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

Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de proteinases de plantas

Ligia Hansen Arruda

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

Piracicaba 2011 Ligia Hansen Arruda Bióloga

Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de proteinases de plantas

Orientador: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

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

Piracicaba 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ÉSALQ/USP

Arruda, Ligia Hansen Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de proteinases de plantas / Ligia Hansen Arruda. - -Piracicaba, 2011. 100 p.: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Bioinformática 2. Inibidores de enzimas 3. Interação planta-inseto 4. Lagartas Genética molecular vegetal 6. Modelagem molecular 7. Proteinases I. Título

CDD 631.522 A779c

ł

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

Dedico esta tese:

Aos meus pais e minha irmã pelo amor, paciência e incentivo, e por me ensinarem desde muito cedo que estudar faz toda a diferença.

Ao Fernando pela força e companherismo em todos os momentos e que entre tantas coisas boas me deu a chance de ser mãe.

Ao meu filho, que me inspira a viver mesmo antes de nascer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Marcio de Castro Silva Filho pela orientação e ensinamentos transmitidos nesse trabalho e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Daniel Scherer de Moura, por toda paciência em esclarecer dúvidas e apontar caminhos, sendo indispensável para a conclusão deste projeto.

Ao Dr. Marcelo Brandão, por toda a ajuda na modelagem de proteínas e em todas as outras análises de dados de bioinformática desse trabalho.

Ao Dr. Goran Neshich da EMBRAPA, por auxiliar esse trabalho nas questões de bioinformática estrutural, dando apoio e direcionamento ao projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela ajuda e pelas discussões construtivas. Ao técnico Rafael, por cuidar tão bem da minha plantação de algodão.

À sra. Neide Graciano Zério, técnica do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelo preparo das dietas artificiais.

Aos amigos espalhados pela ESALQ, pelos momentos de descontração, também muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Fernando, pelo amor, amizade, companherismo. Por tornar minha vida melhor e feliz e me dar o presente mais especial da minha vida.

Agradeço especialmente aos meus pais, Aroldo e Regina e minha irmã Luiza. Os motivos são muitos. Amor, apoio, dedicação, incentivo, carinho, estímulo e paciência.

As minhas tias Paula e Tereza, pelo incentivo aos meus estudos desde a faculdade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado e São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original. Albert Einstein

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Inibidores de proteinases de plantas (IPs)	25
2.2 Proteinases digestivas dos insetos	26
2.3 Adaptação dos insetos aos IPs	28
2.4 Mecanismo de adaptação da espécie Spodoptera frugiperda	30
2.5 Enovelamento de proteínas	32
2.6 Bioinformática estrutural	35
2.7 Uso da bioinformática estrutural no estudo das SPs	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Seleção do cultivar de algodão para alimentação das lagartas	39
3.2 Criação das lagartas de S. frugiperda em dieta natural de algodão	39
3.3 Extração e purificação parcial dos IPs de soja	39
3.4 Criação das lagartas de S. frugiperda em dieta artificial	40
3.5 Extração de RNA total	41
3.6 Isolamento de mRNA	42
3.7 Biblioteca de cDNA de S.frugiperda	42
3.7.1 Síntese da primeira fita de cDNA	42
3.7.2 Sintese da segunda fita de cDNA	43
3.7.3 Ligação do adaptador attB1 na porção 5' do cDNA dupla fita	43
3.7.4 Fracionemento do cDNA	43
3.7.5 Recombinação	44
3.7.6 Transformação de bactérias eletrocompetentes	44
3.8 Sequenciamento dos clones	44
3.9 Análise estrtural	45

SUMÁRIO

3.9.1 Modelagem estrutural	45
3.9.2 Hard-docking	46
3.9.3 Dinâmica molecular	46
3.9.4 Docagem automática	47
3.9.5 Cálculo da Área Acessível ao Solvente (ASA)	48
3.10 PCR em tempo real	49
4 RESULTADOS	53
4.1 Análise da biblioteca de cDNA de S. frugiperda	53
4.2 Modelagem estrutural da quimotripsinas	54
4.3 Qualidade dos modelos	55
4.4 Análises das estruturas moleculares	62
4.4.1 Docagem	62
4.4.2 Conservação das estruturas	62
4.4.3 Afinidade das quimotripsinas aos IPs testados	66
4.5 Expressão gênica	67
4.5.1 Expressão gênica das quimotripsinas	68
4.5.2 Expressão gênica das tripsinas	70
4.5.3 Proporções de expressão de quimotripsinas e tripsinas em 48 horas de	
tratamento com IPs de soja	72
5 DISCUSSÃO	75
5.1 SPs encontradas na biblioteca de cDNA construída	75
5.2 Modelos estruturais	75
5.3 Estimativa de afinidade das quimotripsinas pelos IPs testados	76
5.4 Presença da serina extra e ASA	77
5.5 Expressão gênica	78
5.5.1 Quimotripsinas	78
5.5.2 Tripsinas	79
5.6 Afinidade x expressão	79
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	95

RESUMO

Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de proteinases de plantas

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos para reduzir o ataque de insetos, incluindo compostos protéicos de defesa, como os inibidores de proteinases (IPs). Os insetos, ao longo da evolução, desenvolveram estratégias para superar as barreiras defensivas das plantas, permitindo a sua alimentação e desenvolvimento, como a super expressão de genes de enzimas digestivas sensíveis e insensíveis aos IPs de plantas. Uma das abordagens desse trabalho foi identificar novas serinoproteinases no intestino de lagartas de Spodoptera frugiperda. Duas novas quimotripsinas e trê novas tripsinas foram identificadas e juntamente com mais 10 genes já conhecidos que codificam estas enzimas foram submetidos à análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Entre essas duas famílias de serinoproteinases (SPs) os genes que codificam as quimotripsinas apresentam uma regulação positiva mais ampla do que agueles que codificam as tripsinas. Estudos de modelagem molecular das quimotripsinas também foram realizados. Foram construídos modelos tridimensionais à partir de modelagem por homologia além de análises de dinâmica molecular e docagem com oito diferentes IPs do tipo Bowman-Birk. Os resultados mostram quais quimotripsinas apresentam as maiores afinidades aos inibidores testados de maneira geral e individual, inferidos à partir da estimativa de energia livre do sistema. Também foi encontrada uma serina extra próxima ao sítio catalítico de três quimotrispsinas modeladas que pode interferir na afinidade dessas enzimas já que este aminoácido apresenta perda de área acessível ao solvente quando complexada ao IP de soja testado. Os resultados de expressão gênica e grau de sensibilidade foram comparados e não se observou qualquer relação entre esses parâmentros. Isso sugere que as lagartas da espécie S. frugiperda combinam diferentes estratégias adaptativas como o aumento de expressão de todas as suas quimotripsinas independentemente do grau de sensibilidade das enzimas.

Palavra-chaves - Serino-proteinases; Modelagem estrutural; Quimotripsinas; Spodoptera frugiperda

ABSTRACT

Structural characterisation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) serine proteinase interactions with plant proteinase inhibitors.

Plants have developed different mechanisms to reduce insect attack, including defence proteins such as proteinase inhibitors (PIs). In turn, insects have evolved strategies to overcome these plant defence mechanisms, such as the hyperexpression of PI-sensitive and insensitive digestive enzymes, allowing the insect to thrive. One of the aims of this work was to identify new serine proteinases (SPs) in the gut of the fall armyworm larvae, Spodoptera frugiperda. Two new chymotrypsins and three new trypsins were identified, and together with 10 previously identified genes, the genes that encode these enzymes were subjected to real-time PCR and gene expression analysis. Between these two families of serine-proteinases the genes that encode chymotrypsins show a greater positive regulation then those encoding the trypsins. Molecular modelling studies of the chymotrypsins were carried out, and 3D models were generated using homology modelling, which were then further refined by dynamic molecular and docking analyses with 8 different Bowman-Birk type PIs. The results demonstrate which chymotrypsins possess the highest affinities to the tested inhibitors in a general and individual manner, inferred from the estimated free energies. A serine residue in very close proximity to the catalytic site was present in three of chymotrypsins investigated, which may be affecting the enzyme's affinity since the residue has a reduced accessible area to the solvent when complexed to the sova PI tested. The genetic expression patterns and the degree of PI-sensitivity were also compared and no relation between the parameters was found. This suggests that the larvae of the species S. frugiperda combine different adaptive strategies like the increase in expression of its entire chymotrypsin arsenal regardless of the degree of PI-sensitivity of the enzymes.

Key words: Serine proteinases; Structural modelling; Chymotrypsins; Spodoptera frugiperda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Categorização da resistência de plantas frente ao ataque de insetos	22
Figura 2 - Funil de <i>folding</i>	34
Figura 3 - Gel desnaturante de RNA	41
Figura 4 - Modelo de grade proposto pelo AutoDock	48
Figura 5 - Representação esquemática da área acessível ao solvente	
calculada	49
Figura 6 - Géis para análise da biblioteca de cDNA	53
Figura 7 - Alinhamento das nove quimotripsinas modeladas	54
Figura 8 - Gráficos Ramachandran dos modelos construídos	56
Figura 9 - Estrutura secundária dos modelos de quimotripsinas	58
Figura 10 - Complexo SfChy5 e IP controle	62
Figura 11 - Alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das	
quimotripsinas	63
Figura 12 - Conservação do sítio catalítico	64
Figura 13 - Presença de uma serina extra	65
Figura 14 - Gráfico de afinidade das quimotripsinas a todos os IPs testados	67
Figura 15 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas	69
Figura 16 - Expressão relativa dos genes de tripsinas	71
Figura 17 - Gráfico de proporções na participação das famílias de SP, tripsinas	
e quimotripsinas, no processo digestivo das lagartas de S.	
frugiperda	72
Figura 18 - Gráfico de proporções de expressão dos genes individuais de	
tripsinas e quimotripsinas em 48 horas de tratamento das lagartas	
de <i>S. frugiperda</i> com IPs de soja	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta artificial para criação das larvas de S.	
frugiperda	41
Tabela 2 - IPs de plantas utilizados para a geração de modelos dos complexos	
SP-IP	46
Tabela 3 - Pares de iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo	
real	51
Tabela 4 - Cálculos de ASA	66
Tabela 5 - Valores de energia livre da ligação dos complexos modelados	66

LISTA DE SIGLAS

- ASA Área Acessível ao Solvente
- IFR Interface de Contato
- IP Inibidor de Proteinase
- RMN Ressonância Magnética Nuclear
- SBBI Inibidor Bowman-Birk de soja

SfChy – Quimotripsina de Spodoptera frugiperda

- SfTry Tripsina de Spodoptera frugiperda
- SKTI Inibidor Kunitz de soja
- SP Serino Proteinase

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, os insetos se tornaram a maior classe entre os animais, colonizando quase todos os nichos ecológicos do planeta. Durante todo o tempo, eles estiveram em contato com plantas, parasitas e patógenos, o que contribuiu com o sucesso evolutivo da classe, proporcionando o desenvolvimento de mecanismos de defesas específicos.

Para os insetos, herbívoros ou não, uma planta, além de fonte de alimento, pode servir também como sítio para acasalamentos, refúgio ou abrigo temporário ou mesmo como um lugar para se estabelecer de modo permanente. Do ponto de vista das plantas, a ação dos herbívoros comumente tem efeitos negativos, pois diminui as chances de reprodução e sobrevivência dos indivíduos atacados, principalmente no início do ciclo de vida. Interações recíprocas durante a evolução entre insetos fitófagos e suas respectivas fontes de alimentação vegetal, ou insetos polinizadores e as plantas por eles polinizadas, são descritas como co-evolução (EHRLICH; RAVEN 1964).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos para reduzir o ataque de insetos, incluindo respostas específicas que ativam diferentes vias metabólicas as quais alteram consideravelmente suas características químicas e físicas (FALCO et al., 2001). Entre as principais respostas estão: a formação de compostos protéicos de defesa como os inibidores de proteinases (IPs), formação de compostos tóxicos como a nicotina e a emissão de voláteis que atraem inimigos naturais dos insetos. Todas essas respostas têm como principal sinalizador o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados como a defesa contra estresses (WASTERNACK *et al.* 2006).

Essas respostas das plantas à herbivoria são categorizadas como defesa direta, defesa indireta e tolerância (WALLING, 2000; KESSLER; BALDWIN, 2002), incluindo, na interação planta-inseto, além de mecanismos da planta e do inseto, a ação de outros organismos que vivem no mesmo ambiente (figura 1).



Figura 1 - Categorização da resistência de plantas frente ao ataque de insetos. (Fonte: KESSLER; BALDWIN, 2002)

Alguns dos mecanismos de defesa são expressos constitutivamente, enquanto outros como IPs e polifenol oxidases não são normalmente acionadas a menos que a planta tenha sofrido dano (TRUITT; WEI; PARÉ, 2004).

As respostas de defesa das plantas contra herbívoros são ativadas quando a saliva dos herbívoros interage (entra em contato) com a planta em nível celular. As substâncias que ativam as defesas das plantas recebem o nome de elicitores, sendo que dois tipos já foram isolados da secreção oral de Lepidópteras (larvas), enzimas

líticas e conjugados de ácidos graxos – aminoácidos, e ambas induzem respostas de defesa direta e indireta (KESSLER; BALDWIN, 2002).

Os insetos, por sua vez, desenvolveram várias estratégias para superar as barreiras defensivas das plantas, permitindo a sua alimentação, desenvolvimento e reprodução em seus hospedeiros. Muitas espécies são capazes de escapar dos efeitos negativos dos IPs das plantas, desenvolvendo-se normalmente mesmo na presença de IPs em sua dieta.

