**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito dos inibidores de peptidase de soja no padrão de expressão e
atividade enzimática intestinal de lagartas de *Diatraea saccharalis*
(Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)**

Elaine Cristina Castelhana

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

**Piracicaba
2014**

**Elaine Cristina Castelhana
Engenheira Agrônoma**

**Efeito dos inibidores de peptidase de soja no padrão de expressão e atividade
enzimática intestinal de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)
(Lepidoptera: Crambidae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2014**

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

Castelhano, Elaine Cristina

Efeito dos inibidores de peptidase de soja no padrão de expressão e atividade enzimática intestinal de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) / Elaine Cristina Castelhano.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
91 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Serino peptidases 2. *Diatraea saccharalis* 3. Inibidor de peptidase de soja
4. Controle de insetos 5. Expressão gênica I. Título

CDD 633.34
C348e

Com amor infinito
Aos meus filhos queridos
Thiago e Alícia
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, que torna tudo possível, é força e equilíbrio em todos os momentos;

Aos meus filhos, Thiago e Alícia, que muitas vezes se privaram da minha presença, mas sempre confiaram na minha escolha, torcendo pela realização desse trabalho;

Ao meu pai Francisco, que tem a sabedoria que não se encontra nos livros e as palavras certas para cada momento, e à minha mãe Aparecida, pelo amor e pelo apoio fundamentais para a realização desse trabalho;

À minha irmã Elisângela e ao meu cunhado Diego, pelo carinho e pelos momentos de descontração;

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela oportunidade, orientação e confiança;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, pela disponibilização dos insetos e da estrutura do Laboratório de Biologia de Insetos para a realização dos experimentos;

À Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pelos ensinamentos e pelo incentivo que contribuíram imensamente para a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura, pela atenção e pelo auxílio ao longo dessa caminhada;

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela colaboração e amizade e ao técnico Rafael Colombi, pela dedicação com que realiza seu trabalho;

À Neide Graciano Zério, técnica do laboratório de Biologia de Insetos, pela dedicação e pelo preparo das dietas artificiais;

À Renata O. Dias e Marcelo M. Brandão pelo suporte na área de Bioinformática;

Aos meus amigos queridos, Poliene Costa, Marisa Negri, Fernando Negri, Helder Paulino, Virgínia e Roberto Simões que longe ou perto sempre estiveram ao meu lado;

À Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de qualificação concedida;

Ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas da UFG, especialmente aos Professores Dr. Edésio Fialho dos Reis e Dr. Luis Antônio Serrão Contim pelo incentivo e suporte que viabilizaram meu afastamento;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho;

“Transportai um punhado de terra
todos os dias e fareis uma montanha”

(Confúcio)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 <i>Diatraea saccharalis</i>	27
2.2 Inibidores de Peptidases.....	29
2.3 Inibidores de peptidases de soja	31
2.4 Inibidores de peptidases para o controle de insetos.....	31
2.5 Aspectos relacionados à digestão em insetos.....	33
2.6 Serino peptidases	34
2.7 Serino peptidases de insetos.....	35
2.8 Mecanismos de adaptação de insetos a inibidores de peptidases	36
2.9 Plantas transgênicas expressando inibidores de peptidases.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Extração dos inibidores de peptidases de soja.....	43
3.2 Quantificação e determinação da atividade do concentrado de IPS.....	43
3.3 Experimentos para a investigação do efeito da ingestão aguda e crônica de IPS sobre a expressão e a atividade de tripsinas e quimotripsinas	44
3.4 Identificação de serino peptidases intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i> e estudos de expressão gênica por RT-PCR quantitativo	47
3.5 Estudos bioquímicos do efeito do IPS sobre as serino peptidases de <i>Diatraea saccharalis</i>	52
3.6 Estudos sobre estabilidade de inibidores de peptidases de soja após passagem pelo sistema digestório de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	53

4	RESULTADOS.....	55
4.1	Determinação da atividade inibitória do concentrado de IPS	55
4.2	Transcriptoma intestinal de <i>D. saccharalis</i>	56
4.3	Efeito agudo da ingestão de IPS sobre a expressão de serino peptidases de <i>Diatraea saccharalis</i>	58
4.4	Efeito crônico da ingestão de IPS sobre a expressão de serino peptidases de <i>Diatraea saccharalis</i>	61
4.5	Proposição filogenética conjunta para tripsinas e quimotripsinas de <i>D. saccharalis</i> e <i>S. frugiperda</i>	64
4.6	Efeito do IPS sobre a atividade de tripsinas e quimotripsinas de <i>Diatraea saccharalis</i>	66
4.7	Efeito da ação de enzimas digestivas de <i>D. saccharalis</i> sobre os inibidores de peptidases de soja	69
5	DISCUSSÃO	73
5.1	Identificação de sequências de serino peptidases em <i>D. saccharalis</i> e sua relação com o comportamento alimentar.	73
5.2	Efeito da ingestão aguda e crônica dos inibidores de peptidases de soja na expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas de <i>D. saccharalis</i>	74
5.3	Efeitos da ingestão aguda e crônica de inibidores de peptidases de soja sobre a atividade de enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas em <i>D. saccharalis</i>	76
5.4	Filogenia comparativa entre as serino peptidases de <i>D. saccharalis</i> e de <i>S. frugiperda</i> com relação à expressão diferencial pela ingestão de IPS	78
5.5	Efeito da ação de enzimas digestivas de <i>D. saccharalis</i> sobre os inibidores de peptidases de soja	79
6	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Efeito dos inibidores de peptidases de soja no padrão de expressão e na atividade enzimática intestinal de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

Diante da busca por abordagens mais sustentáveis para o controle de insetos, os inibidores de peptidases de plantas surgem como uma ferramenta promissora para a proteção de culturas via obtenção de plantas transgênicas. Efeitos nocivos da ingestão de inibidores de peptidases de soja (IPS) sobre o desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* já foram reportados em trabalhos anteriores, entretanto, esses efeitos não foram estudados em nível molecular para essa espécie. Esse trabalho teve como objetivos identificar e analisar a expressão gênica e a atividade de serino peptidases intestinais de *D. saccharalis* em resposta à ingestão de um concentrado ativo de inibidores de peptidases de soja, relacionando essas informações com a presença ou não de algum mecanismo adaptativo desse inseto em resposta à ingestão desses inibidores. Para isso, foi obtido o transcriptoma intestinal de lagartas de *D. saccharalis* no quinto ínstar do desenvolvimento, submetidas à ingestão crônica de IPS. Em seguida foram identificadas as sequências correspondentes a serino peptidases do tipo tripsinas e quimotripsinas nesse transcriptoma, as quais foram utilizadas para o estudo da expressão gênica relativa por RT-PCR quantitativo, em resposta à ingestão aguda (por 24 e 48 horas) e crônica e de 0,5% (m/v) de um concentrado ativo de IPS por lagartas de *D. saccharalis* no terceiro e no quinto instares do desenvolvimento larval. As mesmas sequências foram utilizadas para a proposição de filogenias, sendo comparadas inclusive com sequências de serino peptidases de *Spodoptera frugiperda* identificadas em outro estudo paralelo. Ensaio de atividade tríptica e quimotríptica foram realizados utilizando substratos específicos (BApNA e SApNA) para determinar o efeito da ingestão de IPS sobre a atividade enzimática e finalmente, a integridade e a atividade inibitória do IPS foram analisadas após sua passagem pelo trato digestório das lagartas. Os resultados obtidos permitiram concluir que, nas condições experimentais empregadas nesse estudo, as lagartas de *D. saccharalis* não foram capazes de modular a expressão gênica das serino peptidases em resposta à ingestão crônica ou aguda de IPS. Os resultados de atividade tríptica e quimotríptica em função da ingestão de IPS podem sugerir um sinergismo na ação dessas enzimas em lagartas do quinto instar. Não foram detectadas diferenças na atividade de tripsinas e quimotripsinas em lagartas do terceiro ínstar em função da ingestão de IPS. A separação eletroforética das proteínas das fezes de lagartas permitiu a visualização de uma banda com massa molecular em torno de 20 kDa possivelmente correspondente ao inibidor do tipo Kunitz presente em soja que, juntamente com os dados de atividade antitriptica das fezes, indicam que *D. saccharalis* não é capaz de hidrolisar esse inibidor como um mecanismo de adaptação à sua presença na dieta.

Palavras-chave: Serino peptidases; *Diatraea saccharalis*; Inibidor de peptidases de soja; Controle de insetos; Expressão gênica

ABSTRACT

Effect of soybean peptidase inhibitors in the pattern of gene expression and gut enzyme activity of larvae of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

Given the importance of search for more sustainable approaches for pest control, plant peptidases inhibitors emerge as a promising tool for the protection of crops by obtaining transgenic plants. Harmful effects of soybean peptidases inhibitors (SPI) intake by *Diatraea saccharalis* on its development were already reported in previous studies, however, these effects have not been studied at the molecular level for this specie. This study aimed to identify and analyze the gene expression and the gut serine peptidases activity of *D. saccharalis* in response to the intake of an active extract of soybean peptidases inhibitors. These informations were related to the presence or absence of some adaptive mechanism of this insect in response to these inhibitors. The gut transcriptome of larvae of *D. saccharalis* in the fifth developmental instar was obtained, undergoing chronic intake of IPS. Then, sequences of serino peptidases like trypsin and chymotrypsin were identified and used for gene expression studies on a real-time PCR in response to acute (for 24 and 48 hours) and chronic intake of 0.5 % (w/v) of SPI active extract by larvae of *D. saccharalis* in the third and fifth instars of larval development. The same sequences were used to propose phylogenies, including comparisons with sequences of *Spodoptera frugiperda* serine peptidases identified in another parallel study. Tryptic and chymotryptic activity assays were performed using specific substrates (BAPNA and SApNA) to determine the effect of the SPI intake on enzyme activity and finally, the integrity and the inhibitory activity of the SPI were analyzed after passing through the digestive tract of caterpillars. The results showed that under the experimental conditions employed in this study, the larvae of *D. saccharalis* were not able to modulate the gene expression of serine peptidases in response to acute or chronic SPI intake. The results of tryptic and chymotryptic activity due to the SPI intake can suggest a synergism in the action of these enzymes in larvae of the fifth developmental instar. SPI intake did not cause differences in enzymatic activity of third instar larvae. Electrophoretic separation of proteins from the feces of caterpillars enabled visualization of a band with a molecular mass around 20 kDa possibly corresponding to the Kunitz inhibitor present in soybean. The antitryptic activity of the feces indicates that *D. saccharalis* is not able to hydrolyze soybean peptidases inhibitor as a mechanism of adaptation to their presence in the diet.

