identificados (VELCULESCU et al., 1995).

Na técnica de microarranjos de DNA ("microarrays"), seqüências conhecidas de cDNA de milhares de genes são organizadas sobre lâminas de vidro. As duas populações de RNAm que se quer comparar são transcritas a cDNA, cada uma das quais na presença de nucleotídeos marcados com fluorocromos diferentes. A seguir, os cDNAs marcados com fluorocromos são desnaturados, misturados na mesma proporção e hibridizados com os cDNA fixados na lâmina. As lâminas são expostas à luz de comprimentos de onda apropriados e os sinais registrados através de imagens. A comparação entre as duas imagens geradas permite a identificação dos genes diferencialmente expressos (SCHENA et al., 1995).

Já para hibridização subtrativa, as amostras de cDNA contendo os genes diferencialmente expressos que se quer identificar, são ligadas a adaptadores em sua porção 5', desnaturadas e renaturadas na presença de excesso de cDNA da condição controle. Na etapa seguinte, os híbridos diferencialmente expressos contendo adaptadores nas duas extremidades são seletivamente amplificados por PCR. Os cDNAs obtidos são clonados, gerando uma biblioteca enriquecida para genes diferencialmente expressos. No RDA, esta hibridização pode ser executada diversas vezes, gerando bibliotecas altamente enriquecidas (HUBANK; SCHATZ, 1994). No SSH, a etapa de normalização equaliza a abundância de cDNAs dentro da população estudada, o que favorece o enriquecimento de seqüências pouco expressas (DIATCHENKO et al., 1996).

Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens. O "differential

display" tem como vantagem o fato de ser um processo relativamente rápido, além de permitir trabalhar com pequena quantidade de amostra inicial. Entretanto, esta técnica apresenta uma alta taxa de falsos positivos (HUBANK; SCHATZ, 1994). O SAGE permite a análise de muitas amostras ao mesmo tempo, porém exige seqüenciamento automatizado em grande escala para se chegar às seqüências pouco expressas. Os macroarranjos são extremamente rápidos e eficientes, mas só identificam genes ou seqüências já conhecidas, além de serem relativamente caros. As bibliotecas de subtração são muito sensíveis e eficientes, porém trabalhosas (PASTORIAN, HAWEL III, BYUS, 2000).

A técnica utilizada no presente trabalho para a identificação de genes regulados pela presença dos IP de soja na dieta de *S.frugiperda* foi a de construção de bibliotecas de subtração. Esta escolha foi feita com base na possibilidade de identificar genes novos incluindo genes de baixa expressão.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase da soja

Os IP foram extraídos a partir de sementes de soja, variedade Cometa, por homogeneização de 100g de grãos triturados em 1000mL de NaCl (150mM) durante uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em gaze a fim de remover o material sólido. O filtrado foi centrifugado a 3000g durante 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, adicionou-se um volume quatro vezes maior ao sobrenadante de acetona gelada, em condições de agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6000g durante 20 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi seco ao ar e moído. O produto desta extração foi denominado inibidor de proteinase parcialmente purificado, o qual contém os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (adaptado de BROADWAY, 1995).

A quantidade de IP presente no produto de extração foi calculada usando o programa Enzifitter (Elsevier Biosoft). Após a quantificação os inibidores foram adicionados à dieta artificial a base de feijão e germe de trigo (PARRA, 1998).

2.2.2 Criação das lagartas em laboratório

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797), Lepidoptera: Noctuidae, utilizadas nos ensaios, 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 foram mantidos em tubos de vidro (2.5cm de diâmetro e 8.0cm de altura), tampados com algodão e alimentados com dieta artificial à base de feijão e germe de trigo (PARRA, 1998). Ao atingirem o último ínstar parte das lagartas foi

transferida para dieta artificial contendo inibidor de proteinase de soja na concentração de 0.5% (p/p).

2.2.3 Preparo do extrato intestinal de *S. frugiperda* para testes bioquímicos

Lagartas de último ínstar permaneceram nas dietas contendo 0% (controle) e 0.5% de IP de soja por 12, 24 e 36 horas. Após estes períodos as lagartas foram imobilizadas em gelo para extração do intestino médio. Estes foram removidos com auxílio de pinças em uma solução 125mM de NaCl gelada. Lotes de 15 intestinos (membranas peritróficas juntamente com o conteúdo alimentar) foram homogeneizados em água Milli-Q gelada, utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjen. Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -15°C (FERREIRA et al., 1994).

2.2.4 Quantificação de proteína

A concentração de proteínas no extrato intestinal de lagartas de *S. frugiperda* foi determinada com base na metodologia descrita por Bradford (1976).

Determinou-se a concentração protéica das amostras pelo espectrofotômetro com base na densidade ótica de 590nm, tomando-se como referência uma curva padrão construída com BSA (soro albumina bovina) com concentrações de proteína variando de 0.5 a 15µg.

2.2.5 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, foi feita uma curva de quatro tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) a 30°C. A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) e a atividade da

quimotripsina foi medida pela hidrólise do substrato N-succinyl-alanine-proline-phenylalanine p-nitroanilide (S(Ala)₂ProPhe pNA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410nm e determinada a atividade enzimática em nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína.

O BApNA foi utilizado a uma concentração de 1mM, enquanto o S(Ala)₂ProPhe pNA a de 0.1mM. Os substratos foram dissolvidos em 0.8% (v/v) de dimetilformamida (solvente orgânico) e o volume completado com a solução Tris-HCl (0.1M) em pH 8.0. A reação foi interrompida com ácido acético 30%, sendo em seguida feita a determinação da atividade enzimática (SOUZA et al., 1995).

2.2.6 Gel de atividades

Com o intuito de visualizar possíveis diferenças nas características das enzimas proteolíticas de *S. frugiperda*, alimentadas em dieta artificial contendo IP de soja, foram feitos géis de atividade.

Optou-se por utilizar um gel de gradiente de acrilamida para melhor separação das proteínas. Em uma cuba de eletroforese vertical foi preparado o gel de acrilamida num gradiente de 7.5% (625µL da solução B: 1.5M Tris-HCL, pH 8.8; 25µL de SDS 10%; 12.5µL de persulfato de amônio; 100mg/mL; 1.25µL de TEMED (NNN'N'-tetramethylethylenediamine); 625µL da solução A: acrilamida/bis 30%; 1212µL de água) a 12% (625µL de solução B; 25µL de SDS 10%; 12.5µL de persulfato de amônio 100mg/mL; 12,5µL de TEMED; 1000µL de solução A e 840µL de água). Após a polimerização acrescentou-se um gel de empilhamento (2.5mL de solução A; 2.5mL de solução C: Tris-HCl 0.5M, pH 6.8; 100µL de SDS 10%; 50µL de persulfato de amônio 100mg/mL; 10µL TEMED e 6.1mL de água) (LAEMMLI, 1970).

As amostras (homogeneizados intestinais) foram misturadas com a solução tampão (4.4mL de água; 1mL de solução C; 0.8mL de glicerol; 1.6mL de SDS 10% e 0.2mL de bromofenol 0.05%). A cuba com o gel foi preenchida com o tampão de corrida (Tris, Glicina e SDS). A corrida foi feita a 4°C por duas horas, a 100 volts.

Após a corrida, o gel foi retirado das placas de vidro e lavado por 10 minutos

com Triton-X-100 (2.5% v/v) em solução tampão Tris-HCl 100mM pH 8,5, sob agitação. Após a lavagem, foi preparado o "sanduíche" com o gel de gelatina (7.2mL de água; 4.7mL de solução B; 2.5mL de solução A; 1.9mL de gelatina 1%; 70μL de persulfato de amônio 100mg/mL; 11.2μL de TEMED e 200μL de SDS 10%).

O gel de acrilamida foi colocado sobre o gel de gelatina, umedecido com solução tampão Tris-HCl 100mM, pH 8.5 e mantido a 30°C por duas horas (JORDÃO et al., 1996).

Transcorrido esse tempo, o gel de gelatina foi transferido para uma solução de coloração 0.1% Comassie Blue R-250 em água-metanol-ácido acético (5:5:2, v/v/v), previamente filtrada, por um período de seis horas. Em seguida, o gel foi descolorido em uma solução de água-metanol-ácido acético (30:7:63, v/v/v). Foram realizadas várias lavagens até a visualização das bandas.

2.2.7 Preparação das bibliotecas subtrativas

2.2.7.1 Construção das bibliotecas de subtração pelo método de SSH

2.2.7.1.1 Extração do RNA das lagartas (controle e alimentadas com IP)

O RNA total foi extraído do intestino das lagartas após exposição às dietas contendo 0% (controle) e 0.5% de IP de soja. Cada amostra era composta por cinco intestinos, sendo coletadas 3 repetições por tratamento para cada intervalo de tempo (0, 6, 12, 24 e 48 horas). Os procedimentos de isolamento do RNA total foram baseados no protocolo do TRIzol[®], segundo instruções do fornecedor (Invitrogen).