Decifrar a interação planta-inseto em nível molecular é um dos assuntos de maior interesse na pesquisa contemporânea em biologia de plantas. Em poucos anos, vários aspectos da resposta de plantas ao dano de insetos têm sido investigados, incluindo a caracterização de respostas diretas e indiretas, a regulação da expressão gênica resultante do ataque de insetos e vias de transdução de sinais.

Os mecanismos adaptativos dos insetos também são de grande interesse nesses estudos. Essas informações nos permitem entender toda a dinâmica da interação entre insetos e plantas e dessa forma abre caminhos e perspectivas para um melhor controle biológico de pragas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inibidores de proteinases de plantas (IPs)

Muitos trabalhos, utilizando técnicas diferentes mostram que um grande número de genes têm sua regulação modificada (para cima ou para baixo) quando plantas são atacadas por insetos fitófagos. Uma grande quantidade de transcritos demonstra a complexidade da resposta de defesa vegetal. Dentre todos esses genes, há os que codificam proteínas diretamente ligadas a defesa da planta ou sinalizadores de defesa, mas também há genes que codificam metabólitos secundários, proteínas presentes em estresse abiótico, de manutenção celular e ligados a fotossíntese, além de muitos outros com função desconhecida (HERMSMEIER; SCHITTKO; BALDWIN, 2001; REYMOND *et al.*2000; ZHU-SALZMAN; BI; LIU, 2005).

Durante a alimentação nos tecidos das plantas, os insetos encontram uma série de defesas bioquímicas, as quais podem ser constitutivas ou sintetizadas em resposta ao ataque dos insetos. Um dos mecanismos de defesa melhor estudado é a produção de IPs, que são proteínas presentes em praticamente todas as plantas, capazes de se ligar às enzimas digestivas dos insetos, inibindo a sua atividade proteolítica de forma competitiva. São proteínas usualmente de baixo peso molecular presentes em alta concentração em tecidos de reserva, mas também detectadas em folhas, em resposta ao ataque de insetos (RYAN, 1990). Os IPs são conhecidos desde 1938 como peptídeos que atuam na defesa das plantas (READ; HAAS, 1938 apud LIENER, 1994), porém também apresentam outras funções biológicas importantes como acúmulo de proteínas de reserva ricas em aminoácidos sulfurados e regulação de proteinases endógenas envolvidas nos processos de dormência e germinação (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2004).

A atividade dos IPs se deve a capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvos, bloqueando, alterando e prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima tornando a proteólise limitada e lenta (TIFFIN; GAUT, 2001). Dessa forma, o crescimento e desenvolvimento dos insetos é prejudicado, podendo levá-los à morte

pela redução da disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (JONGSMA; BOLTER, 1997).

O estudo dos IPs é importante para disponibilizar novas maneiras de proteger plantas cultivadas. Cerca de 59 famílias diferentes são conhecidas (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2004) mas as consideradas como principais na defesa das plantas são aquelas que têm capacidade de inibir as quatro grandes classes de proteinases, as serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteinases.

Os inibidores das serino-proteinases são a classe mais extensivamente caracterizada e estão relacionados com defesa da planta contra herbívoros. Estão agrupados em 16 famílias, baseadas na similaridade de sua sequência e no mecanismo de ligação à proteína (RYAN, 1990).

Os inibidores de serino-proteinases melhor conhecidos são os IPs de batata tipo I e tipo II, IPs tipo Kunitz e IPs tipo Bowman-Birk. No caso das plantas de soja, as classes Kunitz e Bowman-Birk se apresentam em grande quantidade. O inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz, além de apresentar atividade inibitória, também é uma das principais proteínas armazenadas nas sementes (LEE et al., 1999). Ele apresenta peso molecular de cerca de 20 kDa, baixo conteúdo de cisteínas, um único sítio inibitório e possui especificidade contra a ação de tripsinas (LIENER, 1994). Já o inibidor do tipo Bowman-Birk, apresenta peso molecular de 8 a 10kDa, alto conteúdo de cisteínas, dois sítios inibitórios e possui atividade inibitória contra tripsinas e quimotripsinas (GARIANI; LEATHERBARROW, 1997).

2.2 Proteinases digestivas dos insetos

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

Dentre as enzimas digestivas dos insetos destacam-se as peptidases, as glicosilases e as lipídeo-hidrolases (TERRA et al. 1996). As proteases (peptídeo-

hidrolases) incluem as endopeptidases ou proteinases e as exopeptidases. As proteinases podem ser divididas em quatro sub-classes de acordo com seu mecanismo catalítico: serino-proteinase, cisteíno-proteinase, aspartato-proteinase e metalo-proteinase. As exopeptidases por sua vez podem ser classificadas em duas sub-classes: aminopeptidases, enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica, e carboxipeptidases, enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade C-terminal (TERRA; FERREIRA, 1994).

As serino-proteinases (SPs) são as principais enzimas hidrolíticas detectadas no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera (APPLEBAUM, 1985). Dentre elas destacam-se as tripsinas, quimotripsinas e elastases que são importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (GEOFFROY; LEGRAND; FRITING, 1990). Estas enzimas possuem aminoácidos com propriedades especiais que permitem a ligação ao substrato e a consequente catálise. Esses aminoácidos, His57, Asp102 e Ser195 (posições baseadas em uma quimotripsina bovina), são chamados de tríade catalítica e formam o sítio ativo da enzima.

Existem cerca de 40 SPs que são distinguíveis pelas suas estruturas primárias e estão agrupadas em seis clãs de acordo com suas estruturas terciárias. As SPs que possuem a tríade formada por histidina, ácido aspártico e serina (nessa ordem) e que apresentam forma de β-barril são agrupadas no clã SA (RAWLINGS; BARRETT, 2004).

Como todas as enzimas proteolíticas, as SPs apresentam além de um sítio catalítico, um sítio de ligação. O primeiro consiste em um número limitado de aminoácidos (neste caso, uma tríade) responsáveis pela quebra de uma ligação peptídica. O segundo é formado por vários aminoácidos responsáveis pelo alinhamento do substrato para que ocorra a catálise. Os sítios de ligação podem ser divididos em subsítios de ligação que garantem a ligação de um aminoácido específico do substrato. Os subsítios estão localizados em ambos os lados do sítio catalítico e são representados pela letra S e S'. No substrato, os resíduos de aminoácidos que ocupam os subsítios, na enzima, são indicados pela letra P, correspondendo aos subsítios que eles ocupam (RAWLINGS; BARRETT, 2004).

As propriedades de um determinado subsítio determinam qual resíduo do substrato irá se ligar (SCHECHTER; BERGER 1967). O clã SA possui os subsítios S1a S4 e S29 a S32, sendo que as tripsinas, quimotripsinas e elastases pertencem à família S1. Mas apesar das similaridades nas estruturas primárias e terciárias dessas enzimas, elas apresentam especificidade bastante distinta.

As quimotripsinas são enzimas que clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região da carboxila de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral aromática. As quimotripsinas de insetos possuem massa molecular na faixa de 20 a 30kDa e pH ótimo de 8 a 11 (TERRA; FERREIRA, 1994). 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). As elastases hidrolisam preferencialmente na região carboxila de resíduos hidrofóbicos de cadeia lateral menos volumosa como Ala, Gly, Val e Leu. Elastases já descritas em insetos e quimotripsinas apresentam semelhança de especificidade para alguns substratos (TERRA; FERREIRA, 2005).

2.3 Adaptação dos insetos aos IPs

Como resposta a defesa das plantas, os insetos têm desenvolvido ao longo do tempo mecanismos para contornar os efeitos negativos da ingestão de IPs. Dessa forma, diferentes mecanismos adaptativos possibilitaram o sucesso evolutivo desse grande grupo de animais (MELLO; SILVA-FILHO 2002; MOON et al. 2004).

Muitos experimentos *in vitro* com extratos intestinais de diferentes lagartas e inibidores purificados mostram que os inibidores são eficientes se incorporados na dieta artificial dos insetos (ORTEGO et al., 1998; FRANCO et al., 2003; POMPERMAYER et al., 2001) ou quando expressos nas plantas transgênicas (LEE et al., 1999; YEH et al., 1997; DE LEO et al., 2001; FALCO; SILVA-FILHO, 2003; DUNSE et al., 2010a).

Embora, diversas espécies-praga apresentem redução no crescimento e atraso no desenvolvimento, como resultado da inibição das enzimas digestivas (BROADWAY; DUFFEY, 1986; BROADWAY; VILLANI, 1995; FRANCO et al., 2004; GATEHOUSE et al., 1999; POMPERMAYER et al., 2001), muitas espécies são capazes de escapar dos efeitos negativos dos IP das plantas (BRITO et al., 2001; BROADWAY 1995; BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; JONGSMA et al., 1995; VOLPICELLA et al., 2006).

Broadway e Duffey (1986) verificaram que as *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa* (*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 (PAULILLO et al., 2000; BRITO et al., 2001; ABDEEN et al., 2005). Estas enzimas podem ser proteinases secretadas normalmente no tubo digestivo ou podem ser ativadas após a ingestão de inibidores de proteinase (BROADWAY, 1996).

Bolter e 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 tríptica insensível ao inibidor, cerca de duas vezes maior quando comparadas aos insetos do tratamento controle. Broadway (1996) trabalhando com *H. zea* alimentadas com IP incorporado à dieta observou que as lagartas foram capazes de aumentar de 2,5 a 3 vezes a produção de uma proteinase pouco sensível ao inibidor.

Aparentemente os insetos polífagos conseguem utilizar uma combinação de diferentes estratégias para driblar os efeitos dos IP, como o coleóptero *Callosobruchus maculatus* (ZHU-SALZMAN; BI; LIU, 2003). A espécie *Mamestra configurata* também parece recorrer a diferentes estratégias para se adaptar aos IPs presentes em sua dieta inclusive mudando o perfil de expressão de acordo com os

IPs presentes (ERLANDSON, 2010). Além da ativação de enzimas envolvidas com a proteólise, os insetos também ativam genes responsáveis pela defesa, detoxificação, genes com funções ainda desconhecidas e também genes ainda não descritos (MOON et al. 2004).

Volpicella et al. (2003) caracterizando as tripsinas presentes nos intestinos de lagartas de *H. zea* alimentadas com 0,5% de inibidor de tripsina de soja (SKTI), verificaram a presença de uma nova tripsina (Hz15) a qual, nos ensaios enzimáticos, se mostrou insensível aos inibidores testados (IPs de soja, batata e mostarda). Além disso, constataram uma série de diferenças entre as enzimas. A sequência de aminoácidos das enzimas sensíveis e insensíveis ao inibidor do tipo Kunitz foram determinadas e verificou-se a presença de 5 regiões que diferenciam as isoformas e que se sobrepunham aos resíduos de contato entre enzima e inibidor. Em 2004, Bown et al. também detectaram expressão diferencial nos genes de tripsina presentes nos intestinos de lagartas do mesmo gênero (*H. armigera*) alimentadas com inibidores Kunitz de soja (SKTI) e Bowman-Birk de soja (SBBI). Neste mesmo ano, Moon et al. (2004) mostraram que lagartas de *Callosobruchus maculatus*, alimentadas com inibidores de cisteíno protease de soja, respondem super produzindo cisteíno proteases menos sensíveis ao inibidor.

A dieta consumida influencia diretamente o perfil das proteases digestivas dos insetos. Erlandson (2010) demonstrou que diferentes proteases digestivas são expressas dependendo do tipo de alimentação consumida por larvas de *Mamestra configurata*. Quando a larva se alimentou por 96h de dieta arificial contendo SBBI, havia atividade de proteases de 100, 30 e 21 kDa, enquanto que as lagartas que se alimentaram de dieta natural de folhas de *Brassica napus* possuíam perfil diferente, com atividades de proteases de 55 e 33 kDa. Ainda nesse mesmo trabalho foi mostrado que a mudança de perfil de atividade de proteases ocorre rapidamente (em cerca de 6 horas) quando as dietas são trocadas demonstrando como é eficiente o mecanismo de adaptação desse inseto.

2.4 Mecanismo de adaptação da espécie Spodoptera frugiperda

S. frugiperda é um inseto polífago e é considerada como uma das principais

pragas agrícolas no Brasil, notadamente em função dos danos causados à cultura do milho, algodão e outras monocotiledôneas. O controle dessa praga tem sido realizado principalmente pelo uso de produtos químicos. Porém, diante das consequências negativas do uso indiscriminado desses produtos (contaminação do ambiente e desequilíbrio biológico, entre outras), novas alternativas estão sendo buscadas para o manejo das pragas e uma das possibilidades envolve o uso de IPs de plantas.

A adaptação de lagartas de *S. frugiperda* aos IPs foi inicialmente reportada em um trabalho de Paulillo et al. (2000). Nesse trabalho foram observadas alterações na atividade tríptica e quimotríptica de *S. frugiperda* quando o inseto foi submetido à dieta contendo IP de soja. Tais alterações foram relacionadas à adaptação das lagartas aos IPs, 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 grupo controle e aquelas que se alimentaram da dieta contendo IPs de soja. Esta adaptação permitiu que as lagartas apresentassem o mesmo desempenho que lagartas alimentadas em dieta sem a presença dos IPs de soja.