Keywords: Serine peptidases, Soybean peptidase inhibitor, *Diatraea saccharalis*; Insect control; Gene expression

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma dos experimentos de ingestão aguda e crônica de IPS por lagartas de *D. saccharalis* para estudos bioquímicos e de expressão gênica de serino peptidases.....45
- Figura 2 - Atividade proteolítica remanescente da tripsina bovina em relação a diferentes doses de proteína do concentrado de IPS.....55
- Figura 3 - Alinhamento das sequências de quimotripsinas de *D. saccharalis* com a quimotripsina bovina (PDB: 1YPH).....56
- Figura 4 - Alinhamento das sequências de tripsinas de *D. saccharalis* com a tripsina bovina (PDB: 418H).....57
- Figura 5 – Proposição filogenética para tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis*58
- Figura 6 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas..... 59
- Figura 7 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas.....59
- Figura 8 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas.....60
- Figura 9 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5% (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas.61

- Figura 10 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS.....62
- Figura 11 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS.....62
- Figura 12 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de larvas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS.....63
- Figura 13 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS.....64
- Figura 14 – Proposição filogenética para tripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*65
- Figura 15 - Proposição filogenética para quimotripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.....66
- Figura 16 – Efeito da ingestão aguda (48 horas) do concentrado de IPS sobre a atividade trípica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*67
- Figura 17 – Efeito da ingestão crônica do concentrado de IPS sobre a atividade trípica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*.....67
- Figura 18 - Efeito da ingestão aguda (48 horas) de IPS sobre a atividade quimotríptica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*.....68
- Figura 19 - Efeito da ingestão crônica de IPS sobre a atividade quimotríptica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*.....69

- Figura 20 – Eletroforese em PAGE-SDS para a visualização do IPS na dieta, no extrato de intestino médio e nas fezes de lagartas de *D.saccharalis* no quinto ínstar do desenvolvimento.....70
- Figura 21 - Ensaio de inibição *in vitro* da atividade da tripsina bovina em função da presença de extrato de fezes de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta controle e com dieta contendo 0,5% (m/v) de IPS.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta artificial utilizada para a alimentação de lagartas de <i>D. saccharalis</i> (KING; HARTLEY, 1985).....	46
Tabela 2 – Iniciadores utilizados para a amplificação de transcritos em <i>D. saccharalis</i>	51

LISTA DE SIGLAS

AIC - *Akaike Information Criterion*
BApNA - *N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*
BBI – Inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk
BSA – Albumina sérica bovina
Bt - *Bacillus thuringiensis*
CpTI – Inibidor de tripsina de feijão-de-corda
Cry – Proteína produzida por *Bacillus thuringiensis*
DsChy - Genes de quimotripsinas de *Diatraea saccharalis*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DsTry – Genes de tripsinas de *Diatraea saccharalis*
IP - Inibidor de peptidase
IPS – Inibidor de peptidases de soja
NaPI – Inibidor de protease de *Nicotiana glauca*
NCBI – National Center for Biotechnology Information
OCI – Orizacistatina I
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PIIF – *Proteinase inhibitor inducing fator*
PSA – Persulfato de amônio
SDS – Dodecilsulfato de sódio
SApNA - *N-Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilide*
SfChy - Genes de quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda*
SfTry – Genes de tripsinas de *Spodoptera frugiperda*
SKTI – Inibidor de tripsina do tipo Kunitz extraído de soja
SPI – *Soybean peptidases inhibitor*
TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina

1 INTRODUÇÃO

Os insetos são responsáveis por danos expressivos na produção agrícola. A ordem Lepidóptera tem uma considerável importância econômica nesse contexto por agrupar várias espécies que atuam como pragas de culturas que compõem a base da produção mundial de alimentos. A broca da cana (*Diatraea saccharalis*) é um inseto da ordem Lepidóptera tido atualmente como a principal praga das lavouras de cana-de-açúcar, seu ataque ocasiona grandes prejuízos, os quais comprometem a competitividade do Brasil na produção mundial de açúcar e álcool. Além da cana-de-açúcar, outras culturas importantes como milho, sorgo e arroz também são hospedeiros dessa praga (GALLO et al., 2002). Diante desses exemplos, fica evidente que o desenvolvimento de métodos para o controle de insetos-praga é fundamental para a viabilidade da produção agrícola. Métodos químicos baseados no uso de inseticidas foram amplamente difundidos por muitos anos, entretanto, os impactos negativos pelo uso desses produtos ao homem e ao ambiente tem estimulado a busca por formas mais sustentáveis para o controle de pragas, como o uso de inibidores de peptidases de plantas (DUNSE et al., 2010b; MACEDO et al., 2011; PAULILLO et al., 2012; POMPERMAYER et al., 2001; SMIGOCKI et al., 2013; XU et al., 1996). A síntese de inibidores de peptidases pelas plantas pode ser induzida em resposta à herbivoria, como um mecanismo natural de defesa (GREEN; RYAN, 1972). Alguns insetos, entretanto, desenvolveram ao longo da evolução mecanismos para sobrepor os efeitos indesejáveis dos inibidores de peptidases, entre eles, o aumento da expressão e a produção de enzimas digestivas insensíveis aos inibidores (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; BRIOSCHI et al., 2007; BRITO et al., 2001; BROADWAY, 1996; OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA, 2013), a degradação de moléculas dos inibidores por enzimas digestivas (GIRI et al., 1998) e o aumento na atividade ou variação no conjunto de enzimas envolvidas na digestão dos alimentos (CHOUGULE et al., 2008; HIVRALE et al., 2013). Estudos sobre os efeitos da ingestão de inibidores de peptidases de soja por *Spodoptera frugiperda*, um inseto polífago da ordem lepidóptera, demonstraram que esse inseto é capaz de modular a expressão de genes e de alterar o padrão de atividade de tripsinas e quimotripsinas para se adaptar à presença desses inibidores na dieta (BRIOSCHI et al., 2007; PAULILLO et al., 2000; SOUZA, 2013). O mesmo não foi observado quando lagartas de *D. saccharalis* foram submetidas à ingestão de inibidor de peptidases de soja. Distúrbios na fisiologia e no desenvolvimento de *D. saccharalis*

foram observados em função da ingestão desses inibidores (FALCO; SILVA-FILHO, 2003; POMPERMAYER et al., 2001). A existência de diversas famílias gênicas para a produção de enzimas digestivas classificadas como serino peptidases em insetos pode ser um fator importante para sua adaptação a diferentes inibidores de peptidases. Essa informação, aliada ao comportamento alimentar de *D. saccharalis*, que é um inseto com um número restrito de hospedeiros, o qual se alimenta de plantas pertencentes a uma única família (*Poaceae*), deu margem para uma investigação mais aprofundada, em nível transcricional e bioquímico, sobre os possíveis mecanismos adaptativos desse inseto frente à ingestão de inibidores de peptidases de soja (IPS). Algumas hipóteses foram formuladas para direcionar a investigação da reação de *D. saccharalis* à ingestão de IPS: i) O conjunto de serino peptidases expressas em *D. saccharalis* é menor do que o observado para lepidópteros polípagos, dificultando a adaptação desse inseto aos inibidores de peptidases de famílias de plantas não hospedeiras; ii) *D. saccharalis* apresenta baixa plasticidade quanto à atividade enzimática e a expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas em resposta aos inibidores de peptidases. Visando uma maior compreensão sobre os possíveis mecanismos de defesa de *D. saccharalis* à ingestão dos inibidores de peptidases de soja, foram estudados nesse trabalho os efeitos agudo e crônico da ingestão de um concentrado ativo de inibidores de peptidases de soja sobre o padrão de expressão e a atividade de tripsinas e quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* em dois momentos do desenvolvimento larval. Além disso, foram investigadas também a integridade e a atividade antitriptica do inibidor de peptidases de soja após sua passagem pelo trato digestório de lagartas de *D. saccharalis*. A identificação de sequências referentes a transcritos de tripsinas e quimotripsinas expressas no tecido intestinal de *D. saccharalis* foi realizada utilizando uma abordagem transcriptômica. Posteriormente, com o uso da técnica de RT-PCR quantitativo, foi realizado um estudo sobre o efeito da ingestão aguda (por 24 e 48 horas) e crônica do concentrado contendo inibidores de peptidases de soja sobre a expressão dos genes de tripsinas e quimotripsinas identificados em lagartas no terceiro e no quinto ínstares do desenvolvimento larval. O efeito da ingestão de inibidor de peptidases de soja sobre a atividade de tríptica e quimotríptica em *D. saccharalis* foi investigado com o uso de substratos cromogênicos específicos para essas enzimas. Finalmente, foi realizado um estudo bioquímico visando obter informações sobre a integridade e a atividade inibitória dos

inibidores de peptidases de soja após sua passagem pelo trato digestório das lagartas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Diatraea saccharalis*

A espécie *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), conhecida popularmente como broca da cana-de-açúcar, é um inseto holometabólico, da ordem Lepidóptera, família Crambidae. Sua distribuição geográfica estende-se desde a Região Sul dos Estados Unidos até a Região Norte da Argentina (GUAGLIUMI, 1972).

Esse inseto é a principal praga da cana-de-açúcar, que configura como uma cultura extremamente importante para a competitividade do Brasil na produção mundial de açúcar e álcool (GALLO et al., 2002). Além da cana-de-açúcar, essa broca ataca também outras gramíneas de importância econômica mundial como milho, sorgo e arroz (GUAGLIUMI, 1972).

Acredita-se que date de 1859 o primeiro registro sobre ocorrência da broca da cana-de-açúcar no Brasil, em uma revista chamada “O auxiliador da indústria nacional”. De acordo com esse registro, a ocorrência da broca da cana foi detectada inicialmente em Campos-RJ e em Santa Catarina, atingindo posteriormente a Bahia (GUAGLIUMI, 1972). Atualmente, *D. saccharalis* está presente em todas as regiões canavieiras do Brasil (DINARDO-MIRANDA et al., 2008; GUAGLIUMI, 1972).

O ciclo de vida de *D. saccharalis* dura de 53 a 60 dias, sendo a temperatura um dos fatores que exercem grande influência sobre a duração do seu ciclo e vida. King, Brewer e Martin (1975) demonstraram que aumentos progressivos na temperatura, partindo de 15,6 °C até 32 °C ocasionaram diminuição na duração dos estágios larval, pupal e adulto desse inseto. Em nosso meio, a broca da cana pode dar de quatro a cinco gerações anuais, dependendo das condições do inverno (NAKANO, 2011).

A postura dos ovos de *D. saccharalis* ocorre preferencialmente na face dorsal da folha, podendo variar de 5 a 50 ovos (GALLO et al., 2002). Os ovos são inicialmente de coloração esbranquiçada, tornando-se mais escuros conforme os embriões vão se desenvolvendo. Pouco antes da eclosão, os ovos assumem uma coloração negra devido à possibilidade de visualização da cápsula cefálica das lagartas através da casca dos ovos (HOLLOWAY et al., 1928). Quatro a nove dias após a postura ocorre a eclosão das larvas, as quais se alimentam inicialmente do parênquima das folhas e posteriormente migram para a bainha e o colmo, onde abrem um orifício e formam galerias de baixo para cima (GALLO et al., 2002). O

número de estágios larvais pode variar, geralmente entre cinco a sete ínstaes de acordo com as condições ambientais e nutricionais (KING; BREWER; MARTIN, 1975). Ao completarem o desenvolvimento larval, as lagartas fazem um orifício no colmo, fecham esse orifício com fios de seda e serragem e entram na fase de pupa. Após o desenvolvimento pupal, que dura de 9 a 14 dias, o adulto sai pelo orifício aberto anteriormente, acasalando-se e completando seu ciclo biológico. As lagartas são claras, com pontos marrons ao longo de cada seguimento do corpo e com a cabeça marrom. O adulto desse inseto é uma mariposa de hábitos noturnos com aproximadamente 25 mm de envergadura, asas anteriores amarelo-palha com duas listas escuras convergentes para frente (como dois V invertidos) e asas posteriores esbranquiçadas. As fêmeas geralmente são maiores que os machos e um pouco mais claras, nem sempre com listas perceptíveis (GALLO et al., 2002; GUAGLIUMI, 1972).

As galerias causadas no colmo pelo ataque dessa praga fazem com que os mesmos se partam com facilidade com o vento ou ainda impedem a circulação da seiva, causando a morte da parte que está acima do colmo atacado (COSTA LIMA, 1950). Outros prejuízos diretos envolvem perda de peso da cana, morte das gemas, brotações laterais e secamento dos ponteiros na cana nova, também conhecido como coração morto (GALLO et al., 2002). As galerias abertas pela broca da cana também acarretam danos indiretos ao serem colonizadas por fungos como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, os quais causam a chamada “podridão vermelha” que diminui a eficiência do caldo para a produção de açúcar e álcool pela inversão da sacarose (GALLO et al., 2002; NAKANO, 2011). De acordo com estimativas realizadas pelo Planalsucar (UFSCar) e pela Copersucar, 1% de intensidade de infestação pela broca da cana causa uma redução média de 0,77% na produtividade agrícola, com prejuízos de 0,25% na produção de açúcar e de 0,20% na produção de álcool (GALLO, 2002).