Resumidamente, o tecido foi macerado em presença de nitrogênio líquido, em seguida adicionou-se o TRIzol[®] para garantir degradação mínima das moléculas de RNA. O volume do reagente utilizado foi de 1mL para cada 100mg de amostra. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 12000g por 10 minutos para sedimentar o material insolúvel, como restos celulares, proteínas e lipídeos. O sobrenadante foi

transferido para um tubo eppendorf e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas.

Em seguida adicionou-se 200µL de clorofórmio, incubado novamente por 3 minutos à temperatura ambiente, sendo, em seguida, centrifugado 12.000g por 15 minutos a 4°C. Durante esta centrifugação, a mistura separa-se em uma fase orgânica no fundo do tubo, uma interfase e uma fase aquosa, contendo o RNA, com volume de aproximadamente 60% do volume de TRIzol® utilizado na homogeneização. Transferiu-se esta fase aquosa para um novo tubo eppendorf e adicionou-se 500µL de álcool isopropílico para precipitar o RNA.

Após incubar o material a temperatura ambiente por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Ao final deste processo, foi possível visualizar o material (RNA total) precipitado no fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante e o RNA foi lavado com 1mL de etanol 75% (v/v), preparado com água tratada com 0,1% (v/v) de DEPC (dietilpirocarbonato).

As amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 7500g durante 5 minutos apenas para sedimentar o RNA, descartando-se em seguida o sobrenadante. Após deixar secar brevemente, o material foi ressuspendido em água 0,1% (v/v) DEPC e incubado a 55°C por cerca de 10 minutos para garantir a completa dissolução do RNA. O material foi armazenado a -80°C.

A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotômetro com base na leitura a 260nm. A integridade do material obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1.2%, utilizando-se brometo de etídeo para visualização das bandas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

2.2.7.1.2 Isolamento do RNA mensageiro (RNAm)

Para a confecção das bibliotecas subtrativas foi necessário isolar o RNAm. Foram escolhidas as amostras de RNA total dos tratamentos 0 e 0.5% IP do tempo de 12 horas. Esta escolha foi baseada nos resultados obtidos com o gel de atividades. O RNAm foi isolado utilizando-se “Oligotex mRNA Mini Kit”, de acordo com a

recomendação do fabricante (Quiagen).

De acordo com a quantidade de RNA total obtida, foi adicionado água-DEPC, solução tampão OBB (20mM Tris-Cl, pH7.5; 1M NaCl; 2mM EDTA; 0.2% SDS) e suspensão da resina Oligotex. Esta solução foi incubada por 3 minutos a 70°C para quebrar as estruturas secundárias do RNA e incubada novamente por 10 minutos a temperatura ambiente.

O complexo formado pelo RNAm ligado à resina Oligotex foi precipitado por centrifugação a 14000g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. O complexo Oligotex:mRNA foi dissolvido em solução tampão OW2 (10mM Tris-Cl, pH7.5; 150mM NaCl; 1mM EDTA) e purificado em filtros (Millipore).

Para a separação do RNAm da resina Oligotex foi adicionado 100µL da solução tampão OEB (5mM Tris-Cl, pH7.5) aquecido a 70°C. A amostra foi centrifugada por 1 minuto a 13000g e em seguida recebeu mais 100µL da solução tampão OEB. As amostras de RNAm foram precipitadas com 1/20 volume de glicogênio (50µg/mL), 1/10 volume de acetato de potássio (2.5M) e 2.5 volume de etanol. Após a remoção dos sais o RNAm poliA(+) foi ressuspendido em água 0,1% (v/v) DEPC e armazenado a -80°C.

A concentração de RNAm poliA(+) foi determinada por espectrofotometria a 260nm. A qualidade foi determinada através das razões A260/A280 e a integridade do RNAm poliA(+) foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1.2%, utilizando-se brometo de etídeo para visualização das bandas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

2.2.7.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita com o kit “Superscript™ first-strand synthesis system”, conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Partiu-se de 2µg de RNAm de cada tratamento (como descrito em **2.2.7.1.2**), 50ng de iniciadores Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎ e água tratada com DEPC para volume final de 12µL. A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 1 minuto.

Adicionou-se a solução tampão para PCR 1x (20mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50mM KCl), 2.5mM de MgCl₂, 500μM de dNTPs e 10mM de DTT (dithiothreitol). As amostras foram incubadas por 5 minutos a 42°C e em seguida adicionou-se 200U de transcriptase reversa Superscript II. Incubou-se por 50 minutos a 42°C e em seguida as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos. Foram adicionadas 2U de RNaseH as reações, e incubou-se por 20 minutos a 37°C para a degradação das fitas de RNA dos híbridos cDNA:RNA formados. As soluções de cDNA foram armazenadas a -80°C.

2.2.7.1.4 Síntese da segunda fita de cDNA e amplificação

Os cDNAs obtidos foram utilizados nas amplificações por PCR realizadas nas seguintes condições: solução tampão PCR 1x (20mM de Tris-HCl pH 8.4 e 50mM de KCl), 4mM MgCl₂, 3mM dNTPs 0.1μM de iniciadores aleatórios e 1U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Os produtos da reação acima foram purificados pelo kit “Qiaquick PCR purification”, de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante (Qiagen). Na última etapa do protocolo os cDNAs foram eluídos da coluna de purificação com água Milli-Q.

2.2.7.1.5 PCR subtrativo supressivo

Preparados os cDNAs provenientes de lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de dieta com (0.5%) e sem inibidor, a etapa seguinte foi realizar a subtração. Para isso, utilizou-se o kit “Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction”, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Clontech). Este procedimento é baseado no método descrito por Gurskaya et al., 1996 (Figura 2). Nesta técnica, a subtração “Forward” é representada por uma população de cDNA, chamada de

"tester", na qual estão contidos genes diferencialmente expressos, e uma segunda população "driver" (tratamento controle). Na subtração "Reverse", é feito o contrário: o cDNA do tratamento controle corresponde ao "tester" e o tratado, o "driver".

Tester" e "driver" são digeridos com a enzima *RsaI*, com a finalidade de reduzir a complexidade dos "amplicons" e gerar representações de cada cDNA. Em seguida, o "tester" é dividido em duas porções, as quais são ligadas a adaptadores diferentes. Cada adaptador possui diferentes seqüências de anelamento de iniciadores para PCR e possui uma única extremidade fosforilada, a fim de permitir a ligação direcional aos fragmentos.

Na fase seguinte, é adicionada uma grande quantidade "driver" a cada uma das 2 porções de "tester", e submetidos à desnaturação por calor. Na seqüência, a temperatura é reduzida a 68°C por 8 horas, permitindo a renaturação parcial das amostras. Devido à cinética de hibridização ser de segunda ordem, as moléculas mais abundantes sofrem re-anelamento mais rápido, promovendo equalização entre as seqüências de fita simples. Ao mesmo tempo, as moléculas de fita simples de seqüências diferencialmente expressas são enriquecidas em relação às não diferencialmente expressas, as quais tendem a formar híbridos com o "driver" por estarem super-representadas.

Na próxima etapa as duas amostras "tester" são misturadas na presença de maior quantidade de "driver" desnaturado. Assim, somente as moléculas de fita simples equalizadas e diferencialmente expressas devem re-associar, formando híbridos com adaptadores terminais diferentes (provenientes das duas amostras de "tester").

Após o preenchimento das pontas pela *Taq* DNA polimerase, é realizado uma PCR primária, usando dois iniciadores para os dois diferentes adaptadores. Nesta fase, as moléculas contendo o mesmo adaptador nas duas pontas não são amplificadas devido a sua complementaridade.

Para aumentar a especificidade, o produto desta primeira PCR é diluído e re-amplificado com iniciadores internos aos primeiros ("primers nested"). Deste modo os fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, equalizados, são seletivamente amplificados e posteriormente, clonados em vetores adequados para a sua caracterização.

Figura 2 – Diagrama esquemático da metodologia de SSH

Fonte: GURSKAYA et al., 1996.

2.2.7.1.6 Purificação e Clonagem dos produtos de PCR

Os cDNAs subtraídos e amplificados das bibliotecas “Forward” e “Reverse” foram purificados, utilizando-se o kit “QIAquick® PCR Purification” (Qiagen) em seguida os fragmentos foram clonados no vetor TOPO TA (Invitrogen) e também no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Em seguida, células eletrocompetentes de *E. coli* JM109 foram transformadas por eletroporação, utilizando as reações de ligação obtidas.

Após plaqueamento em meio LB-ágar contendo ampicilina (100µg/mL), IPTG (L-isopropil--β-D-1-tiogalactopiranosideo; 50µL/mL) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosideo; 20µg/mL de meio) foram selecionadas colônias brancas (transformadas). As bactérias contendo plasmídeos recombinantes foram coletadas individualmente e cultivadas em meio LB líquido com ampicilina (100µg/mL de meio) por 20 horas. Após este período as colônias receberam glicerol e foram armazenadas a -80°C. As colônias foram acondicionadas em placas de 96 poços totalizando 1920 colônias para a biblioteca “Forward” e 960 para a “Reverse”.