Estudos sobre o processo co-evolutivo entre plantas e insetos herbívoros, caracterizado pelo seu dinamismo e mudanças adaptativas distintas, têm sido de grande interesse para a agricultura. Recentemente, foi caracterizado em detalhes a base genética desta adaptação (BRIOSCHI et al., 2007). Neste trabalho, foi mostrado que o genoma deste inseto é composto por algumas dezenas de genes que codificam diferentes SPs, principalmente do grupo das tripsinas e quimotripsinas, indicando que um processo de duplicação gênica seguido de pequenas variações na sequência, e que um controle da ativação destes genes em resposta aos inibidores foi responsável pela adaptação da lagarta. Esta observação pode explicar em parte o polifagismo acentuado deste importante inseto-praga. Uma observação interessante foi que muitos destes genes eram expressos apenas quando a lagarta era exposta aos IPs de soja (enzimas sintetizadas "de novo"). Além disso, foi observado que outros genes que codificam SPs, apesar de expressos na ausência de IPs, tiveram sua expressão significativamente aumentada pela presença dos inibidores.

Em outra pesquisa foi determinado o nível de atividade enzimática basal de enzimas digestivas de *S. fruguiperda* na tentativa de diferenciar a atividade induzida pela presença de nutrientes na dieta. Os autores observaram que não há diferenças no nível de atividade das enzimas digestivas (incluindo tripsinas) entre as lagartas mantidas em jejum por até três dias e as lagartas alimentadas com dieta artificial pobre em nutrientes no mesmo período. A atividade enzimática aumenta apenas quando as lagartas são alimentadas com dieta artificial rica em nutrientes (LWALABA; HOFFMANN; WOODRING, 2010).

As análises estruturais do mecanismo de inibição das SPs também têm sido amplamente estudadas. Trabalhos recentes mostram que pequenas modificações em resíduos vizinhos à His 57 de quimotripsinas (que compõe a tríade catalítica) de lepdópteros, são capazes de definir a insensibilidade a substratos como clorometil cetonas (TPCK), que comumente são capazes de inativar quimotripsinas de mamíferos e de outras ordens de insetos (LOPES et al., 2006; LOPES; SATO; TERRA, 2009). Um outro estudo indicou que o complexo de inibição SBBI-tripsina é caracterizado principalmente por pontes de hidrogênio e pontes salinas, enquanto que o complexo de inibição SBBI-quimotripsina é baseado em interações do tipo hidrofóbicas (FERNANDEZ et al., 2007).

Todos esses estudos ajudaram a elucidar, em parte, os mecanismos adaptativos que os insetos herbívoros desenvolveram ao longo de sua evolução para burlar as barreiras de defesa das plantas e como a interação entre enzimas digestivas dos insetos e os IPs de plantas pode ser central na co-evolução desses dois grandes grupos de organismos. Portanto, entender as propriedades moleculares das proteinases digestivas dos insetos é fundamental para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela adaptação aos diversos tipos de dieta, inclusive na presença dos IPs.

2.5 Enovelamento de proteínas

Para que possa funcionar corretamente, cada proteína deve exibir uma estrutura tridimensional única que determina a sua função biológica. Sua estrutura estável é produto final de um processo complexo envolvendo o enovelamento e a dobragem da
cadeia de aminoácidos que compõem a proteína (processo também conhecido como *folding*). O enovelamento, portanto é um processo de autoconstrução a partir do qual uma cadeia polipeptídica encontra uma estrutura nativa tridimensional em condições fisiológicas (DILL et al., 2008).

Assim como esse processo de dobramento, quase todas as funções protéicas são resultados de um mesmo princípio termodinâmico simples: a proteína deve adotar o estado termodinâmico mais estável. As leis da termodinâmica afirmam que um processo espontâneo é acompanhado pela liberação de energia livre, passando o sistema a ocupar um estado de menor energia e, portanto mais estável termodinamicamente (estado nativo) (ANFISEN, 1973). É o caso das proteínas, pois seu estado nativo é o estado termodinâmico mais estável, o que explica a razão da estrutura tridimensional.

Sabemos também que uma proteína encontra seu estado nativo rapidamente demonstrando que essa "busca" pela conformação de baixa energia não é aleatória (o número de interações possíveis nesse caso tenderia ao infinito, sendo necessário um tempo muito grande para que todas as possibilidades de conformação fossem testadas). Portanto, a estrutura nativa da proteína estaria também sob controle cinético, ou seja, bastaria que a proteína encontrasse uma conformação suficientemente baixa energeticamente que garantisse alguma estabilidade, sem que para isso tivesse de explorar exaustivamente todo o espaço conformacional (SALI; SHAKHNOVLCH; KARPLUS, 1994). Portanto os dois controles estão presentes: é verdade que a forma nativa das proteínas é a de menor energia do ponto de vista termodinâmico como também é verdade que isso não ocorre de forma aleatória como afirma a hipótese cinética.

A tragetória afunilada de energia livre, também conhecida como *funil de folding* (figura 2) une as duas hipóteses (termodinâmica e cinética) para explicar o enovelamento de proteínas: os estados não nativos, que apresentam alta entropia, percorrem vários estados intermediários em uma cadência para o estado nativo, até o ponto de convergência quando o estado nativo é alcançado (ONUCHI et al., 1996). A energia de uma determinada conformação será determinada por várias forças

moleculares diferentes que agem nessa conformação, como interações eletrostáticas, forças de Van der Walls, pontes de hidrogênio e energia de solvatação.

O mesmo acontece quando ocorre uma ligação entre proteínas, protease-IP por exemplo, em que as proteínas estão livres em solução. A conformação de menor energia será um complexo altamente específico entre as duas moléculas. Dessa forma, quando se determina o mínimo global de energia de um complexo, pode-se afirmar que o estado mais estável daquele complexo foi encontrado.

Essas informações tornaram possível o desenvolvimento de metodologias para a predição *in silico* de estruturas baseando-se diretamente nas sequências primárias de aminoácidos, sendo possível formular hipóteses a respeito da função de uma proteína.



Figura 2 - Funil de folding. A largura do topo do funil representa a configuração entrópica enquanto a ponta inferior representa a energia livre de uma configuração individual. A estrutura primária de uma proteína se organiza até o estado nativo em uma velocidade que não leva mais que alguns milisegundos, começando pela formação rápida das hélices da estrutura. No estado de transição para a estrutura final (estado nativo) as hélices são ordenadas (modificado de ONUCHIC et al. 1996)

2.6 Bioinformática estrutural

As ferramentas de bioinformática hoje, além de classificar, automatizar, buscar informação dentro do um vasto conjunto de bancos de dados biológicos públicos, também têm sido usadas para inferir função das proteínas, criar modelos estatísticos e encontrar padrões, simular sistemas e fazer previsão de seu comportamento.

A Bioinformática Estrutural é uma área do conhecimento que envolve outras três grandes áreas, a Biologia Molecular Estrutural, a Modelagem Molecular e a Bioinformática. Seu rápido desenvolvimento é resultado da evolução dos métodos e aparatos computacionais que permitem cada vez mais processar enormes quantidades de informação com velocidade que também cresce a cada dia.

As ferramentas de bioinformática buscam padrões comuns entre as estruturas conhecidas (propostas por métodos como cristalografia de raio-X e ressonância magnética nuclear (RMN)) e as cadeias de aminoácidos das proteínas de estrutura desconhecidas através de homologia, por exemplo, ou ainda modelando estruturas terciárias e aplicando forças físicas (modelagem estrutural e dinâmica molecular) que vão influenciar no resultado. Essas ferramentas também possibilitam a identificação e análise de sítios-ativos e sítios de ligação, docagem e desenho de ligantes, análise de interações proteína-proteína (SOUZA; ORNSTEIN, 1999) e simulação de sistemas biológicos.

Com o conhecimento de que as proteínas não são estruturas rígidas, a dinâmica molecular passou a se destacar, tornando possivel a investigacao das flutuações e tendências dos movimentos locais e globais de macromoléculas biológicas (KARPLUS, 2003). Assim, essa técnica permite o estudo dos fenômenos biológicos onde a previsão do comportamento é foco no estudo de especificidade de ligantes, mecanismos de ativação, regulação de moléculas, entre outros.

2.7 Uso da bioinformática estrutural no estudo das SPs

A primeira SP de inseto cristalizada foi uma quimotripsina de *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) que foi purificada diretamente de extratos do inseto. A determinação dessa estrutura indicou que a quimotripsina dessa espécie de formiga, e outras SPs de insetos em geral, por inferência, apresentam a mesma estrutura

terciária básica (BOTOS et al., 2000). Porém, apesar de muito semelhantes quanto à estrutura, as SPs de insetos apresentam diferentes especificidades em relação ao substrato, decorrentes de diferenças topológicas e eletrostáticas na região do sítio ativo.

A clivagem específica pelas quimotripsinas, tripsinas e outras SPs também dependem do volume, tamanho, polaridade, carga e hidrofobicidade de regiões específicas da superfície da molécula onde o substrato será ligado (PERONA; CRAIK 1995; BARTLETT, 2002). Portanto, dentro de um mesmo grupo de SPs também ocorre diferenças de especificidade.

Ribeiro et al. (2010) mostram que além das regiões catalítica e de ligação, os aminoácidos que formam a interface de contato com inibidores/substratos também podem interferir na especificidade da SPs. Os autores afirmam que a especificidade pode ser considerada diretamente proporcional às limitações estruturais impostas pelo tamanho do espaço de encaixe e pelas características físicas e químicas desse espaço, mas observam também que diversos aminoácidos que formam a interface de contato são essenciais para determinar, por exemplo, se uma enzima age como uma tripsina ou uma quimotripsina. Foram testadas *in silico* 70 SPs diferentes complexadas a três inibidores, demonstrando a enorme capacidade de geração de dados de novas ferramentas de bioinformática estrutural para o estudo da relação estrutura/função de proteínas.

Como já discutido, diversas espécies de insetos herbívoros expressam enzimas insensíveis a ação de IPs de plantas. Recentemente um estudo elucidou o mecanismo que diferenciava duas quimotripsinas que eram fortemente inibidas por um IP de batata tipo I, mas que apresentavam diferentes comportamentos com o IP de *Nicotiana alata*, uma delas era resistente e a outra suscetível a inibição. Verificouse que quatro aminoácidos localizados no loop 35 (LANF) (posições 34, 35, 35a e 35b) da quimotripsina suscetível quando substituídos pelos aminoácidos VIDL, presentes na quimotripsina resistente, também passou a apresentar resistência ao inibidor testado. Utilizando modelagem e dinâmica molecular, foi possível diferenciar os papéis de cada aminoácido do loop 35 dessas enzimas (DUNSE et al., 2010b).

Determinar quais e onde estão as diferenças nas estruturas das quimotripsinas de insetos herbívoros pode ajudar a elucidar os mecanismos de especificidade e eficiência catalítica desse importante grupo de enzimas digestivas e possibilitar novas estratégias para controle de pragas.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é caracterizar as diferenças químicas e físicas de nove diferentes quimotripsinas presentes no trato digestivo de lagartas da espécie *S. frugiperda*, relacionando-as com o grau de sensibilidade há oito diferentes IPs do tipo Bowman-Birk e ainda demonstrar que a eficácia de inibição está relacionada também ao nível de expressão dessas enzimas quando na presença de IPs de soja em sua dieta. Complementando a análise, mais oito enzimas do grupo das tripsinas foram estudas quanto ao seu nível de expressão nessas lagartas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção do cultivar de algodão para alimentação das lagartas

Para a construção de uma biblioteca de cDNA, foi utilizado RNA de *S. frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas dieta natural de folhas de algodão.

Três cultivares de algodão, Acala-90, Delta Pine e Delta OPAL (cerca de 40 plantas de cada cultivar) foram plantados em vasos de 10 L em substrato PlantMax ou terra recolhida dos campos do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Fez-se uma avaliação empírica do tempo para germinação, velocidade de crescimento, vigor e ainda crescimento das lagartas alimentadas com cada um dos cultivares. A partir desses testes foi selecionada, para dar andamento ao experimento, a cultivar Acala-90. Todas as sementes foram cedidas pelo Prof. Dr. Ederaldo José Chiavegato (Laboratório de Sementes do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP).

3.2 Criação das lagartas de S. frugiperda em dieta natural de algodão

As lagartas de *S. frugiperda* foram cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia ESALQ/USP.

As lagartas foram mantidas em bandejas próprias para criação de insetos e com dieta natural de folhas de algodão fresco, cultivar Acala-90. As folhas eram trocadas diariamente e deixadas em solução de hipoclorito 0,1% por 30 minutos e posteriormente lavadas em água corrente. A umidade era mantida com papel filtro 1,5 cm² umidecidos com água e também trocados diariamente. Após chegarem as 6° ínstar, as lagartas eram então sacrificadas para a extração dos seus intestinos.

3.3 Extração e purificação parcial dos IPs de soja

Os IP foram extraídos a partir de sementes de soja, variedade Cometa, por homogeneização de 100g de grãos triturados em 1000 mL 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).

3.4 Criação das lagartas de S. frugiperda em dieta artificial

Para a determinação de expressão das quimotripsinas, foi utilizado RNA de lagartas de S. *frugiperda* criadas em dieta artificial com e sem a adição de IP de soja.

As lagartas de *S. frugiperda*, 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 a base de feijão, germe de trigo, levedura de cerveja e aditivos, conforme a tabela 1 (MIHSFELDT; PARRA,1999). Ao atingirem o último ínstar parte das lagartas foi transferida para dieta artificial contendo IP de soja na concentração de 5% (p/v).

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

Tabela 1 - Composição da dieta artificial para criação das larvas de *S. frugiperda* (MIHSFELDT; PARRA,1999)

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

3.5 Extração de RNA total

Foram utilizados 15 intestinos de *S. frugiperda* no 6º ínstar por reação. Foi utilizado para extração de RNA o produto comercial TRIZOL (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante.