Diversos testes foram realizados com diferentes cultivares de cana-de-açúcar quanto ao seu potencial de resistência à *D. saccharalis* (DINARDO-MIRANDA et al., 2012; DINARDO-MIRANDA et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Os resultados revelaram que todas as cultivares testadas foram infestadas pela praga, embora algumas tenham apresentado certo grau de tolerância à broca. Métodos de controle químico, além de serem prejudiciais ao ambiente, tem sua eficiência comprometida uma vez que a broca se aloja no interior do colmo da cana, dificultando o contato

com o inseticida. Além disso, como as gerações da broca da cana se sobrepõem, o intervalo de aplicação deveria ser de duas a três semanas para o controle das lagartas que ainda não penetraram no colmo. Essa prática é inviável devido ao elevado custo operacional, o que é reforçado devido a cana-de-açúcar ser cultivada em áreas extensas (GUAGLIUMI, 1972).

Atualmente, o uso de inimigos naturais tem apresentado resultados positivos para o controle de *D. saccharalis*. Entre eles, podemos citar o parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1998 e o himenóptero *Cotesia flavipes*, que é um parasitóide de lagartas. O uso desses agentes biológicos reduziu a intensidade de infestação da cultura da cana de açúcar de 10% para 2% no Estado de São Paulo. (GALLO et al., 2002).

Além dos métodos de controle químicos, biológicos e culturais já citados, a obtenção de plantas transgênicas apresenta-se como uma alternativa viável e ambientalmente adequada para o controle de insetos. A primeira geração de plantas transgênicas de cana-de-açúcar e de milho obtidas e avaliadas para o controle de *Diatraea saccharalis* utilizou toxinas *Cry* de *Bacillus thuringiensis* como proteína inseticida (ARENCIBIA et al., 1997). Atualmente, novas proteínas estão sendo avaliadas para o controle de insetos e os inibidores de peptidases aparecem nesse contexto como uma opção interessante. Alguns trabalhos testando o efeito desses inibidores sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis* já foram realizados (RAMOS et al., 2012; SILVA et al., 2012), utilizando-os, inclusive, para a obtenção de plantas de cana transgênicas (FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

2.2 Inibidores de Peptidases

Inibidores de peptidases (IPs) são proteínas abundantes na natureza, presentes em plantas, animais e microrganismos (RYAN, 1990). Eles apresentam-se de diversas formas, em diferentes tecidos e sua função geral é a de inibir proteólises indesejadas, interferindo negativamente na ação de enzimas proteolíticas (LASKOWSKI; KATO, 1980).

Em plantas, os IPs podem apresentar-se de maneira constitutiva em diversas partes como sementes e tubérculos, onde se acumulam ao longo da maturação das plantas, favorecendo a estocagem de proteínas devido à inibição da atividade de proteases (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997). Os IPs podem também ser induzidos em alguns tecidos pelo ataque de pragas, patógenos, injúrias ou

condições de estresses abióticos como alta salinidade (JONGSMA; BOLTER, 1997). A maior parte dos inibidores de peptidases estudados pertence a três famílias de plantas: Fabaceae, Solanaceae e Poaceae (FAN; WU, 2005).

Há, basicamente, dois tipos de inibidores de peptidases. Os que formam complexos irreversíveis e os que se ligam de maneira forte, porém reversível aos seus alvos. Os representantes do primeiro grupo englobam as serpinas e as macroglobinas e no segundo grupo há dezenas de famílias de inibidores, representando a maioria dos inibidores de peptidases de plantas (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004). O mecanismo de atuação dos IPs que se ligam de forma reversível às peptidases geralmente segue um padrão comum, no qual o inibidor se combina com o sítio ativo da enzima em uma interação do tipo “enzima-substrato”. Na superfície de cada molécula de inibidor há pelo menos uma ligação peptídica denominada de “sítio reativo”, o qual interage com o sítio ativo da enzima a ser inibida com um ajuste excelente, havendo uma alta constante de equilíbrio para associação e uma mínima alteração conformacional na interação enzima-inibidor (LASKOWSKI; KATO, 1980).

Os IPs, em geral, apresentam baixa massa molecular (entre 5 e 25 kDa) e são ricos em resíduos de cisteína. Essa propriedade favorece a formação de pontes dissulfeto, proporcionando a essas proteínas alta resistência ao calor, a faixas extremas de pH e à proteólise (RICHARDSON, 1991). A classificação dos IPs em diferentes famílias é realizada com base na similaridade de suas sequências de aminoácidos e eles geralmente são específicos quanto à classe de peptidases na qual atuam, podendo ser inibidores de serino, cisteino, aspartato ou metalo-proteases (HABIB; FAZILI, 2007; RYAN, 1990). Outra característica comum entre os inibidores é que eles podem possuir diversos sítios reativos homólogos na mesma cadeia polipeptídica, provavelmente como consequência de eventos de duplicação gênica (LASKOWSKI; KATO, 1980).

Entre as classes de inibidores, os de peptidases serínicas são os mais estudados, seguido dos inibidores de peptidases cisteínicas, para os quais há um grande número, já parcialmente caracterizados. Diversas funções são atribuídas aos inibidores de serino-peptidases, como a regulação de proteinases endógenas durante a dormência de sementes, a mobilização de proteínas de reserva, a atuação como proteínas de reserva e, finalmente, a proteção ao ataque de insetos e patógenos (HAQ; ATIF; KHAN, 2004).

Alguns inibidores de serino peptidases são bifuncionais, podendo comumente apresentar atividade inibitória à tripsina e à α -amilase por exemplo. Outros podem apresentar domínios múltiplos, onde cada domínio apresenta uma atividade inibitória específica (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997). As principais famílias de inibidores de peptidases serínicas em plantas são: serpinas, inibidores de batata tipo I e II, inibidores de tripsina de cevada, inibidores de abóbora, inibidores tipo Kunitz e inibidores do tipo Bowman-Birk. Entre as famílias citadas, as duas últimas são as mais bem caracterizadas. Os inibidores do tipo Kunitz, apresentam massa molecular de 18 a 22 kDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas, um baixo conteúdo de cisteínas e um sítio reativo. Já os inibidores do tipo Bowman-Birk apresentam dois sítios reativos, muitos resíduos de cisteína e massa molecular de 8 a 10 kDa (FRATTALI, 1969; LASKOWSKI; KATO, 1980).

2.3 Inibidores de peptidases de soja

Entre os inibidores de peptidases presentes na soja dois deles são os mais estudados, os do tipo Kunitz (SBKI) (KUNITZ, 1945) e os do tipo Bowman-Birk (BBI) (BIRK; GERTLER; KHALEF, 1963; BOWMAN, 1946). O inibidor SBKI apresenta massa molecular de 21 kDa e é responsável por 80% da inibição da atividade triptica. O outro inibidor, chamado de Bowman-Birk, foi isolado por Bowman (1946) e descrito como tendo massa molecular de 24 kDa. Entretanto, Frattali (1969) descobriu que a massa molecular real do inibidor Bowman-Birk era de 8 kDa e que a massa de 24 kDa previamente descrita era devida à interação entre moléculas desse inibidor (ODANI; KOIDE; IKENAKA, 1972). O inibidor do tipo BBI apresenta atividade inibitória independente para tripsinas e quimotripsinas, e tem cerca de 20% de cisteínas e ausência de glicinas na sua sequência (FRATTALI, 1969). A ação desses inibidores sobre a atividade de peptidases ocasiona distúrbios no processo de digestão de alimentos, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos, consequentemente prejudicando o desenvolvimento dos insetos.

2.4 Inibidores de peptidases para o controle de insetos

A interação entre os IPs das plantas e as peptidases digestivas dos insetos e patógenos resultou em uma batalha evolutiva, onde as proteínas envolvidas nessa interação passam por modificações moleculares como tentativa de adaptação. Os insetos produzem e adaptam seu conjunto de enzimas para digerir o alimento, forçando as plantas a desenvolverem novos e eficientes inibidores para se proteger

desse ataque (CHRISTELLER, 2005). Ao contrário de outras proteínas, os inibidores de peptidases trocam os aminoácidos do sítio ativo como forma de modular sua atividade inibitória. A troca da arginina 63 por um triptofano nessa posição leva o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz a atuar como um inibidor de quimotripsina (LASKOWSKI; KATO, 1980).

A possibilidade de que os inibidores de peptidases atuassem como um mecanismo de defesa das plantas ao ataque de insetos foi proposta por Mickel e Standish (1947 apud LAWRENCE E KOUNDAL, 2002) tendo observado que lagartas de *Tribolium castaneum* não se desenvolviam normalmente em produtos de soja. A partir de então, alguns trabalhos foram realizados investigando essa possibilidade para outros insetos (GREEN; RYAN, 1972; LIPKE; FRAENKEL; LIENER, 1954; STEFFENS; FOX; KASSEL, 1978). Green e Ryan (1972) realizaram um trabalho clássico fornecendo evidências conclusivas sobre essa possibilidade ao demonstrarem que injúrias causadas em folhas de plantas de tomate e batata, de forma mecânica ou pelo ataque de insetos, resultaram em um aumento considerável nas concentrações de inibidores de peptidases nas folhas das plantas injuriadas. A concentração de inibidores foi aumentada também nas folhas vizinhas ao local da injúria, sugerindo a existência de um sinal químico responsável por essa resposta pelas plantas, o qual eles chamaram de “fator indutor de inibidor de proteinase” (PIIF). O fato de que as plantas podem expressar alguns inibidores de peptidases cuja principal função não é a inibição de peptidases endógenas, e sim a inibição de peptidases de animais e microrganismos, reforça a possibilidade de que esses inibidores atuem como um mecanismo de defesa a esses agentes biológicos (SANCHEZ-SERRANO et al., 1986).

A atuação dos inibidores como proteínas de defesa das plantas consiste na sua capacidade em inibir peptidases presentes no intestino dos insetos, levando a uma redução na disponibilidade de aminoácidos e, conseqüentemente, a atrasos no desenvolvimento dos mesmos (FAN; WU, 2005). Em geral, a eficácia dos inibidores de peptidases no controle de insetos é maior quando esses são provenientes de plantas não hospedeiras (PARDE; SHARMA; KACHOLE, 2010; SAADATI; BANDANI; MOSLEMI, 2011).

Muitos estudos envolvendo a descoberta de novos inibidores de peptidases e sua utilização para o controle de pragas vem sendo realizados (CRUZ et al., 2013; GAHLOTH et al., 2011; GHODKE et al., 2013; MACEDO et al., 2011), alguns deles

para o controle de *Diatraea saccharalis* (GARCIA et al., 2004; PAULILLO et al., 2012).

2.5 Aspectos relacionados à digestão em insetos

Digestão é o processo pelo qual as moléculas dos alimentos são quebradas em moléculas menores, as quais serão absorvidas pelo intestino. As enzimas digestivas dos insetos exercem papel fundamental nesse processo (TERRA; FERREIRA, 2009). A digestão em insetos é dividida em três fases: inicial, intermediária e final. Na fase inicial, ocorre a diminuição da massa molecular dos polímeros ingeridos pelos insetos devido à ação de enzimas como: amilases, celulasas, hemicelulasas e proteinases. Na fase intermediária, os oligômeros são hidrolisados por oligomerases como as aminopeptidases e, finalmente, na fase final da digestão, os produtos da fase intermediária são clivados até a obtenção de monômeros pelas dimerases como maltases, celobiasas e dipeptidases (SILVA; LEMOS; da SILVA, 2012).