2.2.7.2 Construção das bibliotecas de subtração por RDA

2.2.7.2.1 Síntese de cDNAs

RNA total de lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram por 12 horas de dieta com (0.5%) e sem IP foi extraído e purificado conforme descrito no item 2.2.7.1.1. Após a quantificação e verificação da qualidade em gel de agarose-formaldeído, o RNA foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit “SMART PCR cDNA Synthesis Kit”, conforme instruções do fabricante (Clontech).

Este kit faz uso da atividade terminal transferase da enzima transcriptase reversa (RT) para ancorar iniciadores na porção 5' terminal de todos cDNAs sintetizados. Esta atividade faz com que, ao chegar à porção 5' final do RNAm, a enzima catalise a adição de uma pequena repetição de citosinas na fita de cDNA sintetizada. A seguir, usando-

se um iniciador para esta região e para a porção poli-A do mensageiro, os cDNAs completos sintetizados são amplificados por "Long distance PCR", na fase exponencial de reação. Os cDNAs incompletos, os RNAs ribossômicos e o DNA genômico não são amplificados, pois não possuem sítios de anelamento para estes iniciadores, garantindo um cDNA completo de alta qualidade.

2.2.7.2.2 Hibridização subtrativa

A construção da biblioteca de subtração foi feita seguindo o protocolo descrito por Hubank; Schatz (1994) (Figura 3). Resumidamente, os cDNAs provenientes de lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de dieta com (0.5%) e sem inibidor foram digeridos com a enzima *Sau3AI*, em seguida foi feita a ligação coesiva dos fragmentos gerados a adaptadores de DNA não fosforilados. Os fragmentos foram amplificados por PCR na fase exponencial da reação para evitar artefatos e distorções na abundância relativa de cada transcrito.

Após a remoção dos adaptadores pela digestão com *Sau3AI*, uma parte dos cDNAs foi reservada para ser usada como "Driver" e outra parte ligada a novos adaptadores, constituindo as amostras "Tester". Como as extremidades dos adaptadores não estavam fosforiladas, apenas uma das fitas de cada adaptador foi ligada covalentemente ao grupamento 5'-fosfato dos fragmentos de cDNA. A outra fita foi perdida durante as etapas de desnaturação das amostras.

A seguir, as amostras "Tester" correspondentes aos cDNAs das lagartas que se alimentaram com IP de soja foram combinadas com amostras "Driver" das lagartas que se alimentaram da dieta sem IP (controle), em uma relação de 1:100, para a primeira hibridização "Forward". Para a primeira "Reverse", a amostra "Tester" correspondeu ao cDNA das lagartas do tratamento controle e a "Driver" ao cDNA das lagartas que se alimentaram com IP de soja.

Os cDNAs foram desnaturados e reanelados lentamente a 67°C por 20 horas. Os genes presentes igualmente nas duas populações de cDNAs tendem a formar duplo-híbridos "Tester-Driver", uma vez que o "Driver" está presente em excesso. Enquanto

isso, os genes que estão presentes somente na amostra “Tester” formam híbridos “Tester-Tester”.

Na etapa seguinte, os adaptadores foram preenchidos com *Taq* DNA polimerase, completando-os apenas nas duas fitas dos híbridos “Tester-Tester”. Como o sítio do iniciador foi criado somente nas extremidades das fitas dos híbridos “Tester-Tester”, apenas estes são amplificados. Este produto de PCR é chamado de DPI (“differential product 1”) e já possui enriquecimento para genes diferencialmente expressos.

O DPI foi digerido e ligado a novos adaptadores, semelhantes aos primeiros. Foi repetido um novo ciclo de hibridização, usando-se a relação “Tester:Driver” 1:800, gerando o segundo produto diferencial DPII. Os produtos foram purificados e clonados da mesma forma como descrito para SSH. As colônias transformadas foram acondicionadas em placas de 96 poços totalizando 1440 colônias para a biblioteca “Forward” e 960 para a “Reverse”.

2.2.8 Seqüenciamento dos clones

2.2.8.1 Extração dos plasmídeos

Os clones bacterianos, obtidos pela transformação dos fragmentos da subtração foram repicados e após o cultivo das bactérias em meio LB líquido a 38°C sob agitação por 22 horas, o meio foi centrifugado a 4000g por 5 minutos a 4°C.

O precipitado foi lavado com solução contendo 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 e 50mM glicose. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo 1% SDS, 0.2N NaOH e incubada no gelo por 10 minutos. Em seguida, acrescentou-se a solução contendo 3M acetato de potássio e 10% ácido acético glacial, misturada por inversão, incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para nova placa, sendo adicionado 15µL de RNaseA, e incubado a 37°C por 20 minutos.

O DNA foi precipitado com isopropanol gelado e incubado em gelo por 5 minutos. O precipitado foi centrifugado a 4000g por 40 minutos a 4°C e lavado com

Figura 3 – Diagrama esquemático da metodologia de RDA

Fonte: HUBANK; SCHATZ, 1994.

etanol 70% gelado. Após a secagem, foi dissolvido em água deionizada esterilizada.

2.2.8.2 Seqüenciamento utilizando "Big Dye Terminator"

Para o seqüenciamento foi utilizada uma alíquota de 200 a 500ng de DNA plasmidial. Ao DNA plasmidial foi adicionado 10pmol do iniciador M13F ou M 13R, 2µL de "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer Applied Biosystems), 2µL de tampão de seqüenciamento 5x e água deionizada para um volume final de 10µL.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C e uma extensão final por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram precipitados com isopropanol 75% e incubados no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 4000g por 45 min a 4°C e os precipitados foram lavados em etanol 70%. Após a secagem, foram dissolvidos em formamida e desnaturados a 96°C por 5 minutos.

2.2.8.3 Seqüenciamento utilizando "DYEnamic ET Terminator"

Para o seqüenciamento foi utilizada uma alíquota de 200-500ng de DNA plasmidial. Adicionou-se 10 pmol do iniciador T7, 2µL de "DYEnamic ET Terminator" (Amersham Biosciences), 2µL de solução tampão Save Money (200mM Tris-HCl pH 9.0 e 5mM MgCl₂.6H₂O) e água deionizada para um volume final de 10µL.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C.

Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1.5M e EDTA 250mM e 6 volumes de etanol 95%. Foram centrifugados 4000g por 45 minutos os precipitados foram lavados em etanol 70%. Os

precipitados foram secos no escuro por no mínimo 2 horas e ressolubilizados em formamida.

2.2.9 Caracterização das seqüências obtidas via estudo comparativo com seqüências depositadas em bancos de dados

Os cromatogramas gerados no seqüenciamento dos clones de cDNAs foram analisados individualmente para a remoção das seqüências do vetor e das bases de baixa qualidade. As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.2.10 Confirmação da expressão diferencial

2.2.10.1 PCR em tempo real

As análises da expressão diferencial foram realizadas pelo aparelho RotorGene 3000, da Corbett. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida em que o DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante SYBR® Green entre as cadeias de DNA geradas. O SYBR® Green é um agente intercalante de DNA que se liga de maneira específica as duplas fitas de DNA, passando assim a emitir sinais de fluorescência. Quando livre em solução, este composto emite pouca quantidade de fluorescência, no entanto, durante as fases de anelamento e extensão, quantidades crescentes do corante associam-se a molécula de DNA recém formada. Este evento resulta no aumento progressivo da fluorescência emitida por este agente, sendo detectada e registrada em tempo real durante a fase de polimerização da PCR (BUSTIN, 2000).

Para a reação de PCR, uma mistura dos seguintes componentes foi preparada: 10µL do Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e 5.2µL de água.

Esta mistura (15.2µL) foi dispensada em cada tubo de PCR 0.2µL. Posteriormente, 0.4µL do iniciador forward e 0.4 µL do iniciador reverse (ambos na concentração final 0.5mM) apropriados foram adicionados à mistura. Como molde, foram utilizados 4µL de cDNA (0.5µg RNA total submetido a transcriptase reversa).

As amostras foram analisadas em triplicata, sendo duas repetições por tratamento. O seguinte ciclo foi usado: programa de incubação 50°C por 2 minutos, programa de desnaturação 95°C por 2 minutos, programa de amplificação e aquisição repetido 35 vezes, 95°C por 15 segundos e 62°C por 30 segundos, sendo feita uma única medição do sinal fluorescente no final deste ciclo. Programa de curva de “melting” 72-99°C ficando 45 segundos no primeiro passo e 5 segundos nos passos seguintes e com medição de fluorescência contínua.