Cada extração rendeu cerca de 5 a 8µg/µl de RNA total e foram conservadas a -80°C. A integridade da molécula foi conferida através de gel de agarose desnaturante (figura 3).



Figura 3 -Gel desnaturante de RNA. Extração de RNA manteve a integridade da molécula mostrada em gel desnaturante

3.6 Isolamento do mRNA

Uma amostra de RNA total extraída de intestinos de *S. frugiperda* que se alimentaram de dieta natural de folhas de algodão do momento da eclosão dos ovos até o 6º ínstar de desenvolvimento foi utilizada para o isolamento de mRNA com o kit *PolyATract mRNA Isolation System III* (Promega).

Foi adicionada água à amostra de RNA total para completar 500µl e então incubada por 10 minutos a uma temperatura de 65°C. Após esse período o iniciador oligo (dT) biotinilado foi adicionado para então, após 10 minnutos à temperatura ambiente, ligar as esferas magnéticas. Utilizando-se uma estante magnética, as esferas (ligadas ao mRNA através da cauda oligoT biotinilada) foram lavadas sucessivamente com tampão apropriado. O mRNA é então liberado pela lavagem das esferas com água deionizada livre de RNase.

O mRNA foi então precipitado com a adição de glicogênio, etanol 100% e acetato de sódio 3M por 16 horas em uma temperatura de -20°C.

3.7 Biblioteca de cDNA de S. frugiperda

O kit utilizado para a construção da biblioteca de cDNA foi o *CloneMiner cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen). Esse kit foi elaborado para permitir a construção de bibliotecas de cDNA de alta qualidade sem o uso de enzimas de restrição, utilizando-se da tecnologia Gateway. Resumidamente, o processo se dá pela conversão do mRNA em uma dupla-fita de cDNA contendo sequências *att*B (adaptadores) em cada extremidade. A recombinação sítio específica ocorre pela clonagem direta do cDNA flanqueado pelos adaptadores *att*B ao vetor que contém o sítio *att*P sem o uso de digestão ou ligação.

3.7.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Após o isolamento do mRNA, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA. O iniciador utilizado nessa reação foi o *Biotin-att*B2 *oligo dT* (30pmol/µl) que permite a incorporação do adaptador *att*B a porção 3' da sequência. Juntamente com dNTPs (10mM), a reação foi incubada a 65°C por 5 minutos em seguida a 45°C por 2

minutos. Após esse período uma mistura contendo um tampão da reação e DTT (0,1 M) foi adiconada e mais 2 minutos de incubação a 45°C foi realizada. A enzimas *SuperScript II RT* (200 U/µI) foi adicionada com posterior incubação de 60 minutos a 45°C.

3.7.2 Síntese da segunda fita de cDNA

A reação para a síntese da segunda fita de cDNA foi feita a no gelo. Ao tubo foi adicionado um tampão de reação apropriado, dNTPs (10mM), *E. coli* DNA ligase (10U/ μ I), *E. coli* DNA Polimerase I (10 U/ μ I), *E. coli* RNase H (2 U/ μ I) e água para completar 151 μ I de volume final. Essa reação foi incubada a 16°C por 2 horas para, em seguida a T4 DNA polimerase (5 U/ μ I) ser adicionada. Após 5 minutos a 16°C, 10 μ I de EDTA 0,5M (pH 8,0) foram adicionados para parar a reação.

A amostra passou por uma purificação com fenol:clorofórmio (1:1) e em seguida precipitada com etanol 100%, acetato de amônia 7,5M e glicogênio (20µg/µl).

3.7.3 Ligação do adaptador attB1 na porção 5' do cDNA dupla-fita

Após a precipitação, o cDNA dupla-fita foi ligado ao adaptador *att*B1. Foram adicionados tampão de reação apropriado, adaptador *att*B1 (1µg/µl), DTT (0,1M) e T4 DNA ligase (1U/µl). A reação foi incubada por 16 horas a 16°C para então a ligase ser inativada em incubação de 10 minutos a 70°C.

3.7.4 Fracionamento do cDNA

Através de uma coluna Sephacryl S-500 HR o cDNA foi separado por tamanho para prevenir que fragmentos pequenos (<500pb) contaminassem a biblioteca. Dessa forma, as moléculas maiores passam pela coluna, pois são rapidamente eluídas enquanto que, as menores ficam retidas na resina e são eluídas mais lentamente.

Foram coletadas 20 frações (cada uma representada por uma gota de aproximadamente 35 µl) através da lavagem da coluna com tampão TEN (Tris-HCl 10mM pH7,5, EDTA 0,1mM e NaCl 25mM).

Após uma análise em placa de agarose 1% com bormeto de etídeo, frações apropriadas foram escolhidas para continuar a construção da biblioteca. Essas frações foram reunidas e precipitadas com etanol 100%, acetato de amônia 7,5M e glicogênio.

3.7.5 Recombinação

A recombinação entre os adaptadores que flanqueiam o cDNA e o vetor pDONR222 foi realizada adicionando-se em um tubo o cDNA (100ng para cada uma das bibliotecas), o vetor pDNR222 (250ng/µl), um tampão de reação apropriado, TE para completar 7µl e por último 3µl da enzima BP clonase. Essa reação foi incubada a 25°C por 16 horas. Após esse período foram adicionados 2µl de Proteinase K (2 µg/µl) para inativar a enzima BP clonase com incubação de 15 minutos a 37°C e 10 minutos a 75°C. A reação foi novamente precipitada como nas etapas anteriores.

3.7.6 Transformação de bactérias eletrocompetentes

A cepa de bactéria utilizada foi a ElectroMAX DH10B. O cDNA foi dividido em 6 tubos com 1,5 μ l cada, portanto 6 transformações foram realizadas. Para isso utilizaram-se cuvetas de 0,1 cm e o eletroporador *BioRad Gene Pulser II* com voltagem em 2,0kV, resistência 200 Ω e 25 μ F de capacitância.

Parte da biblioteca formada foi estocada em alíquotas em uma mistura de meio S.O.C. (60%) e glicerol (40%) e parte plaqueada (LB Agar com 50µg/ml de kanamicina) em 3 diluições diferentes (10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) para posterior titulação comparando-se com um controle positivo da transformação feito com vetor PUC 19 (LB Agar com 100 µg/ml de ampicilina).

A titulação de cada placa foi calculada pela equação:

cfu/ml = colônias por placa x fator de diluição

volume plaqueado (ml)

O resultado foi utilizado para calcular o número total de unidades formadoras de colônias: Total cfu = título (cfu/ml) x volume total da biblioteca de cDNA (ml).

Para análise dos tamanhos dos inserto foram feitas minipreps e 18 amostras foram submetidas a restrição pela enzima *Bsr*G I (Invitrogen).

3.8 Sequenciamento dos clones

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular- UFSCar em seqüenciador MegaBACE.

3.9 Análise estrutural

Os 1152 clones sequenciados resultantes da biblioteca de *S. frugiperda* foram comparados com as sequências presentes nos bancos de dados através das ferramentas *BLASTn* e *tBLASTx* para identificar as tripsinas e quimotripsinas. Os clones com maior similaridade a sequências dessas enzimas foram agrupados e os arquivos contendo seus cromatogramas de sequenciamento foram analisados pelo programa *Phred/Phrap/Consed* para montagem dos contigs (sequências completas) e seleção das sequências de alta qualidade. Estes foram traduzidos para a sequência primária de aminoácidos, respeitando-se os quadros de leitura, para serem utilizadas na modelagem estrutural dessas moléculas.

3.9.1 Modelagem estrutural

A modelagem estrutural das proteínas e a otimização destes modelos foram realizadas utilizando-se modelagem molecular comparativa pelo programa Modeller v.9.06 (MARTI-RENOM et al., 2000). Duas SPs de inseto foram utilizadas como moldes para a determinação tridimensional das quimotripsinas: uma colagenase de Hypoderma lineatum (larva endoparasita de gado) (PDB: 2hlc) e uma quimotripsina de Solenopsis invicta (formiga americana grande causadora de danos à agricultura) (PDB: 1eq9). Uma terceira quimotripsina foi utilizada para refinar as regiões de loop das estruturas (quimotripsina humana – PDB: 1elv). A seleção dos moldes foi feita a partir dos resultados apresentados pelo programa PSI-BLAST (ALTSCHUL et al. 1997) onde as quimotripsinas estudadas foram comparadas ao banco de dados de proteínas do Modeller (banco de dados com as sequências de todas as estruturas do PDB e sem as sequências redundantes – com identidade maior que 95%). Os moldes foram escolhidos quando apresentaram *e-value* igual a 0 e identidade de sequências maior que 40% (obedecendo o consenso que proteínas que apresentam esse nível de identidade possuem similaridade na estrutura como um todo). Além da identidade, a resolução dos cristais (1.7 Å para as três estruturas) também foi considerada.

Os três moldes utilizados apresentavam estrutura resolvida já complexada a inibidores do tipo Bowman-Birk para facilitar outras etapas das análises e para melhor compreensão do funcionamento da enzima. A qualidade dos modelos gerados pelo

programa *Modeller* foi submetida a uma avaliação de estrutura através da esterioquímica geral e individual dos modelos. Para tanto o programa WHAT_CHECK (HOOFT *et al.* 1996) e a ferramenta PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) (utilizada através do programa PDBsum) foram utilizados.

3.9.2 Hard-docking

Para investigar a dinâmica das proteínas estudadas e suas interações com outras moléculas (no caso os IPs) foi utilizada a técnica de *docking* de proteínas. Foram usados sete modelos de IPs de plantas diferentes e um IP controle (tabela 2) para a realização da docagem de proteínas com cada modelo de quimotripsina proposto. O método de *hard-docking* foi realizado utilizando-se o programa *Swiss-Model* (BORDOLI *et al.*, 2009). Nesse programa (disponível gratuitamente na rede) um arquivo .*pdb* de uma SP complexada a um inibidor serve como um molde para a quimotripsina de interesse. As duas SPs são alinhadas estruturalmente e as posições tridimensionais dos dois, ligante e receptor da proteína alvo, agora, irão coincidir com as coordenadas do sistema molde. Dessa forma, um arquivo é gerado com a SP de interesse complexada ao inibidor do arquivo .*pdb*.

Arquivos PDB	IP
1D6R	Glycine max (soja)
1G9I	sintético
1TAB	<i>Vigna angularis</i> (feijão)
2CMY	Veronica hederifolia
2ILN	Medicago scutellata
2G81	Vigna unguiculata (feijão)
2QN5	Arroz (O <i>ryza sativa</i>)
2UUY	hipicephalus appendiculatus (carrapato - IP controle)

Tabela 2 - IPs de plantas utilizados para a geração de modelos dos complexos SP-IP

3.9.3 Dinâmica molecular

Para realizar dinâmica molecular dos modelos complexados aos inibidores, o programa GROMACS foi usado (Van der Spoel et al. 2005). A dinâmica molecular é a

técnica teórica mais eficiente de simulação de movimentos das proteínas. Ela está baseada na teoria básica de mecânica clássica que rege os movimentos dos átomos e suas interações. Os átomos se movimentam de acordo com seus potenciais de interação, chocando-se uns contra os outros em um sistema fluido, similar ao que acontece na realidade.

Para que a aproximação com a realidade seja ainda maior, foi necessário a solvatação das proteínas, ou seja, que moléculas de água e íons fossem adicionadas ao sistema para que condições fisiológicas fossem reproduzidas. Ao redor da proteína foi construída uma "caixa" ajustada a sua forma para ser possível inserir esses elementos. O potencial eletrostático dos modelos também foi calculado.

Após esses ajustes foi possível realizar a minimização de energia dos complexos, sendo que neste trabalho o método *Steepest Descent* foi o utilizado. Todos esses cálculos foram executados simultaneamente pelo GROMACS mantendo a temperatura e pressão do sistema.

3.9.4 Docagem automática

O docking automático foi realizado utilizando-se o programa AutoDock (MORRIS et al. 1998). Com esse programa é possível predizer como moléculas pequenas, tais como substratos, inibidores ou candidatos à novas drogas, se ligam a um receptor com estrutura 3D conhecida. Através de uma simulação de ligação das moléculas (técnica *Monte Carlo simulated annealing*), é realizada a exploração do espaço conformacional e uma rápida avaliação energética usando grades baseadas no potencial de afinidade molecular (figura 4). É possível assim estabelecer o mínimo global na interação entre o substrato (ou inibidor) e a proteína alvo mantendo a demanda computacional em um nível razoável. A combinação de uma avaliação energética robusta e a exploração de grande espectro de conformações faz do AutoDock uma poderosa ferramenta para abordar problemas como a ligação entre substratos flexíveis e modelos fixos de proteínas.

Os arquivos gerados pelo *hard-docking* e aprimorados pela dinâmica molecular foram utilizados como entradas para o AutoDock. Utilizando-se os parâmetros propostos no tutorial do software, foi realizada uma análise da interação proteína/inibidor dos modelos propostos, gerando-se 250 possíveis conformações para cada complexo. Foram feitos 250.000 cálculos de energia para cada conformação de complexo e, a partir disso, obteve-se a estimativa de energia livre do sistema.