O intestino dos insetos é compartimentalizado em intestino anterior, médio e posterior. Em Lepidópteros, o intestino anterior é composto por boca, esôfago e papo, sendo responsável pela digestão inicial dos alimentos. A maior parte da digestão, entretanto, acontece no intestino médio, o qual é dividido em ventrículo, estômago e túbulos de Malpighi (TERRA; FERREIRA, 2009). O ventrículo é uma estrutura semelhante a um tubo cujo espaço interno é separado em dois compartimentos pela membrana peritrófica. Essa membrana separa o alimento (conteúdo endoperitrófico) do espaço ectoperitrófico, podendo atuar como uma proteção mecânica para as células do intestino, como uma barreira física para a entrada de microrganismos, além de apresentar outras funções (TERRA, 1990, 2001). A digestão é finalizada no intestino posterior, composto pelo íleo, cólon e reto, onde ocorre a absorção de água e íons, terminando no ânus. Com exceção das enzimas envolvidas na digestão inicial, todas as demais estão imobilizadas na superfície intestinal (TERRA; FERREIRA, 2009). Em geral, os insetos utilizam uma classe de enzimas ou uma combinação de peptidases serínicas, cisteínicas ou aspárticas para a digestão dos alimentos (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997).

Algumas especializações fazem parte do canal alimentar de lepidópteros, entre elas, a presença de um sistema muito ativo de transporte epitelial, um tipo específico de células denominado “células caliciformes” e os maiores valores de pH

conhecidos em um sistema biológico. Há controvérsias sobre a função do elevado pH luminal. Dow e colaboradores (1992) sugerem que o alto pH luminal atue como um fator adaptativo a dietas ricas em tanino. Por outro lado, Terra e Ferreira (1994) apontam que esta adaptação pode ser uma característica de lepidópteros ancestrais para a extração de hemicelulose da parede celular das folhas. As células caliciformes excretam ions K^+ que são absorvidos das folhas ingeridas pelas lagartas e auxiliam as células colunares a absorver e secretar água (TERRA; FERREIRA, 1994).

2.6 Serino peptidases

Peptidases são enzimas proteolíticas que clivam ligações peptídicas e são fundamentais para a sobrevivência de qualquer organismo vivo. Elas podem ser classificadas como endopeptidases, quando hidrolizam ligações peptídicas internas ou exopeptidases, quando hidrolizam aminoácidos das extremidades N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica (RYAN, 1990; TERRA; FERREIRA, 1994). Além da classificação quanto ao local da hidrólise, as peptidases também são classificadas em sub-classes com base na sua estrutura terciária, possível origem e resíduo catalítico. De acordo com esses critérios, quatro classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular: serino peptidases (tem uma serina ou uma histidina no sítio ativo), cisteíno peptidases (tem uma cisteína no sítio ativo), aspártico peptidases (grupo aspartato) e metalo peptidases (íon metálico) (PÓLGAR, 2005; TERRA; FERREIRA, 1994).

O sítio funcional ativo das serino peptidases é bem conservado e representado pela chamada “tríade catalítica”, a qual é composta pela proximidade física dos aminoácidos histidina 57, aspartato 102 e serina 195 nos polipeptídeos em relação à quimotripsinas bovina (KRAUT, 1977). Entre as serino-peptidases, as tripsinas, quimotripsinas e elastases são responsáveis pela digestão inicial de proteínas no intestino de animais superiores (GARCIA-OLMEDO et al., 1987). A distinção entre esses três tipos de peptidases serínicas é feita com base na sua especificidade. As tripsinas clivam a região C-terminal em sítios contendo lisina e arginina, que são aminoácidos básicos, enquanto as quimotripsinas preferem clivar a região C-terminal em resíduos de fenilalanina, tirosina e leucina (hidrofóbicos), e as

elastases clivam em sítios contendo aminoácidos neutros (alanina e glicina) (RYAN, 1990).

Quanto à regulação, de um modo geral as peptidases atuam em uma cascata de eventos desencadeada por um determinado estímulo, sendo secretadas na forma de zimogênio. Cada zimogênio sucessivo na cascata é ativado pela peptidase imediatamente antecedente a ele. Alguns zimogênios podem ser auto catalíticos, principalmente se forem a primeira protease da via, entretanto, a cascata de amplificação só pode responder a um desafio fisiológico se houver um nível basal de atividade (GUBB et al., 2010).

2.7 Serino peptidases de insetos

Serino proteinases são peptidases que possuem uma serina e uma histidina em seu sítio ativo. Em lepidópteros, elas são responsáveis por 95% da atividade digestiva total (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA; 2006; TERRA; FERREIRA, 1994). Isso ocorre porque essas enzimas são mais ativas em pH alcalino (de 9 a 11), que é justamente a condição encontrada no sistema digestório de insetos da ordem lepidóptera (JAMAL et al., 2013). Dentro da sub-classe de serino peptidases, encontram-se as tripsinas e quimotripsinas, que tem ampla participação no processo digestivo, sendo bem distribuídas entre os insetos.

As tripsinas de insetos são serino peptidases que clivam os polipeptídeos na extremidade carboxila de aminoácidos básicos como lisina e arginina. De maneira geral, tem massa molecular entre 25 kDa e 30 kDa e pH ótimo sempre alcalino (entre 8 e 9). Embora as propriedades das tripsinas de insetos e vertebrados sejam similares, há algumas particularidades. Por exemplo, as tripsinas de insetos são mais sensíveis à presença de inibidores de peptidases e não são ativadas ou estabilizadas por íons cálcio (TERRA; FERREIRA, 1994). Quanto às quimotripsinas, são serino peptidases que clivam cadeias polipeptídicas na extremidade carboxila de aminoácidos aromáticos. Em insetos, geralmente apresentam massa molecular entre 20 kDa e 30 kDa e valores de pH ótimo entre 8 e 9, assim como as tripsinas (TERRA; FERREIRA, 1994). As sequências de quimotripsinas de insetos e vertebrados são similares, entretanto, as quimotripsinas de insetos são instáveis em pH ácido e fortemente inibidas por SBKI (JANY et al., 1983; SAKAL; APPLEBAUM; BIRK, 1988).

As serino peptidases apresentam-se no conteúdo intestinal dos insetos como um conjunto diverso de isoformas. O número de isoformas é variável entre as espécies de insetos, entretanto, tende a ser maior nos polívoros, favorecendo sua adaptação a dietas com uma gama maior de inibidores de peptidases e outros compostos antinutricionais, por se alimentarem de diferentes famílias de plantas (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). Além dos insetos possuírem diversos genes para serino peptidases, esses são regulados de forma diferencial em função da fase de desenvolvimento em que se encontram e, também, da composição de sua dieta (BRIOSCHI, 2007; CHIKATE et al., 2013; DUNSE et al., 2010a; MAHAJAN et al., 2013; SAIKIA et al., 2011; SOUZA, 2013). *Antheraea assamensis* é um inseto da ordem lepidóptera que se alimenta de diversas espécies da família Lauraceae. Uma comparação entre o conjunto de serino peptidases presentes no intestino de *A. assamensis* revelou que o nível de transcritos para tripsinas foi maior quando os insetos se alimentaram de plantas de *Persea bombycina* Kosterm., entretanto, a alimentação em plantas de *Litsea monopetala* Roxb., resultou em um nível maior de transcritos para quimotripsinas entre as enzimas digestivas intestinais (SAIKIA et al., 2011). Além das variações quanto à especificidade de substrato das serino peptidases, o aumento na expressão e a síntese *de novo* de algumas dessas enzimas também pode ocorrer. De uma maneira geral, esse processo de regulação favorece a participação de enzimas insensíveis aos inibidores de peptidases presentes no alimento ingerido pelo inseto (BRIOSCHI et al., 2007; BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; GATEHOUSE et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2013).

2.8 Mecanismos de adaptação de insetos a inibidores de peptidases

A co-evolução de insetos herbívoros e plantas ocasionou o surgimento de diversos mecanismos por parte das plantas em defesa ao ataque de insetos e, conseqüentemente, diversas adaptações também ocorreram nos insetos para subverterem os mecanismos de defesa das plantas. Um dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas em resposta à herbivoria foi a produção de inibidores de peptidases (GREEN; RYAN, 1972; LIPKE; FRAENKEL; LIENER, 1954; STEFFENS; FOX; KASSEL, 1978). Os insetos, por sua vez, desenvolveram mecanismos para minimizar os efeitos nocivos dos IPs sobre seu desenvolvimento (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004; CHOUGULE et al., 2008; GIRI, 1998; JONGSMA

et al., 1995) de forma que a adaptação a um determinado *habitat* ou hábito alimentar é mais importante para a determinação da composição das enzimas digestivas nos insetos do que características filogenéticas (TERRA; FERREIRA, 1994).

Spodoptera exigua é um inseto que apresenta características de adaptação à ingestão de IPs. Jongsma e colaboradores (1995) desenvolveram um estudo pioneiro visando desvendar esse mecanismo de resistência aos IPs por lagartas de *S. exigua* e demonstraram que essas lagartas foram capazes de sintetizar peptidases insensíveis aos inibidores produzidos pelas plantas. A partir de então, surgiram outros trabalhos importantes nessa linha, propondo outros mecanismos de defesa (DUNSE et al., 2010^a; GIRARD et al., 1998; GIRI et al., 1998). Com base nos resultados dos estudos disponíveis na literatura, algumas das principais estratégias adaptativas dos insetos à ingestão de IPs são: i) a produção e aumento na expressão de proteinases insensíveis aos IPs (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; BRIOSCHI et al., 2007; BRITO et al., 2001; CHOUGULE et al., 2008; JONGSMA et al., 1995, 2004; PETEK et al., 2012; SOUZA, 2013) ii) O aumento da atividade das enzimas digestivas como tripsinas e quimotripsinas (BROADWAY, 1997; PAULILLO et al., 2000); iii) Inativação de inibidores de peptidases de plantas por proteólise (GIRARD et al., 1998; GIRI, et al., 1998; ; iv) a oligomerização de enzimas digestivas visando diminuir sua afinidade de interação com os IPs (BRITO et al., 2001).

Os insetos, em geral, podem exibir mais de um desses mecanismos em conjunto. Por exemplo, *Heliothis virescens* foi capaz de sintetizar novas proteinases e formar oligômeros como estratégia de defesa aos inibidores de proteinases de tabaco (BRITO et al., 2001). *Helicoverpa armigera* respondeu à ingestão de inibidores de peptidases de ervilha com a produção de peptidases insensíveis aos inibidores e com a degradação de moléculas do inibidor pelas suas enzimas digestivas (GIRI, et al., 1998). É comum também observar estudos que resultaram em aumentos na atividade de enzimas digestivas em resposta à ingestão de IPs e que, quando complementados com análises de expressão gênica, detectaram aumentos dos níveis de expressão e a síntese *de novo* de peptidases insensíveis (BRIOSCHI et al., 2007; PAULILLO et al., 2000; SOUZA, 2013).

i) *Produção de peptidases e aumento de expressão de peptidases insensíveis aos IPs:*

Jongsma e colaboradores (1995) apresentaram a hipótese de que o aumento na produção de peptidases insensíveis à ação dos inibidores poderia explicar a adaptação de *Spodoptera exigua* ao inibidor de proteinase de batata tipo II. Nesse trabalho, lagartas de *S. exigua* foram alimentadas com plantas de tabaco transgênicas expressando o inibidor de proteinase batata tipo II e com plantas de tabaco não transgênicas. A análise da composição da atividade trípica nos dois tratamentos revelou que apenas 18% da atividade trípica de lagartas alimentadas com plantas transgênicas foi sensível à inibição pelo inibidor de batata do tipo II, enquanto a sensibilidade foi de 78% para lagartas alimentadas com plantas não transgênicas, atraindo a atenção de diversos cientistas para essa nova área de estudo. Alterações no tipo e na quantidade de peptidases digestivas também foram observadas quando lagartas de *Mamestra brassicae* foram alimentadas com dieta contendo o inibidor do tipo Kunitz de soja em comparação com lagartas alimentadas com dieta controle (CHOUGULE et al., 2008). Nesse caso, entretanto, embora as lagartas tenham apresentado esse mecanismo adaptativo, a ingestão de IPs prejudicou seu desenvolvimento normal. Dunse e colaboradores (2010a) observaram que lagartas de *Helicoverpa punctigera* que sobreviveram à ingestão de inibidores de peptidases de *Nicotiana glauca* (NaPI) apresentaram altos níveis de uma quimotripsina insensível ao NaPI. Comparando as sequências dessa quimotripsina insensível com a de uma quimotripsina sensível ao NaPI, e reproduzindo na quimotripsina sensível as alterações da aminoácidos presentes na quimotripsina insensível os autores identificaram quatro resíduos de aminoácidos importantes para a resistência de *H. punctigera* ao NaPI.