Os iniciadores utilizados foram desenhados usando o programa OligoPerfect™, disponível na internet no endereço: www.invitrogen.com/oligos . Os dados de expressão foram normalizados com o gene 30S (gene de referência endógeno) que codifica uma proteína ribossomal em *S. frugiperda*.

2.3.2.4.4 Curvas de calibração e eficiência

O nível de expressão de RNAm dos genes escolhidos foi medido através da determinação da concentração da amostra a ser testada, calculada em relação a um padrão de concentração para cada gene e normalizada através de um gene de referência endógeno.

Para cada par de iniciadores, foi elaborada uma curva de eficiência da reação. Foram feitas diluições seriadas em triplicata de uma amostra de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} x), representativa de todos os tratamentos. A partir destas diluições foi gerado um gráfico informativo sobre a fluorescência total emitida versus ciclo da PCR. O ciclo “threshold” (Ct) corresponde ao ciclo da reação de PCR a partir da qual a quantidade de fluorescência torna-se significativamente detectável, porém ainda durante a fase exponencial do processo de amplificação (RUTLEDGE; COTE, 2003).

A diluição das amostras usada no experimento, para todos os pares de iniciadores foi a de $10^{-2} \times$. O “threshold” ou limiar foi arbitrariamente estipulado em 0.1 do valor da fluorescência normalizada.

2.2.10.2 Extração do RNA total e preparação do cDNA

O RNA total utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real, foi extraído do intestino das lagartas após exposição às dietas contendo 0% (controle) e 0.5% de IP de soja, conforme a descrição do item 2.2.7.1.1.

Em seguida as amostras foram tratadas com DNase I, Rnase free (Fermentas), na concentração de 0.5 unidade por μg de RNA, seguindo o protocolo sugerido pelo fornecedor. Cada amostra foi quantificada por leitura no espectrofotômetro a 260nm e 0.5 μg de cada amostra foram submetidos a transcriptase reversa, usando a enzima SuperscriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen), conforme descrição no item 2.2.7.1.3 e 2.2.7.1.4.

2.2.10.4 Análise de resultados de PCR em tempo real

O cálculo da expressão absoluta do gene em estudo em relação ao gene de referência foi feito com o modelo matemático de Pfaffl (2001). Esse modelo leva em conta a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores, calculada a partir da curva de diluição para cada gene estudado. Os dados foram analisados usando o software desenvolvido para cálculo da expressão relativa em PCR em tempo real: “Relative Expression Software Tool – XL = REST-XL®” versão 2. O software se encontra disponível na internet, através do endereço: <http://www.gene-quantification.info/>

2.3 Resultados

2.3.1. Atividade de tripsina em lagartas de *S. frugiperda*

Para estudar os efeitos dos IP de soja na atividade das enzimas digestivas tipo tripsina de *S. frugiperda*, o intestino das lagartas de último ínstar que se alimentaram de dieta artificial contendo 0% (controle) e 0.5% de IP (p/p) foi removido e analisado. A atividade das enzimas do tipo tripsina foi medida através da hidrólise do substrato N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA).

As lagartas nos diferentes tratamentos apresentaram uma ligeira queda na atividade enzimática nas primeiras 12 horas de consumo (Figura 4). Sendo esta queda mais acentuada para as lagartas que foram alimentadas com a dieta contendo IP de soja. Quando o período de alimentação foi prolongado para 24 horas, a atividade foi restabelecida para ambos tratamentos, porém a presença do inibidor na dieta reduziu a atividade triptica de *S. frugiperda*.

A redução na hidrólise de BAPNA foi de 27 e 28%, quando comparadas a atividade das lagartas do tratamento controle alimentadas por 24 e 36 horas, respectivamente. Estas últimas após 36 horas na dieta, atingiram o valor de 146,89 nmoles/min./mg proteína.

2.3.2 Atividade de quimotripsina em lagartas de *S. frugiperda*

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos IP de soja na atividade das enzimas digestivas tipo quimotripsina de *S. frugiperda*, o intestino das lagartas de último ínstar que se alimentaram de dieta artificial contendo 0% (controle) e 0.5% de IP (p/p) foi dissecado e analisado. A atividade das enzimas foi medida através da hidrólise do substrato N-succinyl-alanine-proline-phenylalanine p-nitroanilide (S(Ala)₂ProPhe pNA).

A atividade das enzimas do tipo quimotripsina ao longo do tempo avaliado, foi decrescente para as lagartas dos diferentes tratamentos (Figura 5). A presença do inibidor na dieta afetou a atividade das quimotripsinas de *S. frugiperda*. A redução na hidrólise de S(Ala)₂ProPhe pNA foi de 48% quando comparadas a atividade das lagartas do tratamento controle alimentadas por 6 horas.

No entanto, quando as lagartas da dieta contendo IP de soja foram alimentadas por 36 horas a redução passou a 15%, ou seja, uma parte da atividade foi recuperada com o prolongamento do período de alimentação.

Ao final do tempo de avaliação, a atividade das quimotripsinas foi de 29,7 e 34,9 nmoles/min./mg proteína, para as lagartas das dietas com e sem IP, respectivamente.

2.3.3 Detecção das proteinases digestivas por gel de atividade

Com o intuito de visualizar o comportamento das proteinases de *S. frugiperda* durante a alimentação com IP de soja, foram realizados géis de atividade. Optou-se por utilizar gel de gradiente (7.5-12%) de acrilamida para melhor separação das proteínas. Após a interação deste com o gel de gelatina, coloração com Comassie Blue e descoloração, diversas bandas foram detectadas (Figura 6).

Verificou-se o aparecimento de bandas com atividade proteolítica de baixa mobilidade no gel, denominadas de B1 e B2, nos extratos intestinais das lagartas que se alimentaram da dieta contendo o IP de soja. As bandas B2 e B1 têm maior intensidade quando as lagartas se alimentam durante 24 e 36 horas, respectivamente.

A presença do IP também estimulou o aparecimento de bandas com alta mobilidade no gel, representadas por B3 e B4. Pode-se observar que estas bandas vão se tornando mais intensas a medida que o período de alimentação é aumentado.

Em contraste, no extrato das lagartas da dieta controle, é possível observar a presença de uma enzima sensível ao inibidor, já que na presença deste a banda, representada por B5 praticamente desaparece.

Figura 4 - Atividade das enzimas tipo tripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *S. frugiperda*. Substrato = BApNa. Barras verdes: lagartas alimentadas com dieta artificial contendo 0.5% de IP de soja. Barras brancas: lagartas alimentadas em dieta sem inibidor

Figura 5 - Atividade das enzimas tipo quimotripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *S. frugiperda*. Substrato = S(Ala)₂ProPhe pNA. Barras verdes: lagartas alimentadas com dieta artificial contendo 0.5% de IP de soja. Barras brancas: lagartas alimentadas em dieta artificial sem inibidor

Figura 6 – Visualização da atividade das proteinases digestivas de *S. frugiperda*. 2µg de proteína total foram aplicados para cada amostra. 1, 2, 3 = amostras de homogeneizado intestinal de lagartas submetidas a dieta contendo IP de soja, alimentadas durante 12, 24 e 36 horas, respectivamente. 4, 5, 6, 7 = amostras de homogeneizado intestinal de lagartas submetidas a dieta controle, alimentadas durante 0, 12, 24 e 36 horas, respectivamente

2.3.4 Construção das bibliotecas de SSH

As bibliotecas de subtração de cDNAs foram construídas a partir dos RNAm extraídos das lagartas de último instar de *S. frugiperda* que se alimentaram de dieta artificial contendo 0 e 0.5% de IP de soja durante 12 horas. Os cDNAs dupla-fita sintetizados foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI*, para gerar fragmentos de, em média, 500 pares de base (pb). Esta digestão foi necessária para evitar que nas etapas posteriores de PCR, ocorresse amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. A Figura 7 apresenta o fracionamento destes cDNAs, em gel de agarose, antes e depois da digestão com *RsaI*. Pode-se observar que, após a digestão, ocorre um aumento na concentração dos fragmentos de menor massa molecular.

O cDNA digerido com *RsaI* foi utilizado para a ligação aos adaptadores. A eficiência desta ligação foi testada por PCR, uma das reações utiliza um par de iniciadores específico para o GAPDH da amostra e a outra reação usa iniciadores para o adaptador e para GAPDH. A razão entre a intensidade das bandas gerada nas reações de PCR, indica o quanto de fragmento de GAPDH foi ligado ao adaptador, em relação ao total de fragmentos de GAPDH. Verifica-se pela Figura 8 que a intensidade das bandas maiores (iniciadores para GAPDH e adaptador) é superior a das bandas menores (iniciadores específicos para GAPDH). De acordo com o protocolo da subtração, este é um indicativo de que os adaptadores foram eficientemente ligados aos fragmentos da amostra.