Figura 4 - Modelo de grade proposto pelo AutoDock. Uma grade com espaçamento constante é construída para calcular a afinidade de cada átomo da molécula com um átomo sonda que é colocado em um ponto da grade. Assim obtém-se a afinidade de toda a grade para cada tipo de átomo do substrato (geralmente o carbono, o oxigênio, o nitrogênio e o hidrogênio) (modificado de AutoDock 2.4 User Guide)

3.9.5 Cálculo da Área Acessível ao Solvente (ASA)

Com o intuito de identificar os resíduos formadores de interface (IFR) e as áreas acessíveis ao solvente para cada complexo gerado de SPs - IPs, foi usado o programa *SurfV* (SRIDHARAN et al., 1992). Este valor é calculado usando-se uma esfera *probe* de 1.4 Å (raio de Van der Waals da molécula de água) que percorre a superfície molecular da molécula. *Scripts* locais em *perl*, que fazem parte do conjunto que integra e gera o banco de dados STING (NESHICH et al., 2003), executaram o SurfV de duas maneiras distintas: na primeira, chamada " *in isolation*" (em

isolamento, ACCi), na qual cada cadeia de um dado complexo é separada e considerada como uma molécula isolada, e sua ASA calculada separadamente. A área calculada da maneira "*in isolation*" consiste em toda a superfície da cadeia (ACCi), incluindo sua área de interface. A segunda maneira, chamada "*in complex*" (em complexo, ACCc) é o cálculo da ASA de uma dada cadeia quando esta é parte de um complexo. O cálculo é feito sem considerar a região da interface que está entre as cadeias, fornecendo a informação sobre a área da superfície livre de uma molécula (Figura 5). A área ocupada por resíduos na região da interface (área IFR) é dada como a diferença da área *ACCi* pela *ACCc*.



Figura 5 - Representação esquemática da área acessível ao solvente calculada. Cálculo de ASA nas duas distintas maneiras citadas: isolada (ACCi) e em complexo (ACCc). A área cinza claro representada a área perdida quando a molécula está ligada a outra

3.10 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando-se o aparelho *StepOne Real Time PCR system* da *Applied Biosystems*. Cada reação foi composta de 12,5µL da mistura Maxima® SYBRGreen/ROX qPCR (Fermentas), 7,9µL de água milli-Q, 0,3µL de cada iniciador (10uM) (Tabela 3) e 4µL do cDNA diluído. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicatas. O gene de referência utilizado foi o que codifica a proteína ribosomal S30. O seguinte ciclo foi usado: 50°C por 2minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60 – 62,5°C - dependendo da temperatura de anelamento do iniciador - por 30. A extensão foi feita adicionando-se 1°C da temperatura de anelamento até 95°C. A aquisição da fluorescência e curva de desnaturação foram idênticas para todos os iniciadores.

A especificidade dos iniciadores, bem como os parâmetros temperatura de anelamento, diluição dos cDNAs e eficiências de amplificação dos iniciadores dos genes de quimotripsinas SfChy2, SfChy3, SfChy4, SfChy5, de tripsinas SfTry3, SfTry4 e SfTry5 e do gene de referência 30S foram obtidos de Brioschi (2007), porém foram confirmados com novas curvas de eficiência e de dissociação (curva de *Melting*). Os demais genes tiveram os seus iniciadores desenhados no programa *Oligo Perfect*[™] *Designer Invitrogen* e tiveram sua especificidade, diluição de cDNA e eficiência calculados pelo programa REST-384 (PFAFFL, 2001) através da curva de eficiência e a curva de dissociação (curva de *Melting*).

Tabela 3 - Pares de iniciadores utilizados nas análises de PCR em tempo real. Iniciadores para os genes de quimotripsinas (SfChy), tripsinas (SfTry) e gene de referência (S30) de S. *frugiperda*.

GENES	INICIAI	DORES (5' – 3')
SfChy2	TCATCTCTCACAAACCGCATC	AACAGSGCTAATGCGGAGGA
SfChy3	AAGCTGGAACCCCAGTAACA	TTTTCGTTGAGCTGGCTACC
SfChy4	TGCTCCAGCTCAGCTCGGTC	CGTCATTTCGGACTAGACTTGGAG
SfChy5	TTACCGCTAACCGTGTGCTT	CGATGACATCTGACAAGGCG
SfChy7	TTCCTGAGCCACGTTAGCTT	CAAGACAGGCTCGTTGTTGA
SfChy9	GGATCTCAGCTCGGAGAAAA	GCAAGAGGACCACCAGAGTC
SfChy11	CGAAATCCGTAAAGCTGAGG	CAAGGAACCACCACACACAC
SfChy12	GCCAGCTCAACGAAAACTTC	AGGTGACACCGATCAAGAGG
SfChy13	CAGTGGCAACTCTCTCACCA	GTAAGTGATGGGCACGACCT
SfTry1	CAAAGAAACCCGTGGCTAAA	GCGTTGATGGAGATCTTGGT
SfTry2	AAAACTGGCCTGACATCACC	CGACACCAACGATGACATTC
SfTry3	ACGTCCATTGACAAGTTCCC	AGCTTGGGTCGTAGAAGACG
SfTry4	AACTTATGGCGGCTAGCGTA	AAGGGACCTCCAAAGTCACC
SfTry6	GCACTCTGCTTCTGCCTTCT	GTGGGTGCGCCATAGTAAGT
SfTry7	ACAACCTTGCCCTCATCAAC	CGAACTCGGTAGCCTCAAAG
SfTry8	ACAACCTTGCCCTCATCAAC	GAGAAGTCCGACTGGAGCAC
S30	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT

4 RESULTADOS

4.1 Análise da biblioteca de cDNA de S. frugiperda

Obteve-se cerca de 170 ng/µl de mRNA a partir de 345 µg de RNA total. A construção da biblioteca iniciou-se com 1,6 µg de mRNA. A titulação da biblioteca que ficou dentro do esperado (6,5 x 10^6) e a sua qualidade também foi satisfatória com tamanho médio dos insertos superior a 1000 pb (figura 6).



Figura 6 - Géis para análise da biblioteca de cDNA. (A) Gel com mRNA utilizado na construção da biblioteca de S. frugiperda e RNA total de intestino de S. frugiperda. (B) Análise de restrição para determinar a qualidade da biblioteca (tamanho médio dos insertos = 1140 pb)

Entre os 1152 clones sequenciados foram encontrados 37 sequências de SPs diferentes. No total, foi possível obter sete tripsinas e nove quimotripsinas com sequências completas.

Os contigs montados e utilizados no presente trabalho foram os genes de quimotripsinas SfChy2, SfChy3, SfChy4, SfChy5, SfChy7, SfChy9, SfChy11, SfChy12 e SfChy13. Da família tripsina foram usadas as sequências SfTry1, SfTry2, SfTry3, SfTry4, SfTry6, SfTry7 e SfTry8.

4.2 Modelagem estrutural das quimotripsinas

Com as sequências completas foi possível modelar as estruturas tridimensionais das quimotripsinas através da homologia com outras moléculas da mesma família e que já estavam depositadas no banco de dados PDB. Para isso, foi utilizado o programa *Modeller v.9.*06. que permite que sequências desejadas sejam modeladas por comparação e refinadas para se obter o máximo de fidelidade estrutural (figura 7).

As quimotripsinas modeladas foram SfChy2, SfChy3, SfChy4, SfChy7, SfChy9 (BRIOSCHI et. al 2007), SfChy5, SfChy11, SfChy12, SfChy13 (sequências completas da biblioteca de *S. frugiperda* em dieta natural de folhas de algodão).



Figura 7 - Alinhamento das nove quimotripsinas modeladas. É possível observar as variações nas estruturas das alças externas das moléculas

4.3 Qualidade dos modelos

Para verificar a qualidade dos modelos construídos foi utilizado o programa WHATCHECK, que fornece informações sobre a formação de regiões hidrofóbicas, acessibilidade de resíduos e átomos às moléculas de água, distâncias atômicas, entre outras, e a ferramenta PROCHECK (PDBsum), que avalia comprimentos de ligação, planaridade dos anéis de cadeias laterais e sua conformação, ângulos torcionais da cadeia principal e de cadeias laterais, gráficos Ramachandran, entre outros cálculos. Os resultados de qualidade dos modelos podem ser visualizados através do gráfico de Ramachandran (figura 8) e de predição de estrutura secundária (figura 9) fornecidos pelo PROCHECK.



Figura 8 - Gráficos Ramachandran dos modelos construídos. As regiões em vermelho são energeticamente mais favoráveis e modelos com cerca de 90% de aminoácidos (pontos pretos) presentes nessas regiões são considerados de boa qualidade. Os dados da análise Ramachandran estão nos Anexos. Fonte: http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/

O gráfico de Ramachadran define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfávoraveis, orientando a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas. Os modelos devem possuir cerca de 90% de seus aminoácidos nas regiões energeticamente favoráveis para serem considerados de boa qualidade. Os modelos construídos apresentaram uma variação de 88,8% a 91,5% dos aminoácidos nessas regiões (dados apresentados nos Anexos). A quimotripsina SfChy13 apresentou 85,6% e por isso não foi considerada nas análises a seguir.

A predição de estrutura secundária é uma ferramenta que permite a comparação visual dos modelos e a verificação da conservação de proteínas da mesma família. Como observado na figura 9, as estruturas secundárias das quimotripsinas seguem o mesmo padrão demonstrando a conservação estrutural entre essas enzimas.



Figura 9 - Estrutura secundária dos modelos de quimotripsinas. A análise das estruturas secundárias dos modelos construídos mostra a conservação estrutural das enzimas, confirmando a qualidade da modelagem. As setas representam folhas-beta, as espirais representam as alfa-hélices, as linhas amarelas representam pontes dissulfeto e as linhas vermelhas representam hairpins

58

(continua)



Figura 9 - Estrutura secundária dos modelos de quimotripsinas. A análise das estruturas secundárias dos modelos construídos mostra a conservação estrutural das enzimas, confirmando a qualidade da modelagem. As setas representam folhas-beta, as espirais representam as alfa-hélices, as linhas amarelas representam pontes dissulfeto e as linhas vermelhas representam hairpin

(continuação)



Figura 9 - Estrutura secundária dos modelos de quimotripsinas. A análise das estruturas secundárias dos modelos construídos mostra a conservação estrutural das enzimas, confirmando a qualidade da modelagem. As setas representam folhas-beta, as espirais representam as alfa-hélices, as linhas amarelas representam pontes dissulfeto e as linhas vermelhas representam hairpins

60

(continuação)





Figura 9 - Estrutura secundária dos modelos de quimotripsinas. A análise das estruturas secundárias dos modelos construídos mostra a conservação estrutural das enzimas, confirmando a qualidade da modelagem. As setas representam folhas-beta, as espirais representam as alfa-hélices, as linhas amarelas representam pontes dissulfeto e as linhas vermelhas representam hairpins

(conclusão)

4.4 Análises das estruturas moleculares

4.4.1 Docagem

A técnica de hard-docking posicionou os ligantes (IPs) nas enzimas e a partir do arquivo gerado com esses complexos a docagem automática foi realizada (figura 10).



(B)

Figura 10 - Complexo SfChy5 e IP controle. (A) Em azul, a quimotripsina está ligada ao IP controle (em verde) mostrando a posição de encaixe proteína-ligante. (B) A tríade catalítica da quimotripsina é mostrada no mesmo complexo

4.4.2 Conservação das estruturas

No alinhamento das estruturas das quimotripsinas foi possível observar que, apesar da alta conservação da maior parte das estruturas, existem diferenças na conformação de alças (*loops*) (figura 7). A região do sítio catalítico por sua vez permanece altamente conservada como era esperado, podendo ser também

observada no alinhamento das sequências primárias de aminoácidos (figura 11) e no alinhamento das estruturas (figura 12).