Embora a produção de proteases insensíveis aos inibidores seja uma estratégia adaptativa comum utilizada por diversos insetos, a natureza exata do mecanismo de sinalização que regula a expressão diferencial de genes que codificam peptidases não está elucidada (SILVA; LEMOS; da SILVA, 2012; SPIT et al., 2014; SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). Visando compreender um pouco melhor como a síntese das enzimas resistentes aos inibidores de peptidases é regulada, Broadway (1997) selecionou espécies de insetos *Agrotis ipsilon* (sensível) e *Helicoverpa zea* (insensível) com diferente susceptibilidade à ingestão do inibidor de soja do tipo Kunitz, e analisou a atividade enzimática dessas espécies após a ingestão de IPS. Os dados obtidos sugeriram que a secreção de enzimas resistentes aos inibidores de peptidases é regulada pela ingestão desses inibidores de uma

maneira dose-dependente e tempo-dependente. Os autores propuseram, ainda, que existem diversos fatores peptídicos que monitoram e regulam as enzimas digestivas, e que esses fatores são específicos para diferentes categorias de enzimas, sendo alguns responsáveis pela ativação de tripsinas de efeito generalizado, enquanto outros são específicos para a ativação de um grupo secundário de tripsinas resistentes aos inibidores. Algumas enzimas podem, ainda, não estar sobre o controle desses fatores peptídicos de monitoramento.

ii) Aumento da atividade enzimática

A ação esperada dos inibidores de peptidases é justamente diminuir a atividade enzimática, uma vez que eles se ligam a essas enzimas tornando-as indisponíveis para a hidrólise dos peptídeos. Paulillo e colaboradores (2000) detectaram diminuição da atividade enzimática quando o extrato intestinal contendo as enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda* foi incubado na presença de inibidor de peptidases, entretanto, a atividade inibitória detectada foi bem menor quando extratos de lagartas previamente alimentadas com dieta contendo o inibidor de peptidases foram incubadas com o IP *in vitro*. A perda de atividade biológica do inibidor de peptidases nesse caso foi atribuída à presença de enzimas insensíveis ao inibidor. Em alguns casos, a atividade enzimática é mais alta nos insetos alimentados com dieta contendo IP do que nos insetos controles (CHOUGULE et al., 2008; JONGSMA et al., 1995).

iii) Inativação de inibidores de peptidases de plantas por proteólise

Esse tipo de mecanismo de defesa foi observado no trabalho de Girard e colaboradores (1998), no qual foi feita a caracterização das enzimas digestivas de *Phaedon cochleareae* (Coleoptera), e foram estudados os efeitos da interação dessas enzimas com dois inibidores de peptidases, orizacistatina I (OCI) e Bowman-Birk (BBI). O primeiro é um inibidor cisteínico extraído de arroz e o segundo é um inibidor serínico extraído de soja. Os resultados indicaram que as peptidases digestivas do inseto, principalmente as serino peptidases e as leucino aminopeptidases, foram capazes de clivar os inibidores utilizados, causando sua inativação. A proteólise de inibidores de peptidases de ervilha também foi relatada como um dos mecanismos de defesa utilizados por *Helicoverpa armigera* para minimizar os possíveis efeitos nocivos da ingestão desses inibidores (GIRI et al., 1998).

iv) Oligomerização de enzimas digestivas e consequente diminuição na afinidade de interação com os inibidores de peptidases

Brito e colaboradores (2001) estudaram a adaptação de lagartas de *Heliothis virescens* à ingestão dos inibidores de peptidases presentes em folhas de tabaco. Utilizando diversas abordagens de cromatografias e eletroforeses de proteínas, os autores verificaram que a composição de tripsinas foi diferente entre lagartas alimentadas com folhas de tabaco e lagartas alimentadas com dieta sem IPs. Esse efeito não foi observado para as quimotripsinas. As tripsinas resistentes à inibição produzidas por *H. virescens* apresentam uma maior afinidade de ligação ao substrato. Como a reação de inibição das enzimas digestivas pelos IPs é competitiva, essa forte ligação diminui a inibição causada pelos IPs. Além da síntese de tripsinas resistentes, foi observado que as tripsinas insensíveis apresentavam uma tendência a formar oligômeros, o que possivelmente também contribuiu para sua menor afinidade de ligação dos IPs.

2.9 Plantas transgênicas expressando inibidores de peptidases

O intestino representa a maior interface entre os insetos e o ambiente. Uma maior compreensão das suas funções e dos processos regulatórios da digestão pode contribuir para o desenvolvimento de métodos de controle que atuem nessa interface, baseados principalmente na obtenção de plantas transgênicas (TERRA; FERREIRA, 1994). Diversos trabalhos relatam a descoberta, a caracterização e o potencial inseticida de inibidores de peptidases de plantas para o controle de insetos (CRUZ et al., 2013; DiMARO et al., 2011; PAULILLO et al., 2012; GHODKE et al., 2013; RAMOS et al., 2012; SAADATI; BANDANI, 2011; SILVA et al., 2012; SMIGOCKI et al., 2013). A coevolução de insetos e plantas trouxe adaptações simultâneas entre os inibidores de peptidases produzidos pelas plantas e as enzimas digestivas presentes nos insetos, de forma que os inibidores de peptidases de plantas não hospedeiras em geral apresentam maior eficácia para a produção de transgênicos resistentes ao ataque de insetos (JAMAL et al., 2013; JONGSMA; STIEKEMA; BOSCH, 1996).

Diversas abordagens podem ser empregadas para a proteção de culturas empregando inibidores de peptidases. Cui e colaboradores (2011) propuseram o uso de inibidor de peptidases extraído de feijão (CpTI) em conjunto com o gene Cry 1Ac para o controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner). Falco e colaboradores (2003)

produziram e avaliaram plantas transgênicas de cana de açúcar expressando inibidores de peptidases de soja para a resistência a *D. saccharalis*. Os resultados obtidos demonstraram um retardo no desenvolvimento de lagartas que se alimentaram de folhas de plantas transgênicas em comparação com aquelas alimentadas por folhas de plantas não transformadas. Os ensaios em casa de vegetação, entretanto, revelaram que esse retardo não foi suficiente para impedir a ocorrência do chamado “coração morto” nas plantas transgênicas infestadas pela praga.

Diante dos que se tem publicado até o momento, estudos moleculares sobre o efeito de inibidores de peptidases em *D. saccharalis* podem revelar novos alvos a serem utilizados para o controle desse inseto. Além disso, permitirão uma maior compreensão do porquê esse inseto tem seu desenvolvimento tão comprometido pela ingestão de IPS, diferentemente do que ocorre para outros insetos, como por exemplo, *S. frugiperda*, que é capaz de desenvolver mecanismos para subverter esses efeitos. Sabendo que um mecanismo adaptativo comum de alguns insetos à ingestão de IPs é a expressão de peptidases insensíveis aos inibidores, uma hipótese levantada nesse trabalho é de que *D. saccharalis* não é capaz de modular a expressão desses genes em resposta ao IPS. Além da expressão gênica, também foram investigadas alterações na atividade enzimática de tripsinas e quimotripsinas e na integridade e atividade inibitória das moléculas dos IPS após passagem pelo trato digestório das lagartas de *D. saccharalis*. A análise conjunta desses dados pode fornecer uma visão geral sobre a presença ou não de algum mecanismo, ainda que pouco eficiente, relacionado à tentativa dessa espécie em subverter os efeitos nocivos do IPS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração dos inibidores de peptidases de soja

Os inibidores de peptidases de soja (IPS) foram extraídos de sementes da variedade IAC-8. Para isso, 100 g de sementes foram trituradas em um liquidificador e, posteriormente, homogeneizadas em solução salina (1L de NaCl 0,15 M) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O homogeneizado foi filtrado em oito camadas de gaze para a remoção do material sólido e centrifugado a 3000xg durante 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o volume de sobrenadante foi determinado e ajustado para 70 % (v/v) com acetona gelada em condições de agitação, para a precipitação das proteínas. Procedeu-se, então, uma nova centrifugação a 6000xg durante 20 minutos a 4 °C para a obtenção do precipitado, o qual foi liofilizado durante 72 horas para remoção da acetona residual, fornecendo um concentrado ativo de IPS.

3.2 Quantificação e determinação da atividade do concentrado de IPS

A quantidade de proteínas no concentrado foi determinada de acordo com a metodologia desenvolvida por Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. O potencial inibitório do concentrado de IPS sobre a atividade trípica foi estimado medindo-se a atividade trípica remanescente de alíquotas de tripsina bovina incubadas com doses crescentes do concentrado em relação à atividade de alíquotas sem o concentrado de IPS. Para a determinação da atividade trípica, foi utilizado o substrato cromogênico *N*-benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) (ERLANGER et al., 1961), específico para tripsinas. A tripsina bovina (Sigma-Aldrich) utilizada no ensaio foi preparada em uma solução estoque a 1mg/mL em HCl 0,0025 N e diluída na proporção 1:10 em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, para compor a solução de trabalho. Doses crescentes do concentrado proteico de IPS (0 µg; 0,0625 µg; 0,125 µg; 0,25 µg; 0,5 µg; 1,0 µg e 2,0 µg) foram incubadas com 10 µL da solução de trabalho de tripsina por 15 minutos a 37 °C em um volume final de 80 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Após essa incubação, 200 µL de uma solução 1 mM de BAPNA em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 foram adicionados a cada amostra, procedeu-se uma incubação a 37 °C por 20 minutos e, em seguida, foi feita a leitura a 410 nm em um espectrofotômetro Spectramax Plus (Molecular Devices, USA) e o

cálculo da atividade trípica remanescente estimado, considerando-se um valor de inibição igual a zero para a atividade da tripsina sem o IPS.

3.3 Experimentos para a investigação do efeito da ingestão aguda e crônica de IPS sobre a expressão e a atividade de tripsinas e quimotripsinas

Os efeitos da ingestão aguda e crônica de IPS foram estudados em lagartas de *Diatraea saccharalis* no terceiro e no quinto ínstaes do desenvolvimento. Essas fases do desenvolvimento larval foram escolhidas porque em condições de criação em dieta artificial o quinto instar representa o momento no qual ocorre um pico de consumo de alimentos pelas lagartas e, conseqüentemente, uma intensificação na atividade das enzimas relacionadas à digestão. O terceiro instar foi escolhido como um ponto adicional para esse estudo por representar um momento onde a ingestão de alimentos começa a ser intensificada.

A exposição de lagartas à dieta artificial contendo 0,5 % (m/v) de IPS por períodos curtos de tempo (24 horas e 48 horas) foi designada como ingestão aguda, sendo a ingestão crônica caracterizada por uma exposição longa e contínua das lagartas à dieta artificial contendo 0,5 % (m/v) de IPS, desde a sua eclosão até o final do experimento. Um fluxograma ilustrando a condução dos experimentos de ingestão aguda e crônica de IPS pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma dos experimentos de ingestão aguda e crônica de IPS por lagartas de *D. saccharalis* para estudos bioquímicos e de expressão gênica de serino peptidases

3.3.1 Origem do material biológico

As lagartas de *D. saccharalis* utilizadas nesse estudo foram provenientes de uma população coletada de plantas de milho de uma lavoura situada em Bambuí-MG, na safra de 2006-2007. Como *D. saccharalis* se mantém bem em criação artificial, essa colônia não foi renovada desde a coleta até o período envolvido nessa pesquisa.

3.3.2 Criação das lagartas de *Diatraea saccharalis* para o estudo dos efeitos agudo e crônico do IPS

As lagartas de *D. saccharalis* foram cedidas pelo Prof. Dr José Roberto Postali Parra. As etapas de criação dos insetos em dieta artificial foram realizadas no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

As colônias de insetos foram mantidas em dieta artificial de King e Hartley (1985) acrescida ou não de concentrado ativo de IPS, com fotoperíodo de 14:10

horas (dia:noite), a 26 °C (± 1 °C) e umidade relativa de 70 % (± 10 %). A composição da dieta está descrita na Tabela 1.