Foram realizadas duas hibridizações subtrativas, sendo uma para clonar genes induzidos pelos IP de soja (hibridização “Forward”) e outra para clonar os genes reprimidos por esse tratamento (hibridização “Reverse”). Após as hibridizações os produtos obtidos a partir da reação de PCR subtrativo foram clonados nos vetores TOPO TA (Invitrogen) e também no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). As bibliotecas foram validadas pela quantificação dos clones recombinantes, através da reação de PCR, usando os iniciadores específicos da região de clonagem dos vetores. Alguns clones foram selecionados aleatoriamente e após a amplificação foram

visualizados em gel de 1% agarose (Figura 9). Os tamanhos dos insertos variaram de 300 a 800 pb.

Figura 7 – Eletroforese dos cDNAs de *S. frugiperda* antes e após a digestão com *RsaI*, em gel de agarose 1%. 1 e 2 representam respectivamente, os cDNAs das lagartas submetidas ao IP de soja antes e depois da digestão. 3 e 4 representam os cDNAs das lagartas controle antes e depois da digestão, respectivamente. PM: padrão de tamanho molecular

Figura 8 – Teste da eficiência de ligação aos adaptadores, em gel de agarose 1%. Amplificação de GAPDH a partir dos cDNAs ligados aos adaptadores. 1 e 3: iniciador para GAPDH e adaptador. 2 e 4: iniciadores para GAPDH. 1 e 2 representam os cDNAs das lagartas submetidas ao IP de soja. 3 e 4 representam os cDNAs das lagartas controle. PM: padrão de tamanho molecular

Figura 9 – Validação da biblioteca pela confirmação da presença do inserto no clone recombinante. Fragmentos maiores que 200 pares de base indicam a presença do inserto. PM: padrão de tamanho molecular

2.3.5 Construção das bibliotecas por RDA

Estas bibliotecas foram construídas a partir do cDNA de lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram durante 12 horas em dieta com IP (0.5%) e sem inibidor. Estes cDNAs foram sintetizados com o uso do kit "SMART PCR cDNA Synthesis" (Clontech).

Para que a representatividade de cada cDNA da amostra não fosse alterada foi necessário padronizar a reação de PCR, visando escapar do platô de amplificação, ou seja, não ultrapassar a fase exponencial de amplificação. Desta forma, as amostras foram amplificadas por diferentes ciclos para a identificação do platô e posteriormente separadas em gel de agarose. A Figura 10 evidencia que a partir de 18 ciclos a intensidade do arraste de cDNAs aumenta pouco, sugerindo que o platô já tenha sido atingido. Assim, 15 ciclos foram usados para gerar os cDNAs usados no RDA.

Os cDNAs obtidos foram digeridos com a enzima *Sau3AI*, esta digestão foi necessária para evitar que nas etapas posteriores de PCR, ocorresse amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Após a digestão os fragmentos foram ligados a adaptadores e em seguida amplificados.

Como descrito para as bibliotecas de SSH, aqui também foram construídas bibliotecas "Forward" e "Reverse". Na primeira hibridização foi utilizada uma relação "tester:driver" de 1:100, enquanto que para a segunda a relação foi de 1:800. A cada hibridização foi gerado um produto de PCR composto pelas seqüências diferencialmente expressas, denominado produto diferencial (PD). Como esperado o PD proveniente da segunda hibridização continha um maior enriquecimento em relação ao PD da primeira hibridização (Figura 11).

Figura 10 – Gel de agarose 1% dos fragmentos de cDNA de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial sem inibidor, amplificadas por PCR por um número variado de ciclos. PM: padrão de tamanho molecular

Figura 11 – Produtos diferenciais (DP) obtidos pela subtração por RDA, em gel de 1% agarose. Produtos provenientes da biblioteca "Forward". 1 representa DPII e 2 representa DPI. PM: padrão de tamanho molecular

2.3.6 Caracterização das bibliotecas subtrativas

Aleatoriamente foram escolhidos aproximadamente 1500 clones das bibliotecas “Forward” e 600 genes das bibliotecas “Reverse” para serem seqüenciados. Não houve preferência pela técnica subtrativa, os clones gerados em ambas metodologias foram seqüenciados.

Após a remoção das seqüências do vetor de cada clone seqüenciado, as seqüências obtidas foram comparadas manualmente com as seqüências depositadas na base de dados do NCBI. Esta comparação permitiu a identificação da grande maioria dos fragmentos de ambas bibliotecas. A Tabela 1 apresenta o total de genes seqüenciados para as bibliotecas “Forward”, e a Tabela 2 apresenta as seqüências obtidas com as bibliotecas “Reverse”.

Um grande número de genes parece estar envolvido com o processo de adaptação aos efeitos negativos dos IP. Entre os genes induzidos pela presença dos inibidores foram identificadas 116 diferentes classes (Tabela 1). Já os genes reprimidos pela presença do IP (bibliotecas ‘Reverse’), foram distribuídos em 67 classes (Tabela 2).

As classes gênicas foram agrupadas em categorias, de acordo com a função celular desempenhada no organismo. A comparação entre as categorias das bibliotecas “Forward” e “Reverse” pode ser visualizada na Figura 12. Verifica-se que na biblioteca “Forward” o maior número de seqüências encontradas estava relacionado a atividades digestivas (38%). Os genes relacionados com transporte totalizaram 8% dos clones, transcrição e tradução 12%, transdução de sinais 3%, metabolismo 10%, 4% outras categorias menores e 25% das seqüências analisadas não encontraram qualquer similaridade com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI. Os resultados das seqüências “Reverse” indicam 31% das seqüências estão envolvidas com metabolismo, 18% transporte, 26% seqüências desconhecidas, 2% transcrição e tradução, 4% transdução de sinais, 5% categorias menores e 14% referente a enzimas digestivas.

As lagartas de *S. frugiperda* quando criadas em dieta artificial contendo IP de soja apresentam aumento na atividade de tripsinas e quimotrisinas (PAULLILO et al.,

2000). Sendo assim, é provável que entre os clones, pertencentes a biblioteca “Forward”, relacionados a proteólise possivelmente estejam aqueles responsáveis diretos pelo mecanismo de adaptação de *S. frugiperda* aos inibidores de IP. Desta forma, alguns cDNAs das serino-proteinases encontradas, foram escolhidos para a avaliação da expressão diferencial na presença de IP, utilizando-se PCR em tempo real.

2.3.7 Alinhamento das seqüências de proteases diferencialmente expressas

Todas as seqüências de quimotripsinas e tripsinas obtidas com as bibliotecas subtrativas “Forward” foram agrupadas e comparadas pelo programa Bioedit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). As seqüências que apresentaram identidade entre bases superior a 98% foram consideradas redundantes e assim retiradas do conjunto de seqüências.

Com identidade inferior a 98% as seqüências foram alinhadas e novamente agrupadas. Seqüências com identidade inferior a 75% eram mantidas em grupos distintos. Desta forma, foi possível organizar 11 grupos para seqüências de quimotripsinas e 7 grupos para as tripsinas.

Dentro de cada grupo formado, foi escolhida uma seqüência representante para a confirmação da expressão diferencial. Os critérios para a escolha destas representantes foram: fragmentos longos e com boa representatividade dentro de cada grupo.

Tabela 1 – Genes de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta contendo (0.5%) IP de soja, biblioteca “Forward”

(continua)

Blast X (Agosto 2005)	N. de clones
Acyl-CoA dehydrogenase (SCAD)	1
Adenylylsulphate APS Kinase	1
Aldehyde dehydrogenase (NAD)	7
Allatotropin	3
Amino acid transporter	1
Aminopeptidase	11
Aminotransferase	6
AMP binding (Luciferase, Long chain fatty acid , Acetyl CoA synthetase)	2
Amylase (Maltase/Glycosyl hydrolase)	4
Aquaporin	1
Arginine kinase	1
Argonaute 1 (AGO 1)	1
ATP translocase	2
ATPase	9
bZip Maf transcriptional factor (Leucine zipper)	1
Calcineurin-like phosphoesterase	2
Calponin	1
Calreticulin (calcium ion binding)	2
Carboxylesterase	9
Carboxylase	3
Carboxypeptidase	7
Casein kinase	3
Caspase	1
Chaperone Hsp 70	3
Chaperone Hsp 90	5
Chaperone P23	1
Chitin binding	3
Chitin synthase	5
Choline dehydrogenase	1
Chymotrypsin	283
Cis-(Z) isoprenyl diphosphate synthases	1
Citrate synthase	1
Corticotropin	1
Cysteine protease inhibitor	1
Cytochrome C oxidase	23
Cytochrome P450	6
Deoxynucleoside kinase	1
Unknown	305
Diazepam-binding inhibitor	2

Tabela 1 – Genes de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta contendo (0.5%) IP de soja, biblioteca “Forward”

(continuação)