		10	20	30	40	50	60	70	80
SFCHY2	IVGGSVTD.	ISNVPYQ	AGLVIQVL-	-VIFQSVCG	GSIISHNRIV	TAAHCN	WDGSITANSF	TVVLGSNFLFS	GNRITTR
SFCHY3	IVGGQASSI	LGQFPYQI	AGLLADFS	LGQGVCG	GSLVRANRVI	TAAHCW	-FDGQNQAWRF	TVVLGSIRLFT(GTRVQTT
SFCHY4	IVGGAPAQ	L <mark>GQFPYQ</mark>	AGLIIILP-	FWSSACG	GSLLNTRKVI	TAAHCW	FDGQSQAISF	TVVLGSINLYS	GTRVSSS
SFCHY5	IVGGVPAG	Q <mark>G</mark> QYPYQ <mark>A</mark>	AGLLISII	GFDGSGVCG	GSLISAARVV	/T <mark>AAHC</mark> W	FDGMHQAWRV	TVVLGSTTLFT(GTRIETS
SFCHY7	IVGGSPSS	AGQFPYQ	AGLLASYA	JISGTGVCG	GSLISANRVV	/TAAHCW	FDGINQAWLF	NVVLGSTTLFS	GTRIQTS
SFCHY9	IVGGSLAS	L <mark>GQFPYQ</mark>	GLLLNYP	TRTGYAS	ASLIS <mark>HNR</mark> II	TAAHNI	NDGFSNVPTV	TVVLGTTTIMT	GVRQTTG
SFCHY11	IVGGOASS	LGOFPYO	AGLLADFS		GSLVRANRVI	TAAHCW	FDGONOAWRF	TVVLGSIRLFS	GTRVOTS
SECHY12	TVGGOASSI	GOFPYO	GTTADES	AGOGVCG	SLVRANRVI	TAAHCW	FDGONOAWRF	TVVLGSTRLFS	GTRVOTS
SECHY13	TVGGTOAA	TGSHPHM	ALSSCVI.	VRSELCG	SLTTORTVI	TAAHCTAA	FSGNSLTSSL	RATVGTNRWNS	GTSYTLS
5101115	1.001.0			101100	o de la granta		10011011001		0101110
		90	100	110	120	130	140	150	160
		• • • • • •							
SFCHY2	DVVMHPNW	TPTTAANI	DIAVLRISS	S-VTFTNVI	QPIALPSGNE	LNNDFVNWN	AIASGYGLTA	DGANIGTTQI	RVSSVVLP
SFCHY3	NVVMHGSW:	TPNLIRNI	DVAVIKLS	SNVALSDTI	AVIALPSGSÇ	LNENFAGE	AVASGFGRTV	DGAGITVNQI	LS <mark>HVTLP</mark>
SFCHY4	NVVMHPNW	TPSLVRN	VAMITLP	NAVSTSNNL	SPIALPSGNE	LNNNFAGF	GTASGFGYTR	DGGSVSP1	LNHVD LP
SFCHY5	VMAMHPDW	SPALIRNI	DVGVLYL PQ	QAVQLSANI	QPIAIATG	SSDFVGVS	SAIASGYGLTS	SEGSISANQV	/LS <mark>HVR</mark> LN
SFCHY7	AVMVHPNW	VPVLVRNI	OVAVIYLP:	TPVPFSDTI	KPIALPSGDQ	LNNDFVGA	AIASGFGLTN	DGGSISTNQ	LSHVSLN
SFCHY9	NYVIHENYI	DISIVRS	DIAIINLPS	SSVQFSNIL	APIALPSGS	LGENFVGQV	AIASGYGFNP	GIGGMLANQI	FSFVDLP
SFCHY11	NVVMHGSWI	NPSNIRNI	VAMIRLNS	SNVGLSNTI	ALIALPSGS	LNENFAGEN	AVASGEGRTS	DGAGGAITTNO	LSHVTLP
SFCHY12	NVVMHGSWI	NPSNTRN	VAMTRINS	SNVGLSNTT	ATTATPSGS	- DINENFAGEN	AVASGEGRTS	DGAGGGTTTNO	TISHVTTP
SECHY13	RNVTHPNY	VAATTKN	TGVLTTS	SNVAT.NNT.V	OVVPTTYN		SRVAGWGRTR	SGGST.SAT	T.T.ET.TT.N
5101115					2	1102011		2000 2011	
		170	180	190	200	210	220	230	240
SFCHY2	VISNAQCA	TAFGBMAR	INSNICTS	JAGGKGTCS	GDSGGPLAVI	SNNRRVLI	WTSYGAAAGC	QIGLPAAFAR'I''	LSIVSWLÖ
SFCHY3	VITNIACR	ASFPLIV	2DSNICTS	GAGGRSTCQ	GDSGGPLVV	RNNSPLLIC	VTSFGSARGC	QVGSPAAFARV	CSFISWIN
SFCHY4	VITNAVCSI	NSLFWYV(2DSNVCTS	GAGGRSVCH	GDSGGPLVVI	SNNRRILIC	VTSFGHWDGC	QSGNPAAFARVI	CSFISWIN
SFCHY5	VIANSACS	YAFPLVV	2PSN-LTS	GIGGVGTCS	GDSGGPLVAS	SQN <mark>GQDVLI</mark>	CISSFGSAFGC	QITCHQSSP-C	SLVVLSQ
SFCHY7	VISNSVCS	YAFPLIL	HSTNVCTS	JLGGSSTCN	GDSGGPLAVI	TINNEPVLI	VTSFGSALGC	EASLPAAFARV	CSYVDFFN
SFCHY9	IITNNQCA	GTYGSFI	NGIICTG	SVPGKNICS	GDSGGPLAIN	RNGNYILIC	VVSFGRG-GC	EGNSPSGYARV	THYINWIN
SFCHY11	VITNAVCR	SSFPLII	DSNICTS	GAGGRSTCQ	GDSGGPLVV1	RSGRPLLI	ITSFGSARGC	QVGSPAAFARVI	SFMSWIN
SFCHY12	VITNAVCR	SSFPLIV	DSNICTS	GAGGRSTCO	GDSGGPLVV	RSGRPLLIC	VTSFGSARGC	OVGSPAAFARV	SFMSWIN
SECHY13	TTDR								
		250							
OFCHYO		· .							
SFCH12	sQ	 -							
SFCHY3	SQ1	ц- -							
SFCHY4	QNI	ц-							
SFCHY5	PIFSVLQQ	LP							
SFCHY7	Q <mark>H</mark>]	L-							
SFCHY9	OR	T							

SFCHY7 -----QHL-SFCHY9 -----QRL-SFCHY11 -----GQL-SFCHY12 -----GQL-SFCHY13 ------

Figura 11 - Alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das quimotripsinas. As sequências apresentam alta conservação estando os aminoácidos que formam a tríade catalítica marcados com seta vermelha



Figura 12 - Conservação do sítio catalítico. Alinhamento estrutural das quimotripsinas mostrando a conservação da posição do sítio catalítico

Três quimotripsinas se destacaram por possuírem bem próximo ao sítio catalítico uma segunda serina (figura 13). Pelos cálculos de área, esse aminoácido parece também estar envolvido com a atividade catalítica dessas enzimas, pois além da proximidade com o sítio ativo, essa serina também perde grande parte de sua área quando essas enzimas estão em complexo com os IPs testados (exceto na SfChy9 – serina extra não está presente na IFR) (tabela 4).

					186					191		
SfChy2		THR		SER	GLY 1.96	ASP	SER	GLY	GLY	PR0 1 91	LEU	ALA
	SER	THR 1.81	CYS	GLN	GLY	ASP	SER 1.86	GLY	GLY	PRO	LEU	VAL 1.91
	SER	VAL 1.81	CYS	HIS	GLY	ASP	SER 186	GLY	GLY	PRO	LEU	VAL 191
SfChy5	GLY	THR	CYS 186	SER	GLY	ASP	SER	GLY 191	GLY	PRO	LEU	VÁL
	SER	THR	CYS	ASN	GLY 186	ASP	SER	GLY	GLY	PRO 191	LEU	ALA
SfChy9	ASN	ILE	CYS 1.86	SER	GLY	ASP	SER	GLY 1.91	GLY	PRO	LEU	ALA
	SER	THR	CYS	GLN	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO	LEU	VAL
	SER	THR	CYS	GLN	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO	LEU	VAL



Figura 13 - Presença de uma serina extra. (A) Sequência primária das quimotripsinas SfChy2, SfChy5 e SfChy9 apresentando uma segunda serina (em rosa). (B) Na modelagem estrutural dessa enzimas é possível observar que a serina extra está na região do sítio catalítico

		Sf	Chy2		SfChy5				
	Posição	Posição ACCi ACCc ACCc-ACCi		Posição	ACCi	ACCc	ACCc-ACCi		
	na cadeia				na cadeia				
His	45	74.174	10.345	63.829	46	75.662	9.665	65.997	
Asp	92	2.231	2.231	0.000	93	36.669	36.669	0.000	
Ser extra	185	81.436	7.415	74.021	183	72.846	35.742	37.104	
Ser	188	10.447	5.926	4.521	186	41.780	28.519	13.261	

Tabela 4 - Cálculos de ASA. Cálculos para os aminoacidos que compõem a tríade catalítica das quimotripsinas e para a serina extra presentes na IFR

4.4.3 Afinidade das quimotripsinas ao IPs testados

A afinidade de uma enzima por um substrato ou IP pode ser inferida através do cálculo de energia livre do sistema quando essas moléculas se encontram complexadas. Através da análise dos modelos propostos, o programa AutoDock gerou 250 posições diferentes para cada complexo e realizou 250.000 cálculos de energia para que então fosse possível selecionar a energia livre do sistema de cada complexo.

Considerando todos os IPs testados, as quimotripsinas SfChy4, SfChy5 e SfChy7 foram as enzimas que apresentaram maior afinidade (menor valor de energia livre) aos IPs (tabela 5).

	1D6R	1G9I	1TAB	2CMY	2G81	2ILN	2QN5	2UUY	Média
SfChy2	-6.76	-6.59	-3.33	-6.85	-7.36	-6.17	-5.82	-7.5	-6.12571
SfChy3	-6.81	-6.31	-6.55	-5.61	-6.15	-3.3	-1.1	-8.44	-5.11857
SfChy4	-6.38	-8.28	-7.52	-8.9	-6.09	-7.16	-4.5	-9.6	-6.97571
SfChy5	-7.5	-9.96	-8.1	-9.5	-6.84	-5.35	-6.33	-10.18	-7.65429
SfChy7	-9.56	-9.88	-10.23	-11	-8.21	-5.24	-6.04	-9.04	-8.59429
SfChy9	-6.36	-6.78	-4.24	-9.73	-	-4.62	-5.49	-8.9	-6.20333
SfChy11	-6.24	-8.64	-5.35	-	-3.77	-3.46	-3.46	-8.36	-5.15333
SfChy12	-8.96	-	-5.36	-7.66	-3.43	-4.43	-3.14	-7.6	-5.49667

Tabela 5 - Valores de energia livre da ligação dos complexos modelados

Em uma análise de formação de *clusters* é possível perceber que dois grupos são formados de acordo com a afinidade inferida pelos valores de energia livre (figura 14). As quimotripsinas SfChy4, SfChy5 e SfChy7 formam um cluster separado de todas as outras enzimas.



Figura 14 - Gráfico de afinidade das quimotripsinas a todos os IPs testados. Quanto mais próximo de 1, menor é a afinidade da enzima pelo inibidor

4.5 Expressão gênica

A determinação da expressão relativa dos genes de quimotripsinas e tripsinas foi realizada em PCR em tempo real. O RNA dos intestinos de lagartas de *S. frugiperda* no 6º ínstar foram utilizados para sintetizar cDNA em 24 e 48 horas após as mesmas teram se alimentado de dieta contendo IPs de soja e dieta sem IPs (grupo controle). O gene de referência utilizado nas análises foi o gene 30S (BRIOSCHI et al., 2007). Outros dois experimentos independentes foram realizados e apresentaram a mesma tendência de expressão relativa dos genes testados.

Todos os iniciadores testados resultaram em um produto específico, único e com o tamanho desejado, visualizado em gel de agarose 1%. Os produtos apresentaram sequência correta, verificada por sequenciamento e em todas as corridas foi realizada a curva de dissociação resultando sempre em temperaturas específicas.

4.5.1 Expressão gênica das quimotripsinas

Na comparação com o tempo 0 hora, a expressão relativa do gene SfChy2 mostrou aumento já em 24 horas de tratamento e manteve o mesmo nível em 48 horas de tratamento. Já os genes SfChy3 e SfChy4 não apresentaram diferenças na expressão relativa entre tratados e controles. O gene SfChy3 teve um pequeno aumento em 48 horas quando comparado a 24 horas (figura 15).

Todos os outros genes (SfChy5, SfChy7, SfChy9, SfChy11 e SfChy12) não apresentaram diferenças entre tratamento e controle em 24 horas porém em 48 horas o tratamento se distanciou do nível dos controles apresentando expressão relativa aumentada. O gene SfChy5 foi o gene que apresentou maior aumento da expressão relativa na presença de IP em 48horas (figura 15).


Figura 15 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas. Em 48 horas de tratamento, a expressão relativa da maioria dos genes de quimotripsinas testados apresentaram aumento quando comparados ao controle no mesmo tempo

4.5.2 Expressão gênica das tripsinas

Todos os genes (exceto SfTry2) praticamente não apresentaram diferenças na expressão realtiva entre tratamento e controle. O gene SfTry1, SfTry3 e SfTry6 praticamente não se alteraram ao longo do tempo ou tratamento. As demais apresentaram diferenças na expressão entre 24 horas e 48 horas porém não entre tratamento e controle. O único gene a presentar diferença entre tratamento e controle nos dois tempos avaliados foi o gene SfChy2 (figura 16).



Figura 16 - Expressão relativa dos genes de tripsinas. Com excessão de SfChy2, todos os genes de tripsinas testados não apresentaram diferenças entre a expressão realtiva no tratamento (com IP) e no controle (sem IP)

4.5.3 Proporções de expressão de quimotripsinas e tripsinas em 48 horas de tratamento com IPs de soja.

Considerando apenas as enzimas testadas nesse trabalho, foi construído um gráfico de proporção de expressão dessas duas famílias de SP em lagartas de *S. frugiperda* após 48 horas de tratamento com IPs de soja. O tempo 48 horas foi escolhido porque a maior parte os genes apresentam aumento da expressão relativa na presença de inibidores na dieta após esse tempo de tratamento. As quimotripsinas aparecem como responsáveis por 67,12% do total de enzimas digestivas enquanto as tripsinas contribuem com 32,88% (figura 17).



Figura 17 - Gráfico de proporções na participação das famílias de SP, tripsinas e quimotripsinas, no porcesso digestivo das lagartas de *S. frugiperda*. As quimotripsinas são responsáveis por maior parte do processo, porém com grande participação da tripsinas

Com o objetivo de elucidar a participação de cada gene individualmente, gráficos das quimotripsinas e das tripsinas foram construídos (figura 18).



Figura 18 - Gráfico de proporções de expressão dos genes individuais de tripsinas e quimotripsinas em 48 horas de tratamento das lagartas de *S. frugiperda* com IPs de soja. É possível identificar as quimotripsinas e trispnas que estão mais expressas em 48 horas de tratamento

Entre as quimotripsinas, os genes SfChy3, SfChy7, SfChy11 e SfChy12 são os que destacam por apresentarem maiores percentagens de RNA presentes nas amostras de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas por 48 horas com dieta artificial acrescida de IPs de soja.