O efeito agudo da ingestão de IPS sobre as tripsinas e quimotripsinas foi analisado após a alimentação das lagartas por 24 e 48 horas com dieta contendo 0,5 % (m/v) de IPS. Esse efeito foi analisado em lagartas de terceiro e de quinto ínstar. Para isso, inicialmente, todas as lagartas foram colocadas em dieta artificial controle (sem IPS), onde permaneceram até a fase de desenvolvimento a ser estudada (terceiro ou quinto ínstar). Assim que as lagartas atingiram a fase desejada para o estudo, os insetos foram subdivididos em dois novos grupos, um deles foi transferido para novos tubos contendo dieta controle e o outro grupo foi transferido para tubos contendo dieta com 0,5 % (m/v) de IPS. A partir dessa subdivisão dos insetos, foi iniciada a contagem dos períodos de alimentação das lagartas, os quais foram estabelecidos como 24 e 48 horas, quando, então, os insetos foram coletados para os ensaios bioquímicos e de expressão gênica.

Tabela 1 – Composição da dieta artificial utilizada para a alimentação de lagartas de *D. saccharalis* (KING; HARTLEY, 1985)

Constituintes	Quantidades ²
Germe de trigo	35,0 g
Farelo de soja	120,0 g
Açúcar	120,0 g
Sais de Wesson	17,0 g
Ácido ascórbico	4,20 g
Cloreto de colina	0,9 g
Vita Gold [®]	0,9 mL
Solução vitamínica ¹	25,0 mL
Metil-parahidroxibenzoato (nipagin)	7,0 g
Formaldeído (40%)	1,7 mL
Tetrex	0,3 g
Ágar	25,0 g
Água destilada	q.s.p. 2000 mL

- Notas:
- 1 Complexo vitamínico diluído em 1000 mL de água destilada: 1 g de niacinamida; 1 g de pantotenato de cálcio; 0,5 g de riboflavina; 0,25 g de tiamina; 0,25 g de piridoxina; 0,1 g de ácido fólico; 0,02 g de biotina; 2 mL de vitamina B12 (1000 mg/mL).
 - 2 Quantidade de ingredientes suficiente para 150 tubos.

Para o estudo do efeito crônico da ingestão de IPS sobre as tripsinas e quimotripsinas, lagartas recém-eclodidas de *D. saccharalis* foram divididas em dois grupos, um que se alimentou de dieta controle (sem IPS) e o outro que se alimentou de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado ativo de IPS. Cada um desses dois grupos de lagartas foi subdividido em dois novos grupos, de acordo com as fases do desenvolvimento larval nas quais o experimento foi finalizado, ou seja, o terceiro ínstar para um dos subgrupos e o quinto ínstar para o outro.

Foram realizadas três repetições independentes para cada experimento e cada tratamento foi realizado em triplicatas biológicas, sendo cada uma composta por 20 indivíduos. Os estudos bioquímicos e de expressão gênica foram realizados a partir de intestinos coletados das lagartas no quinto ínstar do desenvolvimento. Para os estudos envolvendo lagartas no terceiro ínstar, indivíduos inteiros foram utilizados, sem dissecação dos intestinos.

3.4 Identificação de serino peptidases intestinais de *Diatraea saccharalis* e estudos de expressão gênica por RT-PCR quantitativo

Inicialmente foi necessária a obtenção de um transcriptoma intestinal de lagartas de *D. saccharalis* para a identificação das sequências de serino peptidases. Após essa etapa, pares de iniciadores para cada uma das sequências identificadas foram desenhados e testados quanto à sua especificidade para serem empregados nos estudos de expressão gênica por RT-PCR quantitativo.

3.4.1 Transcriptoma intestinal de *Diatraea saccharalis*

O transcriptoma intestinal de *D. saccharalis* foi obtido a partir de um conjunto de 50 intestinos de lagartas no quinto ínstar do desenvolvimento larval, alimentadas com dieta artificial contendo 0,25% (m/v) do concentrado ativo de inibidores de peptidases de soja desde o momento da sua eclosão. Ao atingirem o quinto instar, os intestinos das lagartas foram dissecados, coletados com o auxílio de pinças e de um bisturi, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, macerados e homogeneizados. O reagente TRIZOL[®] (Invitrogen) foi utilizado para a extração do RNA, conforme descrito no item 3.4.4. O transcriptoma foi obtido pela empresa FASTERIS S.A. (Suiça), utilizando a plataforma de sequenciamento de última geração, Illumina/Solexa (equipamento HiSeq2000). As leituras de fita única oriundas do sequenciamento foram montadas utilizando o *software* CLCBIO Workbench e o *software* livre VELVET, sendo os produtos de ambos unidos pelo

programa CAP3. A anotação das sequências foi feita por Dias¹ e Brandão² (informação pessoal) com o uso do Blast2GO (CONESA et al., 2005). Neste trabalho, foram utilizadas apenas as sequências do transcriptoma completas identificadas como tripsinas ou quimotripsinas.

3.4.2 Identificação e classificação das sequências de serino peptidases

A busca pelas sequências de serino peptidases presentes no transcriptoma de *D. saccharalis* foi realizada por meio da comparação com sequências similares previamente identificadas no transcriptoma de *Spodoptera frugiperda*. As sequências completas de nucleotídeos foram então traduzidas em sequências proteicas, com o uso da ferramenta Transeq (EMBL-EBI) e alinhadas à tripsina (PDB: 418H) e à quimotripsina (PDB: 1YPH) bovinas com o uso do *software* MUSCLE (EMBL-EBI). Esse alinhamento foi utilizado para a confirmação da identidade das sequências como pertencentes à família das serino peptidases, utilizando como parâmetro a triagem das sequências contendo a tríade catalítica completa (His57, Asp102 e Ser195) em relação às proteínas bovinas citadas acima.

A distinção entre as prováveis tripsinas e quimotripsinas foi realizada adotando-se como parâmetro o aminoácido 189 das sequências, sendo classificadas como tripsinas aquelas que apresentaram um ácido aspártico nessa posição e como quimotripsinas aquelas contendo serina, glicina ou outros aminoácidos não carregados nessa posição (HEDSTORM, 2002).

3.4.3 Alinhamento de sequências e proposição filogenética

As sequências correspondentes às proteínas ativas de tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* foram alinhadas usando o *software* T-coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). As sequências das proteínas ativas de tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda* obtidas por Souza (2013) também foram utilizadas para a obtenção de proposições filogenéticas em conjunto com as de *D. saccharalis*. As proposições filogenéticas foram conduzidas por inferência bayesiana usando o *software* MrBayes (versão 3.2.1 mpi-enable) (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para isso, os modelos de substituição de aminoácidos

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

²BRANDÃO, M.M. USP/Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”

foram escolhidos usando-se o *software* ProtTest (versão 3) (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005) e utilizando como parâmetro o *Akaike Information Criterion* (AIC). Um total de 2×10^6 gerações foi conduzido, com amostragem a cada 100 gerações. Para garantir a amostragem das árvores após a convergência das topologias, foi realizado o descarte de 25 % das árvores iniciais. As árvores resultantes foram, então, analisadas usando-se o *software* FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

3.4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir de 100 mg de tecido previamente macerado em nitrogênio líquido até atingir a consistência de um pó bem fino. As amostras de tecido foram colocadas em tubos de 1,5 mL e, imediatamente, homogeneizadas em 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante. O homogeneizado permaneceu à temperatura ambiente por 5 minutos e 200 µL de clorofórmio foram adicionados à mistura, a qual foi homogeneizada por agitação e mantida à temperatura ambiente por mais dois minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000xg, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. Cada tubo recebeu 500 µL de isopropanol, e após agitação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 12.000xg, 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 750 µL de etanol a 75 % e tratado com DNase I (Fermentas) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Para a eliminação da DNase I e obtenção de um RNA total de melhor qualidade e pureza, o procedimento de extração com Trizol[®] foi repetido, porém utilizando-se a metade do volume indicado pelo fabricante. As amostras foram diluídas em 50 µL de água ultrapura, livre de nucleases. A quantificação das amostras foi realizada pela leitura em um espectrofotômetro a 260 nm e a pureza das amostras foi verificada pela razão dos valores de absorbância a 260/280 nm. A integridade das amostras de RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 % em condições desnaturantes. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se o kit ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega) e seguindo as instruções do fabricante. Para isso, 1 µL do primer Oligo (dT) 18 (50 µM) foi adicionado ao RNA total e o volume foi completado para 5 µL com água livre de nucleases. Os tubos foram, então, incubados a 70 °C por 10

minutos e imediatamente colocados em gelo por 5 minutos. Após essa incubação, cada tubo recebeu 15 µL de uma mistura contendo 6,6 µL de água livre de nucleases; 4 µL de tampão 5x; 2,4 µL de MgCl₂ (25 µM); 1 µL de dNTP (10 µM) e 1 µL da enzima transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega). A reação de amplificação ocorreu em um termociclador, com um ciclo de temperaturas de 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 60 minutos e 72 °C por 10 minutos.

3.4.5 RT-PCR quantitativo

As reações de amplificação por RT-PCR quantitativo foram realizadas em triplicatas, em um equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de 25 µL, contendo: 10 ng de cDNA; 12,5 µL da mistura Máxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas); 0,3 µL de cada um dos iniciadores (10 µM) (Tabela 2) e 7,9 µL de água livre de nucleases. O programa de amplificação utilizado foi de um ciclo a 50 °C por 2 minutos, um ciclo a 95 °C por 10 minutos e mais 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 58-62 °C (dependendo da temperatura de anelamento do iniciador utilizado) por 1 minuto. A curva de “melting” foi realizada após a amplificação dos fragmentos, a partir da temperatura de anelamento do primer acrescida de 1 °C até atingir 95 °C.

Os iniciadores utilizados foram desenhados com base nas sequências de tripsinas e quimotripsinas identificadas no transcriptoma intestinal de *Diatraea saccharalis*, desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da ESALQ/USP. Para isso foi utilizado o programa Primer3Plus disponível em <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/> (UNTERGASSER et al., 2007). Os pares de primers fornecidos pelo programa foram testados quanto à formação de dímeros, estruturas secundárias e possibilidades de autoanelamento com o auxílio do programa NetPrimer (Primer Biosoft), disponível em <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>. As sequências dos iniciadores de cada gene foram testadas quanto à sua especificidade por análise alinhamento com as sequências do transcriptoma intestinal de *D. saccharalis* e com sequências de nucleotídeos depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o programa blastn <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A Tabela 2 apresenta as sequências dos iniciadores utilizados. Reações de amplificação por PCR não quantitativo foram realizadas para a determinação da temperatura de anelamento de cada um dos iniciadores e, também, para confirmar o tamanho do

produto amplificado. Nessas reações, aproximadamente 100 ng de cDNA foram amplificados em tampão de PCR 1x contendo 1,5 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada primer; 0,2 mM dNTPs e 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific). A temperatura de anelamento de 62 °C foi utilizada para as reações de amplificação com todos os pares de iniciadores apresentados na tabela, exceto para o par utilizado para a amplificação do gene DsChy3, onde foi utilizada uma temperatura de anelamento de 58 °C. Os produtos de amplificação obtidos por PCR convencional foram precipitados e sequenciados para a confirmação da especificidade dos iniciadores e da identidade do produto amplificado.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para a amplificação de transcritos em *D. saccharalis*

Genes	Direto (5'-3')	Reverso (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
DsChy 1	AAGGACCGAAGAAGATGCTG	TGTGATGACACGGGTATTGG	172
DsChy 2	AATGCGACCAAAACCAGAAG	TCCAACCTATTGCCTTACCG	86
DsChy 3	ACTGCGTTAAAGCTGCCATC	CAAACGGGCTGACCTCTATG	97
DsChy 4	TGAGATTATGGCGTTGCTTG	TCTTGGGATCAACCCTCTTG	137
DsChy 5	TTGGTTGTCCACCTCGATTG	TGGCTCAGTGCAGATCATTC	132
DsChy 6	AGATTGTCCAGCGATGTTCC	GGCTACCACGAGGATGTAGG	168
DsChy 7	AGCTGCAATGTCACTTCGTC	AGGGCATCCATTACCATGAG	162
DsChy 8	CCCCATCGTCAATAACCAAG	ACTCCACCGAACACATTTGC	84
DsChy 9	TGATGCGGATGAGCAGTTAG	AGAAGCGTTGAGAGGACAGC	134
DsTry 1	ATAACGCCAGTCCCACATTG	TTTCAATACAGCGACGGATG	80
DsTry 2	TGTCATGTTCCAGGGTCTTG	TCAACCAACCGTCTTCACTG	126
DsTry 3	GGATGTTAGCAGCACACGAC	TTGACCTGGCACTCCTATC	160
DsTry 5	TGTTTCGGTTGATCGTGAAG	GGAAGTGGAGACACCTCTCG	179
Ds18S	CAAATGTCTGCCTTATCAACTTT C	GCCTTCCTTGGATGTGGTAG	...
DsGAPDH	ATGATCCCTTCATCGGACTG	AAGACGGCAATTTTCTTTCC	130

Notas: Os iniciadores Ds18S foram desenvolvidos por Yang et al.(2011).