Blast X (Agosto 2005)	N. de clones
Dipeptidylpeptidase IV	1
DUF 124	1
Ecdysone oxidase	5
eIF-3	2
eIF-4A	1
eIF-5A	12
Elongation factor (EF-1 alpha)	3
Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (ERO 1)	1
ER lumen protein retaining receptor	1
Farnesyl pyrophosphate synthase	1
Flotillin	1
Folate carrier (glycoprotein)	1
GDP dissociation inhibitor (Gdi)	1
Glutamate dehydrogenase	4
Glutaredoxin	1
Glutathione S-transferase	3
Glycoprotein 93	3
Glycosyl hydrolase	1
Glycosyl transferase	3
GTPase	7
Guanine-N7 methyltransferase	1
Guanyl-nucleotide exchange factor (rt GEF)	1
Haemolymph juvenile hormone binding protein	1
Helicase DEAD box	1
Hemomucin	1
Hydrolase	2
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (Hmgcr)	1
Inwardly rectifying potassium channel 2 (Irk 2)	1
Leucine rich repeat	3
Lipase	39
Lysosomal protein Npc2	1
Metalloprotease	1
Metalloprotease	2
Microsatellite Spodoptera	1
Mitochondrial carrier protein	4
Myosin	7
NADH ubiquinone oxidoreductase	1
Oligosaccharyl transferase	1
Oxidoreductase activity	2
Peptidase M28	1

Tabela 1 – Genes de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta contendo (0.5%) IP de soja, biblioteca “Forward”

Blast X (Agosto 2005)	(conclusão) N. de clones
Peritrophin	13
Peroxisome organization and biogenesis	1
Phosphatidylinositol transfer protein (Sec 61)	3
Phosphatidylinositol transfer protein (Sec14)	1
Phosphofructokinase	1
Phosphoglycerate Kinase	1
Phosphomannomutase	1
PoliA binding protein	1
Proteasome 26S regulatory	2
Protein p24 (COPI vesicles)	1
Putative transcriptional factor	17
Receptor activity	3
RNA binding domain	5
Serine/Threonine kinase	3
Serino proteinase inhibitor	1
SH2	1
Signal recognition particle (SRP)	4
Signal transducer and activator of transcription	6
SNAP 25 (Synaptosome-associated protein - 25kDa)	3
Sugar transporter	43
Tetraspanin (receptor binding)	1
Tetratricopeptide repeat domain (TRP)	1
Thiolase	2
Thioredoxin	1
THUMP domain (RNA-binding domain)	1
Transcriptional repressor activity (Mi-2)	1
Transketolase (decarboxylase)	3
Transporter activity	1
Trypsin	151
Tropomyosin	2
Ubiquitin conjugating enzyme 2 (UbcD2)	2
VIAF (protein binding)	2
WD40	1
Xpo1 protein	1
Zn finger	6

Tabela 2 – Genes de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta sem IP de soja, biblioteca “Reverse”
(continua)

Blast X (Agosto 2005)	N. de clones
26S Proteasome regulatory complex component	1
Adenosylhomocysteinase activity	1
Aldehyde dehydrogenase (NAD)	4
Aldehyde reductase activity	9
Aminopeptidase	9
Aminotransferase	2
AMP binding (Luciferase, Long chain fatty acid CoA ligase, Acetyl CoA synthetase)	10
Amylase (Maltase/Glycosyl hydrolase)	14
Arginine kinase	2
Arylphorina	5
ATPase	14
B-glucosidase	1
BGM	1
bZip Maf transcriptional factor (Leucine zipper)	1
Calcium ion binding	1
Carboxylesterase	1
Carboxypeptidase	4
Caseina kinase	1
Choline acyltransferase	2
Chymotrypsin	16
Cisteino endopeptidase inhibitor	1
Clathrin heavy chain	2
Cytochrome B	1
Cytochrome C oxidase	9
Cytochrome P450	16
Unkown	98
Ecdysone oxidase	2
EF-1 alpha	2
Estradiol dehydrogenase	2
Glucose dehydrogenase	12
Glucuronosyl transferase	1
Glutathione S-transferase	1
Glycosyl hydrolase	9
Glycosyl transferase	2
GTPase	1
Haemolymph juvenile hormone binding protein	1
Helicase DEAD box	1
Hormone diol kinase	1
Innexin	1

Tabela 2 – Genes de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta sem IP de soja, biblioteca “Reverse”
(conclusão)

Blast X (Agosto 2005)	N. de clones
Insect cuticle protein	2
Leucine rich repeat	2
Lipase	10
Metalloprotease	2
Methionine rich storage protein	18
MOSC domain	1
N-acetylglucosaminidase	1
Ornithine decarboxylase	2
Oxidoreductase activity	1
Oxoglutarato dehydrogenase	1
Peptidase M16 (insulysin)	1
Peritrophin	10
Phosphate transporter	1
Protein carrier activity	1
Protein Kinase-C	3
Putative transcriptional factor	2
Receptor activity	1
RNA binding domain	2
Serine/Threonine kinase	1
Serino proteinase inhibitor	1
Sterol carrier protein	1
Sugar transporter	2
Sulfotransferase	2
Thioredoxin	2
Transporter activity	2
Trypsin	17
Tropomyosin	2
Tubulin	2

Figura 12 – Comparação funcional das seqüências encontradas nas bibliotecas subtrativas de *S. frugiperda* “Forward” e “Reverse”. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

2.3.8 PCR em tempo real

Algumas seqüências de proteases, provenientes das bibliotecas “Forward”, foram escolhidas para serem analisadas por PCR em tempo real. A intenção foi confirmar a expressão diferencial destas seqüências e correlacionar a expressão destas enzimas à capacidade adaptativa de *S. frugiperda* aos IP de soja.

Embora tenham sido formados 11 agrupamentos de quimotripsinas e 7 para tripsinas, somente 8 e 3 representantes, respectivamente, foram analisados. Esta redução de seqüências aconteceu devido a impossibilidade de se construir iniciadores com capacidade de distinguir todas as seqüências.

Os iniciadores utilizados para cada seqüência foram desenhados usando o programa OligoPerfect™, disponível na internet no endereço: www.invitrogen.com/oligos. A Tabela 3 apresenta os clones escolhidos e a seqüência dos iniciadores.

A análise da curva de dissociação (“Melting curve”) é uma importante medida de controle da qualidade da reação de PCR, visto que não é possível distinguir produtos amplificados por diferentes materiais genéticos. A temperatura de dissociação depende da composição de bases e do tamanho do produto amplificado. Desta forma, todos os produtos de um par de iniciadores específicos devem apresentar uma mesma temperatura de dissociação.

Todos os iniciadores testados neste trabalho resultaram num produto específico, único e com o tamanho desejado, visualizado em gel de agarose 1.5%. Além disso, a análise da curva de dissociação foi realizada em todas as corridas, e resultou em temperaturas específicas. Outra forma de avaliação realizada foi o seqüenciamento dos fragmentos amplificados, que mais uma vez provaram ser específicos.

2.3.8.1 Expressão relativa dos transcritos

A expressão do gene normalizador 30S foi constante, independente do tratamento. Com exceção de uma tripsina, todas as seqüências escolhidas confirmaram a expressão diferencial.

A expressão das quimotripsinas em presença do inibidor pode ser agrupada em duas categorias: enzimas já existentes que aumentaram a expressão e enzimas que foram sintetizadas “de novo”.

A análise da expressão das enzimas representadas pelos clones 450H07, 440D05, 455A08 e RDAFB07 (Figura 13, 14, 15, 16, respectivamente) indica que todas foram fortemente induzidas pela presença do inibidor. Sendo que, os níveis mais elevados de expressão dos transcritos de 440D05, 455A08 e RDAFB07 foram atingidos com 48 horas de alimentação. O pico de expressão de 450H07 se deu com 24 horas de alimentação, sendo portanto, mais cedo do que os demais clones citados.

Os transcritos que foram expressos “de novo” foram aqueles representados pelos clones 450F05, 448G02, 448G03 e 450F08 (Figura 17, 18, 19, 20, respectivamente). Estas seqüências também apresentaram o maior aumento de expressão após 24 horas, sendo 448G02, 448G03 mais expressas com 48 horas de alimentação.

Para poder avaliar o nível de expressão entre as diferentes quimotripsinas, foi gerado um gráfico comparativo do padrão de expressão das enzimas normalizado pelo padrão de expressão do gene de referência, 30S (Figura 21). Observa-se que a seqüência 455A08 foi a mais expressa em relação as outras quimotripsinas, já a seqüência 448G02 apresentou a menor indução.

A expressão das tripsinas também apresentou o padrão de comportamento das quimotripsinas, sendo 443D12 expressa “de novo” e 441F01 com aumento de expressão (Figura 22, 23, respectivamente). No entanto, a seqüência 456E02 não alterou seu padrão de expressão na presença do inibidor (Figura 24).

A maior atividade transcricional das tripsinas induzidas foi alcançada com 48 horas de alimentação. Comparando o nível de expressão entre estas seqüências em relação ao gene de referência, 30S (Figura 25), observa-se que a seqüência 443D12 sofreu maior indução.