Os genes de tripsinas mais transcritos em 48 horas de tratamento foram os genes SfTry2, Sftry7 e SfTry8.

Esse parâmetro é importante por dar dimensão a importância biológica que cada enzima apresenta no processo digestivo de *S. frugiperda*. Enzimas que apresentam grande aumento de expressão realtiva não necessariamente contribuem em grande escala para a digestão da lagarta.

5 DISCUSSÃO

5.1 SPs encontradas na biblioteca de cDNA construída

A biblioteca de cDNA construída a partir de intestinos de lagartas de S. *frugiperda* foi uma importante fonte de sequências de SPs.

Entre as sequências encontradas e montadas estão uma das sequências incompletas de Brioschi et. al (2007) que não está publicada em bancos de dados (Sfchy5), outras duas que representam novas sequências (SfChy11, SfChy13) e um precursor já conhecido de quimotripsina (*GenBank:*: AY251276) (SfChy12). As demais quimotripsinas estavam presentes no banco de dados SPODOBASE (NÈGRE et al., 2006) (SfChy2: *cluster* sf1f01502-5-1; SfChy3: *cluster* sf1f00778-3-1; SfChy4: *cluster* sf1f08658-3-1; SfChy7: *cluster* sf1f05003-3-1; SfChy9: *cluster* sf1f06951-3-1). Quatro sequências de tripsinas também estavam presentes nesse mesmo no bando de dados (SfTry1: *cluster* sf1f00035-3-1; SfTry2: *cluster* sf1f04035-3-1; SfTry3: *cluster* sf1f04740-5-1 e SfTry4: *cluster* sf1f02950-3-1) e mais três novas tripsinas foram encontradas (SfTry6, SfTry7 e SfTry8).

5.2 Modelos estruturais

Conhecer a estrutura tridimensional de proteínas é essencial para estudar as interações bioquímicas nas quais estas estão inseridas. Porém, os métodos experimentais para a determinação de estrutura (cristalografia de Raio-X e RMN) são bastante complexos além de terem alto custo, exigirem uma grande demanda de tempo e serem limitados no fornecimento de informações dos aspectos dinâmicos das moléculas (ZHOU; ROBINSON, 2010). Dessa forma, modelos *in silico* têm sido bastante utilizados.

Um dos métodos mais utilizados para se obter modelos tridimensionais de proteína sem recorrer aos métodos experimentais é a modelagem por comparação ou homologia. A modelagem comparativa é baseada no conceito de que a estrutura é mais conservada do que a sequência e que pequenas mudanças em uma sequência leva a uma pequena mudança estrutural. Dessa forma, por homologia é possível obter

um modelo tridimensional para uma proteína desconhecida baseada em uma ou mais proteínas de estrutura conhecida, bastando que estas tenham pelo menos 30% de identidade de sequências (FORSTER, 2002). Esse método tem sido amplamente utilizado por apresentar bons resultados no estudo das moléculas não cristalizadas. O aprimoramento das técnicas e o aumento do número de proteínas com sequência e estrutura conhecidas possibilitaram uma maior acurácia nas modelagens baseadas em homologia (MARTÍ-RENOM et al., 2000).

No presente trabalho, apenas as quimotripsinas foram usadas no estudo estrutural. As tripsinas foram eliminadas dessa etapa de estudo por serem principalmente inibidas por inibidores do tipo Kunitz. Esses inibidores por sua vez, apresentam poucas estruturas resolvidas no banco de dados PDB e quando presentes, estão sempre na forma isolada, impedindo a realização dos alinhamentos das enzimas de interesse com os complexos enzima-inibidor necessários para os métodos utilizados nesse trabalho. Já ao contrário, existem muitas estruturas no PDB de inibidores Bowman-Birk em complexo com SPs (foram utilizados oito diferentes) (tabela 2), facilitando a realização das técnicas apresentadas.

A qualidade dos modelos construídos foi verificada através de gráficos de Ramachandran (HOVMÖLLER S; ZHOU T; OHLSON T. 2002) e de estrutura secundária. Para obter informações sobre mudanças conformacionais das moléculas foi realizada dinâmica molecular através do programa GROMACS (VAN DER SPOEL et al. 2005).

5.3 Estimativa de afinidade das quimotripsinas pelos IPs testados

As estimativas de energia livre do sistema calculadas pelo programa AutoDock possibilitaram a identificação daquelas enzimas que podem apresentar uma participação chave na adaptação nas lagartas de *S. frugiperda*. Quanto menor a energia livre de um sistema, pode-se inferir que é maior a afinidade da enzima pelo substrato ou inibidor.

As enzimas que apresentam menor energia e portanto, maior afinidade aos IPs, quando considerados todos os inibidores testados foram as quimotripsinas sfChy4, SfChy5 e SfChy7. Porém, como as análise de expressão gênica foram realizadas com lagartas que se alimentaram de dieta com IP de soja, uma atenção individualizada nas energias desses sistemas (quimotripsinas-IP de soja) foram de especial importância.

Quando considerado apenas esse IP (PDB: 1D6R) as enzimas com menor energia foram as SfChy5, SfChy7 e SfChy12. Portanto, as demais quimotripsinas parecem, por inferência, serem as enzimas que possivelmente conseguem escapar dos efeitos do IP de soja.

5.4 Presença da serina extra e ASA

As diferenças funcionais entre membros de uma mesma família protéica são, em geral, conseqüência de diferenças estruturais na superfície externa das proteínas. Estas diferenças provêm de substituições, eliminações e inserções de resíduos nas cadeias de proteínas homólogas, principalmente nas alças, as regiões mais expostas da proteína.

Já foi mostrado em outros trabalhos que um ou poucos aminoácidos são capazes de influenciar ou até mesmo alterar significativamente a sensibilidade de SPs a inibidores. Esses aminoácidos estão presentes geralmente em alças externas ou no sítio de ligação dessas enzimas. (LOPES; SATO; TERRA, 2009; DUNSE et al, 2010b; RIBEIRO et al, 2010). As diferenças estruturais encontradas nos modelos de quimotripsinas gerados nesse trabalho confirmou que essas variações externas de estrutura estão presentes dentro dessa família de proteínas, porém o achado mais interessante foi a presença de uma serina extra próxima ao sítio catalítico em três das quimotripsinas estudadas (SfChy2, SfChy5 e SfChy9).

As três quimotripsinas que apresentaram essa serina extra, que se localiza sempre a três aminoácidos de distância da serina que compõe a tríade catalítica, também apresentam expressão gênica relativa aumentada na presença do inibidor em 48 horas. Os genes SfChy2 e SfChy5 já foram estudados anteriormente e também apresentaram aumento relevante na expressão quando comparados ao controle (BRIOSCHI et al., 2007). Justamente essas duas quimotripsinas apresentam perda de área de superfície acessível a solvente da serina extra quando complexadas a

inibidores. Os resultados apresentados mostram essa perda quando as quimotripsinas estão complexadas ao IP de soja (PDB: 1D6R).

5.5 Expressão gênica

5.5.1 Quimotripsinas

Várias estratégias de adaptação dos insetos à presença de inibidores em seu alimento são conhecidas. Uma das estratégias melhor documentada é o aumento da expressão gênica das SPs ou de sua atividade (BROADWAY; DUFFEY 1986; DE LEO et al. 1998; GATEHOUSE et al. 1999; PAULILLO et al., 2000; BRITO et al., 2001; ABDEEN et al., 2005; BRIOSCHI et al. 2007). O aumento da expressão relativa dos genes de quimotripsinas testados corrobora com a literatura, demonstrando que o mecanismo de *shotgun* ocorre durante a digestão das lagartas de *S. frugiperda*.

O nível de expressão gênica de oito quimotripsinas foi analisado através de PCR em tempo real e verificou-se que estas proteinases são as responsáveis por 67,12% das SPs presentes no intestino das lagartas levando-se em conta as SPs estudadas. Em menor ou maior escala, todas as quimotripsinas desse estudo apresentaram aumento em 48 horas de exposição das lagartas ao inibidor. Os dados sugerem que a adaptação da *S. frugiperda* aos IPs de soja é baseada principalmente no aumento da expressão das quimotripsinas, haja vista que os níveis de expressão das tripsinas é menos alterado. Uma questão interessante a ser explorada é se um outro tipo de inibidor de proteinase poderia modular com mais intensidade a expressão dos genes que codificam as tripsinas. Neste caso, a regulação da resposta adaptativa poderia ser regulada pelo tipo de inibidor.

Na comparação com os controles (dieta sem IP) em 48 horas, os genes SfChy3 e SfChy4 permaneceram no mesmo nível quando na presença de IP na dieta. Os genes SfChy2, SfChy7, SfChy9, SfChy11 e SfChy12 apresentaram aumento da expressão realtiva entre 3 e 7 vezes em 48 horas quando comparados ao tempo inicial. Na comparação com seus controles, houve aumento de cerca de duas vezes quando as lagartas se alimentavam com dieta acrescida de IP.

A quimotripsina que se destacou pelo grande aumento na expressão gênica relativa foi a SfChy5 que em 48 horas apresentou aumento de cerca de 82 vezes em

relação ao tempo zero e 7 vezes quando comparado ao seu controle nesse mesmo tempo.

Uma análise das proporções relativas da presença de moléculas de RNA das quimotripsinas estudadas mostrou que algumas, apesar de apresentarem grande aumento na expressão relativa, não são as mais presentes no intestino das lagartas. O RNA de SfChy5, por exemplo, representa 3,6% do RNA das quimotripsinas presentes no intestino de *S. frugiperda* de 6º ínstar em 48 horas de alimentação em dieta com IP de soja. Já a quimotripsina SfChy11 representa 23% do total de moléculas de RNA dessa família de SPs quando considerados os oito genes estudados, mesmo apresentando menor aumento na expressão gênica relativa em comparação com SfChy5.

5.5.2 Tripsinas

Os genes de tripsinas analisados por PCR em tempo real parecem responder em menor intensidade à presença de IP na dieta das lagartas. Os aumentos relativos de expressão, em geral foram mais baixos, sendo que os genes SfTry1, SfTry3 e SfTry6 praticamente não se alteraram ao longo do tempo e do tratamento. Os demais genes apresentaram aumento de duas a quatro vezes seu nível de expressão relativa em 48 horas quando comparados ao tempo inicial. Porém, em relação aos controles no mesmo tempo, também não houve diferença.

Baseando-se nos resultados, pode-se afirmar que as tripsinas parecem responder pouco à presença IP de soja na dieta das lagartas de *S. frugiperda*. Os níveis iniciais de RNA praticamente permanecem iguais ao longo do tratamento e do tempo apesar desse grupo de SPs representar 32,88% das enzimas no intestino das lagartas em 48 horas de tratamento. Isso indica portanto que as quimotripsinas parecem ser a principal família de enzimas a responder a presença dos IPs de soja na dieta.

5.6 Afinidade x Expressão

O objetivo principal desse trabalho era demonstrar que diferenças físicoquímicas importantes podem justificar a expressão aumentada do gene correspondente. Ou seja, relacionar insensibilidade (ou baixa afinidade) de uma enzima a IPs de plantas a um aumento significativo de expressão gênica como forma de adaptação de lagartas de *S. frugiperda*. Porém, os dados apresentados são pouco conclusivos. Quimotripsinas com afinidades baixas aos IPs e contribuição próximas de moléculas de RNA, como SfChy4 e SfChy9, por exemplo, apresentam nível de expressão gênica realtiva diferentes em 48 horas de tratamento. Em um outro exemplo, as SfChy5 e SfChy12 apresentam alta afinidade, aumento da expressão relativa porém apresentam contribuição de moléculas de RNA bem diferentes.

Como já mostrado em outros insetos, a combinação de estratégias de adaptação à dieta é observada e pode até mesmo variar de acordo com o alimento ingerido (ZHU-SALZMAN; BI; LIU, 2003; ERLANDSON, 2010). É possível que a polifagia desse inseto herbívoro esteja relacionada justamente a essa combinação de estratégias adaptativas.

A expressão de genes que codificam enzimas mais insensíveis a IPs tem sido largamente reportada em estudos da adaptação dos insetos (VOLPICELLA et al., 2003; MOON et al., 2004, DUNSE et al. 2010b). No presente trabalho diferentes níveis de afinidade a IPs foram mostrados e quando considerado apenas o IP de soja , as enzimas que apresentaram maior afinidade (mais sensíveis) foram a SfChy5, SfChy7 e SfChy12, porém com proporções de moléculas de RNA bem diferentes no tecido intestinal das lagartas (3,6%, 15,6% e 21,5% respectivamente). Comparando com as enzimas que apresentam menor afinidade (mais insensíveis) e relacionando essas mesmas com sua expressão relativa e proporção de moléculas de RNA é possível perceber que não há um padrão que relacione essas características.

Um dado interessante é que aquelas enzimas que apresentam a serina extra próxima ao sítio catalítico são as quimotripsinas que apresentam menor proporção de moléculas de RNA (SfChy2: 0,29%; SfChy5: 3,6% e SfChy9: 6,15%). Porém, a serina extra de SfChy9 não está presente na IFR.

A proporção de cada enzima fornece subsídios sobre o que possa ocorrer no processo digestivo da lagarta. Porém é necessário lembrar que uma baixa proporção de moléculas RNA pode estar associada com sua eficiência catalítica.

6 CONCLUSÕES

As quimotripsinas são uma das famílias de proteínas digestivas presentes no intestino de *Spodoptera frugiperda* e formam a principal classe de serino proteinases a responder a presença de IPs de soja na dieta.