Sinal convencional utilizado:

... Dado numérico não disponível.

A eficiência de amplificação dos iniciadores foi determinada para cada corrida utilizando-se o programa LinReg (REMAKERS et al., 2003). As análises de

expressão relativa dos genes foram realizadas com o uso do programa *Relative Expression Software Tool 384* (REST 384[®]) (PFFAFL, 2001). Para o teste estatístico adotou-se o padrão de 2000 randomizações entre os valores de fluorescência (CTs: *cycle threshold*) dos controles e tratamentos de cada gene e teste t ($p < 0,05$). Os genes Ds18S e DsGAPDH foram utilizados como genes de referência para a normalização dos valores de expressão.

3.5 Estudos bioquímicos do efeito do IPS sobre as serino peptidases de *Diatraea saccharalis*

3.5.1 Preparação dos extratos proteicos e quantificação de proteínas

Lagartas de *D. saccharalis* no quinto ínstar do desenvolvimento foram, inicialmente, colocadas sobre uma camada de gelo por dois minutos para sua imobilização e dissecação dos intestinos a serem utilizados nos ensaios bioquímicos. O estudo das enzimas digestivas de lagartas no terceiro ínstar do desenvolvimento foi realizado a partir de extratos proteicos de indivíduos inteiros. Para a obtenção do extrato proteico, 20 intestinos ou indivíduos inteiros (de acordo com a fase de desenvolvimento estudada) foram homogeneizados com o auxílio de um Potter em 500 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em banho de gelo, para o rompimento dos tecidos. Os tecidos macerados foram, então, centrifugados a 12000xg, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado em um novo tubo e utilizado para os ensaios bioquímicos. As preparações dos extratos de fezes de *D. saccharalis* e dos extratos das dietas artificiais utilizadas na alimentação dos insetos foram realizados da mesma forma, adicionando-se ao material um volume mínimo de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 suficiente para a homogeneização e centrifugação do homogeneizado. A quantificação das proteínas foi realizada com o uso do Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.5.2 Efeito da ingestão de IPS sobre a atividade enzimática de *Diatraea saccharalis*

Os extratos proteicos utilizados nesses ensaios foram preparados a partir de lotes contendo 20 indivíduos para cada tratamento, com três repetições independentes. O efeito foi testado sobre lagartas no terceiro e no quinto ínstar do

desenvolvimento, submetidas à exposição aguda ou crônica ao IPS e seus respectivos controles.

A determinação da atividade tríptica foi obtida pela hidrólise do substrato (N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (ERLANGER et al., 1961). Inicialmente foi preparada uma solução estoque de BAPNA (100 mM) em DMSO, a qual foi diluída a uma solução de trabalho 1 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Em seguida, amostras de 20 µg do extrato proteico foram incubadas em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, por 10 minutos a 37 °C e 200 µL de BAPNA (1 mM) foram adicionados, completando o volume de reação para 280 µL. O ensaio decorreu durante 20 minutos a 37 °C.

Para a obtenção da atividade quimotríptica, foi utilizado o substrato cromogênico N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA) (DeIMAR et al. 1979), o qual foi diluído em uma solução 10% (v/v) de dimetilformamida em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, para concentração de 100 mM e, em seguida, diluído para a concentração de trabalho de 1 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Amostras de 30 µg de extrato proteico foram incubadas em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, por 10 minutos a 37 °C e, em seguida, 20 µL de SAPNA (1 mM) foram adicionados às amostras. A reação decorreu por 30 minutos a 37 °C.

A hidrólise dos substratos (BAPNA e SAPNA) foi determinada com base na leitura da absorbância a 410 nm, a qual foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática em nmoles de BAPNA hidrolisado/mL/min ou em nmoles de SAPNA hidrolisado/mL/min.

3.6 Estudos sobre estabilidade de inibidores de peptidases de soja após passagem pelo sistema digestório de lagartas de *D. saccharalis*

Com o objetivo de investigar a estabilidade do IPS após passagem pelo trato digestório de *D. saccharalis*, extratos protéicos de fezes desses insetos, alimentados em dieta artificial com ou sem IPS (0,5 % m/v) de forma crônica, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % contendo SDS. Esses extratos também foram utilizados como fonte de inibidores de peptidases em ensaios de atividade tríptica remanescente.

O gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi preparado de acordo com o método desenvolvido por Laemmli (1970). O gel de corrida ou gel de separação foi preparado na concentração de 12,5 % de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,8 contendo 0,1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) (m/v); 0,025

% (m/v) de persulfato de amônio (PSA) (100 mg/mL) e 0,05 % (v/v) de TEMED. Após polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel de empilhamento na concentração de 5 % de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8 contendo 0,1 % (m/v) de SDS; 0,05 % (m/v) de PSA e 0,15 % (v/v) de TEMED. Finalizada a polimerização do gel de empilhamento, o sistema de eletroforese MiniPROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) foi montado e 5 µg de proteína do extrato de fezes foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 75 mM, pH 6,8; 1,5 % (m/v) SDS; 25 % (v/v) glicerol e 0,05 % (m/v) azul de bromofenol), acrescidas de 10 % (v/v) de β-mercaptoetanol e aquecidas a 90 °C por 1 minuto antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-HCl 25 mM contendo 0,25 mM de glicina e 0,1 % (m/v) de SDS à temperatura ambiente por duas horas a 200 volts. Após a corrida, o gel foi revelado com o uso do Silver Stain Plus Kit® (Bio-Rad) de acordo com as orientações do fabricante e a imagem digitalizada. A estimativa da massa molecular das bandas foi realizada por comparação com o padrão de massa molecular de proteínas *Page Ruler Unstained Low Range Protein Ladder* (Thermo Scientific).

Com a finalidade de investigar se o IPS eliminado nas fezes apresentava, ainda, algum efeito inibitório sobre as tripsinas, foi realizado um ensaio de inibição no qual 5 µg de extrato proteico de fezes de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas ou não com IPS, foram utilizados como fonte de inibidor sobre a tripsina bovina. Inicialmente, o extrato de fezes foi incubado por 15 minutos a 37 °C com 10 µL de tripsina bovina (1 mg/mL em HCl 0,0025 M) diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (1:10). Após essa incubação, foram adicionados 200 µL do substrato BApNA (1 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) às amostras, seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos. Foi medida a absorbância a 410 nm e a atividade inibitória foi estimada pela comparação das amostras incubadas com extrato de fezes em relação à atividade da tripsina bovina sem extrato de fezes.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da atividade inibitória do concentrado de IPS

A diminuição nos valores de atividade triptica remanescente decorrente do aumento progressivo nas doses de IPS confirma a atividade inibitória do concentrado utilizado nos experimentos realizados. Conforme pode ser observado na Figura 2, a dose de 1,0 μg de proteína do concentrado de IPS já foi suficiente para inibir mais de 95 % da atividade triptica, enquanto que o uso de doses maiores (1,5 μg e 2,0 μg) não resultou em uma maior eficiência na inibição da tripsina bovina.

Figura 2 – Atividade proteolítica remanescente da tripsina bovina em relação a diferentes doses de proteína do concentrado de IPS

A concentração de 0,5 % (m/v) do concentrado de IPS utilizada para a criação das lagartas em dieta artificial nesse trabalho foi baseada em resultados prévios obtidos por Pompermayer (2000), onde o efeito de diferentes doses de concentrado de IPS foi testado sobre diversos parâmetros fisiológicos relacionados ao desenvolvimento desse inseto. Segundo esses experimentos, a concentração de 0,5 % (m/v) de IPS afetou, significativamente, o crescimento e o desenvolvimento de lagartas de *D. saccharalis*, causando aumento no número de ínstar e alongamento das fases larval e pupal.

4.2 Transcriptoma intestinal de *D. saccharalis*

A busca por sequências correspondentes a serino peptidases no transcriptoma de *D. saccharalis* possibilitou a identificação de 13 sequências completas, dentre as quais nove foram classificadas como prováveis quimotripsinas (Figura 3) e quatro como prováveis tripsinas (Figura 4).

Figura 3 - Alinhamento das sequências de quimotripsinas de *D. saccharalis* com a quimotripsina bovina (PDB: 1YPH). Asteriscos pretos indicam as posições dos aminoácidos participantes da tríade catalítica, enquanto o asterisco cinza indica a posição 189. DsChy1...DsChy9: genes de quimotripsinas enumerados em ordem crescente

Figura 4 - Alinhamento das sequências de tripsinas de *D. saccharalis* com a tripsina bovina (PDB: 418H). Asteriscos pretos indicam as posições dos aminoácidos participantes da tríade catalítica, enquanto o asterisco cinza indica a posição 189. DsTry1...DsTry5: genes de tripsinas enumerados em ordem crescente

O critério utilizado para a classificação de sequências como prováveis tripsinas e de quimotripsinas, corroborou com a proposição filogenética realizada para essas sequências. A Figura 5 mostra que sequências de tripsinas e quimotripsinas foram agrupadas em clados distintos de acordo com o critério utilizado, o qual foi baseado no aminoácido da posição 189 com relação à tripsina e quimotripsina bovianas. Entre as quimotripsinas, dois clados foram formados, um deles representado pela DsChy9 e o outro contendo as demais quimotripsinas.

Figura 5 – Proposição filogenética para tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis*. Os números juntos aos nós representam a probabilidade posterior dos ramos

4.3 Efeito agudo da ingestão de IPS sobre a expressão de serino peptidases de *Diatraea saccharalis*

A expressão gênica de tripsinas e quimotripsinas de lagartas alimentadas com dieta controle foi comparada com a de lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5 % (m/v) de IPS por 24 e 48 horas. Esse efeito foi estudado em dois momentos do desenvolvimento larval, correspondendo ao terceiro e ao quinto ínstar por representarem momentos onde há uma intensificação do consumo alimentar (terceiro instar) e seu ponto máximo (quinto instar), consequentemente, uma maior demanda pela produção de enzimas digestivas.

Os resultados da expressão relativa de tripsinas de lagartas no terceiro ínstar expostas à dieta contendo IPS por 24 e 48 horas revelaram uma pequena queda na expressão da tripsina 2 (DsTry2) quando as lagartas se alimentaram de dieta contendo IPS. Para as outras tripsinas a diferença não foi significativa em relação a insetos controles (Figura 6). Entre os genes de quimotripsinas, podemos observar que a ingestão aguda de IPS por 24 horas promoveu um aumento da expressão da DsChy2 e uma diminuição da DsChy7. A exposição aguda ao IPS por 48 horas promoveu o aumento das quimotripsinas DsChy1 e DsChy7 (Figura 7).