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo real

Iniciadores	Clone	Tamanho (pb)	5'	3'
1	450F05	250	TGCAGCTCTTATCTCCCACA	CAACATCACCAGCAAAGCTC
3	448G02	225	TATGGTACTAGCGTCGCGAG	GAGCAATAGGAGCGAGGTTAC
5	RDAFB07	230	TGCTCCAGCTCAGCTCGGTC	CGTCATTTCCGACTAGACTTGGAG
7	440D05	105	AAGCTGGAACCCCAGTAACA	TTTTCGTTGAGCTGGCTACC
9	450H07	223	AAGTCATCATGCACCCACAA	GACACGTGGCTTACCACAGA
11	448G03	232	TCGGAGCATGACAGTTGTTT	AGATGCTGTGGCGGTAAC
13	450F08	215	TTACCGCTAACCGTGTGCTT	CGATGACATCTGACAAGGCG
15	455A08	203	TCATCTCTCACAAACCGCATC	AACAGSGCTAATGCGGAGGA
19	458D06	133	TCTTCTTTTCGCACACAGTGG	CATTGTAGTTGGAACCAGCG
21	456 E02	115	ACGTCCATTGACAAGTTCCC	AGCTTGGGTCGTAGAAGACG
23	441F01	120	AACTTATGGCGGCTAGCGTA	AAGGGACCTCCAAAGTCACC
25	443D12	137	CGGGCGACAGTACGAGAATA	CGGCGTATCTCACATCAGCA
31	30S	170	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT

Figura 13 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 450H07. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 14 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 440D05. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 15 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 455A08. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 16 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a seqüência de quimotripsina do clone RDAFB07. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 17 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a seqüência de quimotripsina do clone 450F05. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja

Figura 18 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 448G02. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja

Figura 19 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 448G03. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja

Figura 20 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de quimotripsina do clone 450F08. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja

Figura 21 – Comparação do nível de expressão entre as diferentes isoformas de quimotripsinas. A expressão dos genes está estimada sobre a porcentagem do gene de referência endógeno 30S. A = 450F05; B = 448G02; C = RDAFB07; D = 440D05; E = 450H07; F = 448G03; G = 450F08; H = 455A08; J = 458D06

Figura 22 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de tripsina do clone 443D12. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja

Figura 23 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de tripsina do clone 441F01. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 24 – Confirmação da expressão diferencial por PCR em tempo real. Iniciadores para a sequência de tripsina do clone 456E02. Barras azuis: lagartas alimentadas com (0.5%) IP de soja. Barras brancas: tratamento controle

Figura 25 – Comparação do nível de expressão entre as diferentes isoformas de tripsinas. A expressão dos genes está estimada sobre a porcentagem do gene de referência endógeno 30S. M = 441F01; N = 443D12; O = 456E02

2.4 Discussão

2.4.1 Ensaio enzimáticos

Os inibidores de proteinase são classificados como agentes naturais de defesa contra o ataque de insetos, sendo capazes de reduzir a atividade proteolítica e/ou desenvolvimento larval pra diferentes espécies de coleópteros e lepidópteros (RYAN, 1990). Entretanto, algumas espécies de insetos não são sensíveis aos IP, mesmo quando as enzimas digestivas são bloqueadas in vitro pelos inibidores (BRITO et al., 2001; BROADWAY, 1995; BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; DE LEO et al., 1998; JONGSMA et al., 1995).

Os mecanismos mais utilizados pelos insetos para minimizar os efeitos dos IP são: alteração da composição de suas enzimas digestivas e/ou produção de enzimas que hidrolisam os inibidores.

Com o objetivo de comparar a atividade das enzimas digestivas de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial contendo 0 e 0.5% IP de soja (p/p), foram realizados ensaios enzimáticos com os substratos artificiais, BApNA e S(Ala)₂ProPhe pNA.

Os resultados indicam que as enzimas do tipo tripsina e quimotripsina de *S. frugiperda* são sensíveis à inibição por IP de soja, pois a atividade destas enzimas foi reduzida em relação as lagartas alimentadas com a dieta controle (Figuras 4 e 5). Estes resultados são semelhantes aos de Bown et al. (1997) que analisando atividade das tripsinas de *Helicoverpa armigera*, verificaram que a quebra do substrato BApNA pelos homogeneizados intestinais das lagartas alimentadas com IP era inferior a taxa encontrada nas lagartas da dieta controle.

Corroborando com os dados encontrados, ensaios realizados in vitro por Paullilo et al. (2000), demonstraram que a presença de IP de soja reduziu a atividade das tripsinas e quimotripsinas em lagartas de *S. frugiperda*. *H.zea* e *Agrotis ipsilon* também apresentaram atividade trípica reduzida quando alimentadas com dieta contendo 1% de inibidor do tipo Kunitz (MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY, 2001).

Os géis de atividade permitiram a avaliação visual das alterações no conteúdo das enzimas digestivas de *S. frugiperda* alimentadas com IP de soja. Na presença do inibidor foi detectado o aparecimento de novas bandas de atividade proteolítica, sendo estas formas induzidas pela presença dos IP, visto que na ausência do inibidor elas praticamente desaparecem. Também foi possível identificar uma banda de atividade proteolítica sensível aos IP de soja, pois esta praticamente desapareceu quando a lagarta foi exposta ao inibidor. Semelhante a estes dados Brito et al. (2001) identificaram bandas de alto peso molecular em extratos intestinais de *Heliothis virescens* alimentadas com IP. Bown et al. (1997) verificaram a presença de novas bandas, em géis de atividade após alimentarem lagartas de *H. armigera* com inibidor de soja do tipo Kunitz.

Segundo Volpicella et al. (2003), as enzimas resistentes ao inibidor apresentam uma menor afinidade ao substrato devido a alterações no sítio ativo. Sendo menor a afinidade, a atividade proteolítica destas enzimas é comprometida. Este fato está de acordo com os resultados encontrados, pois a atividade quimotríptica e trípica das lagartas expostas aos IP ficou abaixo da atividade das lagartas alimentadas com a dieta controle, mesmo sendo encontrado, no conteúdo intestinal das primeiras, novas enzimas digestivas.

Em posse destes dados, foi possível estimar o tempo necessário para que as lagartas de *S. frugiperda* promovessem uma alteração no conjunto das proteinases digestivas via controle transcricional. Assim sendo, foram preparadas as bibliotecas subtrativas a fim de identificar e caracterizar genes que estivessem envolvidos na adaptação de *S. frugiperda* aos IP de soja. Baseado na observação dos géis de atividades, decidiu-se construir as bibliotecas subtrativas a partir de insetos que se alimentaram durante 12 horas nas dietas contendo 0% e 0.5% de IP de soja.

2.4.2 Bibliotecas Subtrativas

A hibridização subtrativa permite a construção de bibliotecas enriquecidas de genes diferencialmente expressos entre duas situações diferentes. Em função disto, esta técnica foi usada para identificar genes envolvidos na adaptação de *S. frugiperda* aos IP de soja. Para isso foram empregadas as técnicas de subtração: "suppression subtractive hybridization" (SSH) e "representational difference analysis" (RDA).

A presença do inibidor no trato digestivo de *S. frugiperda* induziu a resposta de um grande número de genes (Tabela 1 e 2), isso indica que diversas classes gênicas são ativadas e/ou reprimidas para que o inseto possa se adaptar aos IP. Embora a expressão gênica da maioria dos genes encontrados não tenha sido validada, as bibliotecas construídas representam uma grande contribuição para novos estudos.

Uma grande parte dos genes responsivos são ainda desconhecidos (25% das seqüências da biblioteca "Forward" e 26% da "Reverse"). Quando as classes gênicas foram agrupadas em categorias de acordo com a função metabólica dos genes, a principal classe entre os clones "Forward" foi a das enzimas digestivas, cerca de 40% das seqüências. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Moon et al (2004) que analisando cDNAs de *Callosobruchus maculatus*, provenientes de bibliotecas subtrativas, identificaram a ativação de diversas classes gênicas em função da presença do inibidor de cisteino proteinase de soja na dieta. Após a análise de expressão diferencial por "microarray" de DNA, foram encontradas 63 seqüências sendo induzidas e 31 reprimidas. Entre os genes induzidos a maior classe identificada foi a dos genes envolvidos no processo digestivo, esta maior concentração foi relacionada a necessidade do inseto em manter adequado os níveis carbono e nitrogênio. Também foram ativados genes envolvidos na resposta ao ataque de patógenos, esta indução foi relacionada a presença do IP na dieta. Outros genes induzidos foram proteínas de detoxificação (como exemplo: citocromo P450 e ferritina). Entre os genes reprimidos foram encontrados: citocromo C e inibidor de serino-proteinases, a repressão a estes genes, segundo os autores, pode contribuir para a ativação das respostas a patógenos. Um número considerável de seqüências encontradas, pertence a categoria dos genes desconhecidos.