O nível de expressão das quimotripsinas aumenta na presença de IP de soja na dieta principalmente em 48 horas após a exposição indicando que níveis elevados de expressão gênica são atingidos tardiamente.

A análise conjunta entre expressão dos genes e modelagem estrutural não permitiu a obtenção de um padrão comum que explicasse a adaptação da lagarta aos inibidores de proteinases

Como prespectiva futura, o papel da serina extra próxima ao sítio catalítico será investigado em detalhes.

REFERÊNCIAS

ABDEEN, A.; VIRGÓS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILÉS, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.57, p.189-202, 2005.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.

ANFINSEN, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, Washington, v. 181, n. 96, p. 223–230, 1973.

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of Digestion. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology**. New York: Pergamon Press, 1985. chap. 4, p. 279- 311.

BARTLETT G.J.; PORTER C.T.; BORKAKOTI N.; THORNTON J.M. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. **Journal of Molecular Biology,** London, v. 324, p. 105-121, 2002.

BORDOLI L.; KIEFER F.; ARNOLD K.; BENKERT P.; BATTEY J.; SCHWEDE T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols,** London, v. 4, p. 1-13, 2009.

BOTOS I.; MEYER E.; NGUYEN M.; SWANSON S.M.;KOOMEN J.M.; RUSSELL D.H.; MEYER E.F. The structure of an insect chymotrypsin. Journal of Molecular Biology, London, v. 298, n. 5, p.895-90, 2000.

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitorsensitive 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.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L.D.; BENGTSON, M.H.; SOGAYAR M.C.; MOURA D.S.; SILVA-FILHO M.C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v.37, n. 12, p. 1283-90, 2007.

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

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 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, Oxford, 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, p.303-312, 1995.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidoptera pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p.593-602, 2001.

DILL K.A.; OZKAN S.B.; SHELL M.S.; WEIKR T.S. The protein folding problem **Annual Review of Biophysics.** Palo Alto, v. 37, p.289–316, 2008.

DUNSE K.M.; KAAS Q.; GUARINO R.F.; BARTON P.A.; CRAIK D.J.; ANDERSON M.A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 34, p. 15016-21, 2010.

DUNSE K.M.; STEVENS J.A; LAY FT, GASPAR YM, HEATH RL, ANDERSON MA. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 107, n. 34, p. 15011-5, 2010.

EHRLICH, P.R.; RAVEN P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, Nova York, 18, p. 586-608, 1964.

FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER; P. LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 113-122, 2001.

FERNANDEZ, J. H.; MELLO, M. O.; GALGARO, L.; TANAKA, A. S.; SILVA FILHO, M.C.; NESHICH, G. Proteinase inhibition using small Bowman-Birk type structures.Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 6, p. 846-858, 2007.

FORSTER, M. J. Molecular modeling in structural biology. **Micron**, Oxford, v.33, p. 365-384, 2002.

FRANCO, O. L.; SANTOS, R. C.; BATISTA, J. A. N.; MENDES, A. C. M.; ARAÚJO, M. A. M.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FREITAS, S. M. Effects of blackeyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemical**, Oxford, v. 63, p.343-49, 2003.

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.

GARIANI T.; LEATHERBARROW R.J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases., **Journal of Peptide Research**, Copenhagen, v. 49, p. 467-475, 1997.

GATEHOUSE, A.M.LR.; 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**, Oxford, v.45, p.545-558, 1999.

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

GOODFORD, P.J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 28, p. 849-857, 1985.

HERMSMEIER, D.; SCHITTKO, U.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidopetra, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 683-700, 2001.

86

HOOFT R.W.; VRIEND G.; SANDER C.; ABOLA E.E. Errors in protein structures. **Nature**, London, v. 381, n.6580, p. 272, 1996.

HOVMÖLLER S, ZHOU T, OHLSON T. Conformations of amino acids in proteins. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, Copenhagen, v. 58, p. 768-76, 2002.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v.43, p.885-95, 1997.

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 Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p.8041-8045, 1995.

KARPLUS, M. Molecular dynamics of biological macromolecules: A brief history and perspective. **Biopolymers**, Weinheim, v. 68, n. 3, p. 350–358, 2003.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Plant Responses to Insect Herbivory: The Emerging Molecular Analysis. **Annual Review of Plant Biology**, Jena, v.53, p. 299-328, 2002.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J.M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. Copenhagen, v. 26, p. 283-291, 1993.

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**, Boston, v.5, p.1-9, 1999.

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.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; MARANA S.R.; JULIANO L.; TERRA W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v.36, p. 130-140, 2006.

LOPES, A.R.; SATO, P. M.; TERRA, W.R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 70, p. 188-203, 2009.

LWALABA D.; HOFFMANN, K. H.; WOODRING J. Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, New York, v. 73, n. 1, p. 14–29, 2010.

MARTI-RENOM M.A.; STUART A.; FISER A.; SÁNCHEZ R.; MELO F.; SALI A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure,** Palo Alto, v. 29, p. 291-325, 2000.

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

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

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, p.283-291, 2004.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R.S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and and Empirical Binding Free Energy Function. Journal of Computational Chemistry, New York, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

NÈGRE V.; HÔTELIER T.; VOLKOFF A. N.; GIMENEZ S.; COUSSERANS F.; MITA K.; SABAU, X.; ROCHER J.; LÓPEZ-FERBER M.; d'ALENCON E.; AUDANTP.; SABOURAULT C.; BIDEGAINBERRY V.; HILLIOU F.; FOURNIER P. Spodobase: an EST database for the lepidopteran crop pest *Spodoptera*. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, p. 1-10, 2006.

NESHICH G.; TOGAWA R.; MANCINI A. L.; KUSER, P. R.; YAMAGISHI M. E. B.; PAPPAS JR. G.; TORRES W. V.; CAMPOS T. F.; FERREIRA L. L.; LUNA F. M.; OLIVEIRA A. G.; MIURA R. T.; INOUE M. K.; HORITA L. G.; DE SOUZA D. F.; DOMINIQUINI F.; ÁLVARO A.; LIMA C. S.; OGAWA F. O.; GOMES B. G.; PALANDRANI J. C. F.; DOS SANTOS G. F.; DE FREITAS E. M.; MATTIUZ A. R.; COSTA I. C.; DE ALMEIDA C. L.; SOUZA S.; BAUDET C.; HIGA R. H. STING Millennium: a Web based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n.13, p. 3386-3392, 2003.

ONUCHIC J.N.; SOCCI N.D.; LUTHEY-SCHULTEN Z.; WOLYNES P.G. Protein folding funnels: the nature of the transition state ensemble. **Folding & design,** London, v. 1, n. 6, p.441-50, 1996.

ORTEGO, F.; FARINOS, G.P.; RUIZ, M.; MARCO, V.; CASTANERA, P. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariafranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Amsterdam, v.88, p.265-74, 1998.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por 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. cap.2, p.9-65. 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, p. 892-96, 2000.

PERONA J.J.; CRAIK C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein science : a publication of the Protein Society**, New York, v. 4, p. 337-360, 1995.

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

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

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.

RAWLINGS, N.; A. BARRETT. Introduction: serine peptidases and their clans and familie. Introduction: serine peptidades and theirs clans. In: BARRETT A.J.; RAWLINGS N.D.; WOESSNER J.F. **The Handbook of Proteolytic Enzymes**, London: Elsevier Academic Press, 2004. chap. 67, p. 1417-1438.

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

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

REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p.707-719, 2000.

RIBEIRO C, TOGAWA RC, NESHICH IA, MAZONI I, MANCINI AL, MINARDI RC, DA SILVEIRA CH, JARDINE JG, SANTORO MM, NESHICH G. Analysis of binding properties and specificity through identification of the interface forming residues (IFR) for serine proteases *in silico* docked to different inhibitors. **BMC Structural Biology**, London, v.10, p.36-52, 2010.

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.

SALI, A.; SHAKHNOVLCH. E. I.; KARPLUS. M. Kinetics of Protein Folding : A Lattice Model Study of the Requirements for Folding to the Native State. **Journal of Molecular Biology,** London, v. 235, p.1614-1636, 1994.

SCHECHTER I.; BERGER A. On the size of the active site in proteases. **Biochemical** and biophysical research communications, Nova York, v. 27, p.157-162, 1967.

SCHUELER-FURMAN O.; WANG C.; BRADLEY P.; MISURA K.; BAKER D. Progress in modeling of protein structures and interactions. **Science**, Washington, v. 310, n.5748, p. 638-4, 2005.

SOUZA, O.N.; ORNSTEIN R.L. Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, New York, v. 16, n. 6, p. 1205-18, 1999.

SRIDHARAN S.; NICHOLLS, A.; HONIG B. A new vertex algorithm to calculate solvent accessible surface areas. **Biophysical Journal**, New York, v. 61, p. A174, 1992.

TERRA W. R.; CRISTOFOLETTI P. T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 113, p. 725-730, 1996.

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

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

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, cap.6, p.153-186, 1996.

TIFFIN P.; GAUT B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in Zea and related genera. **Molecular Biology and Evolution**, Nova York, v.18, n. 11, p. 2092-101, 2001.

TRUITT, C.L.; WEI, H-H.; PARÉ, P.W. A plasma membrane protein from Zea mays binds with the herbivore elicitor volicitin. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 523-532, 2004.

VAN DER SPOEL D, LINDAHL E, HESS B, GROENHOF G, MARK AE, BERENDSEN HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, New York, v. 26, n. 16, p. 1701-18, 2005.

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. **European journal of biochemistry / FEBS**, Berlin, v.270, p.10-9, 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.

WALLING, L.L. The Myriad Plant Responses to Herbivores. **Journal Plant Growth Regulation**, Nova York, v.19, p.195–216, 2000.

WASTERNACK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH, O. The wound response in tomato – role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, p. 297-306, 2006.

YEH, K. W.; LIN, M.I.; TUAN, S.J.; CHEN,Y.M.; LIN, C.Y.; KAO, S.S. Sweet potato (Ipomoea batatas) trypin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.686-99, 1997.

ZHOU, M.; ROBINSON C. V. When proteomics meets structural biology. **Trends Biochemical Science**, Cambridge, v. 35, p. 522-529, 2010.

ZHU-SALZMAN, K.; BI, J.L.; LIU, T.X. Molecular strategies of plants defense and insect counter-defense. **Insect Science**, Victoria, v. 12, p.3-15, 2005.

ZHU-SALZMAN, K.; BI, J.L.; LIU, T.X. Molecular strategies of plants defense and insect counter-defense. **Insect Science**, Victoria, v. 12, p.3-15, 2005.

ANEXOS

		No. of residues	%-tage	
Most favoured regions	[A, B, L]	147	89.6%*	
Additional allowed regions	[a,b,1,p]	14	8.5%	
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	3	1.8%	
Disallowed regions	[XX]	0	0.0%	
Non-glycine and non-proline	residues	164	100.0%	
End-residues (excl. Gly and	l Pro)	17		
Glycine residues		24		
Proline residues		9		
Total number of residues		214		

	No. of residues	<pre>%-tage</pre>
Most favoured regions [A, B, L]	175	88.88*
Additional allowed regions [a,b,l,p]	21	10.7%
Generously allowed regions [~a, ~b, ~l, ~p] 0	0.0%
Disallowed regions [XX]	1	0.5%*
Non-glycine and non-proline residues	197	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Glycine residues	29	
Proline residues	8	
Total number of residues	236	

		No. of residues	8-tage
Most favoured regions	[A, B, L]	150	90.9%
Additional allowed regions	[a,b,1,p]	15	9.18
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline	e residues	165	100.0%
End-residues (excl. Gly and	d Pro)	12	
Glycine residues		27	
Proline residues		12	
Total number of residues		216	

		No. of residues	%-tage
Mast farming unging		100	01 59
Most lavoured regions	[A, B, L]	129	91.58
Additional allowed regions	[a, b, 1, p]	11	7.8%
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	1	0.7%
Disallowed regions	[XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline	e residues	141	100.0%
End-residues (excl. Gly and	l Pro)	12	
Glycine residues		26	
Proline residues		9	
Total number of residues		188	

	No. of residues	<pre>%-tage</pre>
Most favoured regions [A, B, L]	149	89.2%*
Additional allowed regions [a,b,l,p]	18	10.8%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,~	p] 0	0.0%
Disallowed regions [XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline residues	167	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	14	
Glycine residues	25	
Proline residues	12	
Total number of residues	218	

	No. of	
	residues	8-tage
Most favoured regions [A, B, L]	148	89.2%*
Additional allowed regions [a,b,l,p]	16	9.6%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,	~p] 2	1.2%
Disallowed regions [XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline residues	166	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	9	
Glycine residues	32	
Proline residues	11	
Total number of residues	218	

	No. of residues	<pre>%-tage</pre>
Most favoured regions [A, B, L]	146	90.1%
Additional allowed regions [a,b,l,p]	15	9.3%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]] 1	0.6%
Disallowed regions [XX]	0	0.0%
Non-glycine and non-proline residues	162	100.0%
End-residues (excl. Gly and Pro)	17	
Glycine residues	29	
Proline residues	7	
Total number of residues	215	

	No. of residues	<pre>%-tage</pre>
	147	01 29
[A, B, L]	14/	91.35
[a,b,1,p]	14	8.7%
[~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
[XX]	0	0.0%
residues	161	100.0%
Pro)	17	
	30	
	7	
	215	
	[A,B,L] [a,b,l,p] [~a,~b,~l,~p] [XX] residues Pro)	No. of residues [A,B,L] 147 [a,b,1,p] 14 [~a,~b,~1,~p] 0 [XX] 0 residues 161 Pro) 17 30 7 215