2.4.3 Análise da expressão diferencial por PCR em tempo real

Com o resultado das análises de expressão diferencial observou-se que *S. frugiperda* apresenta indução transcricional dos genes que codificam proteases digestivas, após a ingestão de IP. Nas condições experimentais do presente trabalho foram induzidas oito quimotripsinas e duas tripsinas, sendo expressas “de novo”, quatro isoformas de quimotripsina e uma de tripsina. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Mazumdar-Leighton; Broadway (2001), quando analisaram a indução transcricional de tripsinas e quimotripsinas em lagartas de *Agrotis ipsilon* e *H. zea*, alimentadas com inibidor kunitz de soja. Os autores observaram a expressão diferencial em 4 quimotripsinas e 6 tripsinas, sendo 2 destas expressas “de novo”.

Os maiores níveis de expressão das quimotripsinas induzidas foram encontrados após 48 horas de alimentação com inibidor. Apenas 3, entre as oito quimotripsinas quantificadas apresentaram níveis de expressão maiores após 24 horas de alimentação, entre elas as representadas pelos clones 450H07, 450F05 e 450F08. As duas tripsinas com expressão diferencial, 443D12 e 441F01, também foram mais expressas após 48 horas de alimentação com o inibidor. Bown; Wilkinson; Gatehouse (2004) encontraram um padrão de resposta enzimática semelhante ao do presente trabalho. Os autores verificaram que lagartas de *H. armigera*, alimentadas com inibidor de soja do tipo kunitz, aumentaram a expressão de tripsinas e quimotripsinas ao longo do período de alimentação, sendo que os maiores níveis de expressão foram encontrados após 72 horas de alimentação na dieta com inibidor.

Verificou-se que entre os onze genes testados, apenas um não respondeu ao tratamento. A expressão da tripsina representada pelo clone 456E02 não apresentou qualquer alteração transcricional na presença do inibidor durante o período de alimentação avaliado. Este gene pode ser um escape da técnica subtrativa ou então, as condições experimentais da PCR quantitativa não permitiram a detecção deste transcrito.

A técnica empregada para a análise da expressão diferencial, a PCR em tempo real, mostrou-se bastante satisfatória. Devido a sua taxa de aumento de temperatura

(*ramping*), tempo de anelamento e alongação limitantes, o ciclo rápido da PCR em tempo real ofereceram condições estridentes, levando a uma reação de PCR com alto grau de especificidade.

3 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que:

- As lagartas de *S. frugiperda* são capazes de se adaptar a presença dos IP de soja na dieta devido a expressão diferencial de suas proteinases.
- A expressão diferencial foi validada para oito enzimas da classe das quimotripsinas e duas da classe das tripsinas
- A análise da expressão de algumas enzimas identificadas nas bibliotecas subtrativas, sugere que o mecanismo envolvido na adaptação envolve: indução de enzimas novas e enzimas já existentes.

REFERÊNCIAS

APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: KERKOT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology; biochemistry and pharmacology**. New York: Pergamon Press, 1985. vol. 4, p. 279-311.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **FEBS Journal**, Oxford, v.204, p.433-451. 1992.

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

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease 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 proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, London, v.29, p.278-290, 2004.

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

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 proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, Part B128, p.365-375, 2001.

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, London, v.41, p.107-116, 1995.

BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v.32, p.39-53, 1996.

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

BROADWAY, R.M; VILLANI, M.G. Does host-range influence susceptibility of herbivorous insects to nonhost plant proteinase-inhibitors? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.76, n.3, p.303-312, 1995.

BUSTIM, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Oxford, v.25, n.2, p.169-193, 2000.

CARVALHO, RR.P.L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.** Piracicaba, 1970. 170p. Tese (Doutorado) – Escola Auperior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CHRISTELLER, J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS Journal**, Oxford, v.272, p.5710-5722, 2005.

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; SHAW, B.D.; BURGESS, E.P.J. Characterization and partial purification of the digestive proteases of the black field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker): Elastase is a major component. **Insect Biochemistry**, Oxford, v.20, n.2, p.157-164, 1990.

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.22, p.735-746, 1992.

CHRISTELLER, J.T.; SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. **Insect Biochemistry**, Oxford, v.19, p.233-241, 1989.

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 proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.997-1004, 1998.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. Plant-Pis: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Research**, London, v.30, n.1, p.347-348, 2002.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, Washington, v.93, p.6025-6030, June 1996.

FERREIRA, C. ; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera*

frugiperda larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.107A, p.631-641, 1994.

FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; MAGALHAES, C.P.; MONTEIRO, A.C.S.; BLOCH-JR, C.; MELO, F.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SA, 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. **Manual de entomologia agrícola**. 10.ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

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 protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, London, v.45, p.545-558, 1999.

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITING, B. Isolation and characterization of proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.3, p.327-333, 1990.

GIRARD C.; LE METAYER, M.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.28, p.229-237, 1998.

GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.393-401, 1998.

GRUDEN, K.; KUIPERS, A.G.J.; GUNCAR, G.; SLAPAR, N.; STRUKELJ, B.; JONGSMA, M.A. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.34, p.365-375, 2004.

GURSKAYA, N.G.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P.D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts. **Analytical Biochemistry**, v.240, p.90-97, 1996.

HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.22, n.25, p.5640-5648, 1994.

JOHNSTON, K.A.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, London, v.39, p.657-664, 1993.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant protease inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, Washington, v.92, p.8041-8045, 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, 1997.

JORDÃO, B.J.T.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, A.F.; LEHANE, M.J.; FERREIRA, C. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.26, p.337-346, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p.680–685, 1970.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M.A. What can the structures of enzyme–inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes? Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry and Biophysical Acta**, Palo Alto, v.1477. p.324-337, 2000.

LEE, S.I.; LEE, S.H.; KOO, J.C.; CHUN, H.J.; LIM, C.O.; MUN, J.H.; SONG, Y.H.; CHO, M.J. Soybean kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.5, n.1, p.1-9, 1999.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, New York, v257, p.967-71, 1992.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, Boca Raton, v.34, p.31-67, 1994.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.31, p.645-657, 2001.

MELLO, M.O.; TANAKA, A.S.; SILVA-FILHO, M.C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.27, p.103-112, 2003.

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, p.469-474, 1995.

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.283-291, 2004.

NALIM, D.M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. 150p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1991.

OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN, C.A. Expression of an antisense prosystemin in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v.90, n.17, p.8273-8276, 1993.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZII, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. cap.2, p.9-65.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.35, p.1015-1038.

PASTORIN, K.; HAWEL III, L.; BYUS, C.V. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. **Analytical Biochemistry**, New York, v.283, p.89-98, 2000.

PATANKAR A.G.; HARSULKAR, A.M.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P.K.; DESHPANDE, V.V. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.31, p.453-464, 2001.

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 proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.93, n.3, p.892-896, 2000.

PEDIGO, L.P. **Entomology and pest management**. New York: MacMillan, 1989. 646p.

PENCOE, N.L.; MARTIN, P.M. Developmental and reproduction of fall armuworm on several wild grasses. **Environmental Entomology**, New Yorrk, v.10, n.6, p.999-1002, 1981.

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.29, n.9, 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, p.79-85, 2001.

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, 1992.

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

RICHARDISON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: ROGER L.J. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. chap.5, p.259-305.

RIZZO, H.F.; LA ROSSA, F.R. Aspectos morfológicos y biológicos de la “oruga militar tardía” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Bogotá, v.13, n.2-3, p.193-199, 1992.

RUTLEDGE, R.G.; COTE, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acid Research**, London, v.31, n.16, p.93-99, 2003.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 552p.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, New York, v. 270, p.467-470, 1995.

SOUZA, E.M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parayba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, Oxford, v.39, p.521-525, 1995.

TERRA, W. R. ; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L. I.; IATROV, K.; GILL, S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 4, p. 171-224.

TERRA, W.R. Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. 360p.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; JORDAO, B.P.; DILLON, R.J. Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman and Hall, 1996. chap.6, p.153-186.

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

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

VALAITIS A.P. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.25, p.139–149, 1995:

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial Analysis of Gene Expression. **Science**, New York, v.20, p.484-487, Oct. 1995.

VIANA, P.A. **Efeito de doses do inseticida clorpirifos para o controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), na cultura do milho.** In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Relatório técnico anual 1992-1993. Sete Lagoas, 1994. v.69, p.65.

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 proteinase inhibitors. **FEBS Journal**, Oxford, v.270, p.10-19, 2003.

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

WHITWORTH, S.T.; BLUM, M.S.; TRAVIS, J. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta*: isolation and characterization of four serine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.14430-14434, 1998.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v.4, p.1-6, 1992.

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 protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v.12, n.2, p.135-145, 2003.