Figura 6 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). Nas barras sem asteriscos não houve diferença significativa entre os valores de expressão dos dois tratamentos

Figura 7 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). Nas barras sem asterisco não houve diferença significativa entre os valores de expressão dos dois tratamentos

Lagartas no quinto ínstar alimentadas com dieta controle e com dieta contendo o concentrado de IPS por 24 e 48 horas não apresentaram diferença significativa na expressão de genes de tripsinas em função do IPS (Figura 8).

Figura 8 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes

Com relação às quimotripsinas, apenas a quimotripsina 4 (DsChy4) apresentou uma discreta diminuição na expressão com relação ao controle após 24 horas de ingestão aguda de dieta com concentrado de IPS e a quimotripsina 1 (DsChy1) apresentou uma pequena redução na expressão em lagartas alimentadas em dieta contendo concentrado de IPS por 48 horas (Figura 9).

Figura 9 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão aguda de dieta contendo 0,5% (m/v) de concentrado de IPS por 24 e 48 horas. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). Nas barras sem asterisco não houve diferença significativa entre os valores de expressão dos dois tratamentos

4.4 Efeito crônico da ingestão de IPS sobre a expressão de serino peptidases de *Diatraea saccharalis*.

Lagartas no terceiro e no quinto ínstares do desenvolvimento larval foram testadas quanto ao efeito da ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) do concentrado ativo de IPS sobre a expressão de tripsinas e quimotripsinas.

As Figuras 10 e 11 apresentam os resultados da expressão relativa de tripsinas e quimotripsinas em resposta à ingestão crônica de IPS por lagartas no terceiro ínstar do desenvolvimento, respectivamente. Conforme pode ser observado, nenhum dos genes de tripsinas apresentou diferença significativa no padrão de expressão em resposta à ingestão de IPS nessa fase do desenvolvimento larval (Figura 10).

Figura 10 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes

Diante da ingestão crônica de dieta contendo IPS, apenas três dos nove genes de quimotripsinas estudados, identificados como DsChy1, DsChy3 e DsChy7, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de expressão relativa em lagartas no terceiro ínstar do desenvolvimento (Figura 11).

Figura 11 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de terceiro ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam resultados significativos ($p \leq 0,05$). Nas barras sem asteriscos não houve diferença significativa entre os valores de expressão dos dois tratamentos

A expressão gênica de tripsinas de lagartas do quinto ínstar alimentadas de forma crônica em dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS também não resultou em diferença significativa com relação a lagartas alimentadas em dieta controle (Figura 12), reproduzindo o que já havia sido observado para lagartas no terceiro ínstar (Figura 10).

Figura 12 - Expressão relativa dos genes de tripsinas de larvas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes

Com relação aos genes de quimotripsinas, apenas o DsChy7 apresentou diferença significativa nos valores de expressão em relação ao controle ($p \leq 0,05$) em lagartas do quinto instar (Figura 13).

Nos diferentes tratamentos realizados para os estudos de expressão gênica de tripsinas e quimotripsinas, é importante observar que as diferenças significativas entre insetos controle e alimentados com dietas contendo IPS, quando presentes, foram discretas, sempre menores que 2,0. Essa observação quando considerada em conjunto com a metodologia utilizada (RT-PCR quantitativo), a qual apresenta um elevado grau de sensibilidade, sugere que os efeitos observados possam ter ocorrido por algum artefato técnico e não necessariamente por uma resposta do inseto ao estresse ocasionado pela presença do IPS na dieta.

Figura 13 - Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar alimentadas com dieta controle, comparada com lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS. As barras de erros correspondem ao desvio médio de três experimentos independentes. O asterisco indica resultados significativos ($p \leq 0,05$). Nas barras sem asterisco não houve diferença significativa entre os valores de expressão dos dois tratamentos

4.5 Proposição filogenética conjunta para tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.

Com base nas sequências de tripsinas e quimotripsinas identificadas nesse estudo para *D. saccharalis* e nas identificadas por Souza (2013) para *S. frugiperda*, foram obtidas duas proposições filogenéticas: Uma para tripsinas e outra para quimotripsinas das duas espécies (Figuras 14 e 15, respectivamente). O objetivo dessas análises foi comparar as sequências das duas espécies com base nos resultados obtidos por Souza (2013) em relação à responsividade da expressão desses genes frente à ingestão de IPS, sendo considerados responsivos ao IPS os genes que tiveram um aumento significativo na expressão em função da ingestão desses inibidores. De acordo com a filogenia obtida, é possível observar que as tripsinas de *D. saccharalis* se agruparam com as tripsinas não responsivas ao IPS de *S. frugiperda* (Figura 14).

Figura 14 – Proposição filogenética para tripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*. Os números junto aos nós representam a probabilidade posterior dos ramos. SfTry1...SfTry12 = tripsinas de *S. frugiperda*. DsTry1...DsTry5 = tripsinas de *D. saccharalis*. Os asteriscos indicam as tripsinas de *S. frugiperda* não responsivas à ingestão de IPS de acordo com Souza (2013), as demais foram responsivas.

O mesmo tipo de análise foi realizado utilizando as quimotripsinas identificadas nas duas espécies. Foi observado que houve uma tendência das quimotripsinas de *D. saccharalis* se agruparem com as quimotripsinas de *S. frugiperda* determinadas como não responsivas ao IPS por Souza (2013) (Figura 15), porém algumas quimotripsinas de *D. saccharalis* foram agrupadas com quimotripsinas de *S. frugiperda* (SfChy2 e SfChy15) que foram responsivas ao IPS. Analisando o trabalho de Souza (2013), entretanto, podemos observar que as quimotripsinas 2 e 15 de *S. frugiperda* foram responsivas apenas quando houve a ingestão aguda de IPS, devido ao mecanismo de disparo generalizado da expressão de serino-peptidases denominado “shotgun” (BRIOSCHI et al., 2007), sendo não responsivas quando o IPS foi ingerido de forma crônica. Apenas a quimotripsina 4 de *D. saccharalis* foi agrupada com as quimotripsinas responsivas ao IPS de *S. frugiperda* (SfChy4, SfChy5, SfChy8, SfChy9, SfChy11, SfChy12, SfChy17, SfChy21 e SfChy22).

Figura 15 – Proposição filogenética para quimotripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*. Os números junto aos nós representam a probabilidade posterior dos ramos. SfChy1...SfChy23 = quimotripsinas de *S. frugiperda*. DsChy1...DsChy9 = quimotripsinas de *D. saccharalis*. Os asteriscos indicam as quimotripsinas de *S. frugiperda* não responsivas à ingestão de IPS de acordo com Souza (2013), as demais foram responsivas.

4.6 Efeito do IPS sobre a atividade de tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis*

A ingestão aguda de dieta contendo 0,5 % de IPS (m/v) por 48 horas não afetou a atividade trípica intestinal de lagartas de *D. saccharalis* no terceiro ínstar do desenvolvimento. Lagartas no quinto ínstar apresentaram, entretanto, uma redução na atividade trípica quando foram alimentadas com dieta contendo o inibidor de peptidases (Figura 16).

Figura 16 – Efeito da ingestão aguda (48 horas) do concentrado de IPS sobre a atividade trípica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*. Controle: lagartas alimentadas com dieta sem IPS; IPS: lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5% de IPS (m/v) por 48 horas. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,001$) dos valores quando comparados dentro de cada fase do desenvolvimento (3º ou 5º ínstar) pelo teste de Tukey (ANOVA)

Os resultados da atividade trípica intestinal de lagartas que se alimentaram de dieta contendo 0,5 % (m/v) de concentrado de IPS, desde a eclosão até a fase de desenvolvimento estudada (ingestão crônica), foram iguais aos obtidos por lagartas que se alimentaram de dieta controle, independente da fase do desenvolvimento estudada (terceiro ou quinto ínstar) (Figura 17).

Figura 17 – Efeito da ingestão crônica do concentrado de IPS sobre a atividade trípica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*. Controle: lagartas alimentadas com dieta sem IPS; IPS: lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5% de IPS (m/v) de maneira crônica. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,001$) dos valores quando comparados dentro de cada fase do desenvolvimento (3º ou 5º ínstar) pelo teste de Tukey (ANOVA)

A atividade das quimotripsinas presentes nos extratos proteicos de lagartas de *D. saccharalis* foi baixa. A ingestão aguda de dieta contendo IPS por 48 horas não resultou em diferença significativa na atividade das enzimas do tipo quimotripsinas em lagartas de *D. saccharalis* quando comparada com lagartas controle nas duas fases do desenvolvimento analisadas (Figura 18).

Não foi possível observar diferença significativa entre lagartas submetidas à ingestão crônica de dieta contendo IPS com relação à dieta controle no terceiro ínstar do desenvolvimento, entretanto, uma pequena inibição da atividade quimotríptica, foi observada quando lagartas no quinto ínstar foram alimentadas de forma crônica com dieta contendo IPS (Figura 19). A não detecção de diferença significativa na atividade de quimotripsinas em lagartas do terceiro ínstar pode ter ocorrido devido aos valores obtidos terem sido muito baixos, possivelmente muito próximos do limite de detecção do equipamento, o que pode ter mascarado os resultados. Já no quinto instar, essa diferença provavelmente pôde ser visualizada porque a atividade de serino peptidases aumenta ao longo do desenvolvimento larval, havendo portanto valores de atividade mais facilmente mensuráveis.

Figura 18 - Efeito da ingestão aguda (48 horas) de IPS sobre a atividade quimotríptica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*. Controle: lagartas alimentadas com dieta sem IPS; IPS: lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5 % de IPS (m/v) por 48 horas. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,001$) dos valores quando comparados dentro de cada fase do desenvolvimento (3º ou 5º ínstar) pelo teste de Tukey (ANOVA)

Figura 19 - Efeito da ingestão crônica de IPS sobre a atividade quimotríptica intestinal de lagartas de *D. saccharalis*. Controle: lagartas alimentadas com dieta sem IPS; IPS: lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5% (m/v) de IPS. Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,001$) dos valores quando comparados dentro de cada fase do desenvolvimento (3º ou 5º instar) pelo teste de Tukey (ANOVA)

4.7 Efeito da ação de enzimas digestivas de *D. saccharalis* sobre os inibidores de peptidases de soja

Conforme reportado na literatura (GIRI et al., 1998), um dos mecanismos de defesa utilizado pelos insetos para subverter os efeitos antinutricionais ocasionados pela ingestão de inibidores de peptidases produzidos pelas plantas é a produção de enzimas capazes de se ligar aos inibidores, promovendo sua hidrólise e inativação. Visando compreender se *D. saccharalis* faz uso desse tipo de mecanismo como estratégia de defesa, foi preparado um gel de poliácridamida (PAGE-SDS) para visualizar as proteínas referentes aos inibidores ingeridos pela lagarta desde sua integridade antes da ingestão, em amostras de dieta, até a passagem pelo intestino médio, terminando com a análise dessas proteínas nas fezes das lagartas (Figura 20).

Figura 20 – Eletroforese em PAGE-SDS para a visualização do IPS na dieta, no extrato de intestino médio e nas fezes de lagartas de *D.saccharalis* no quinto ínstar do desenvolvimento. M=marcador de massa molecular; D-C = dieta controle; D-IPS = dieta contendo 0,5 % (m/v) de IPS; IM-C = intestino médio de lagartas no quinto ínstar alimentadas com dieta controle; IM-IPS = intestino médio de lagartas no quinto ínstar alimentadas em dieta contendo 0,5 % (m/v) de IPS de forma crônica; F-C = fezes de lagartas alimentadas com dieta controle; F-IPS: fezes de lagartas alimentadas em dieta contendo 0,5 % (m/v) de IPS; K= Inibidor Kunitz comercial; IPS: concentrado ativo de IPS utilizado nos ensaios de alimentação; Números verticais indicam a massa (kDa) das bandas do marcador. As setas indicam as proteínas predominantes no concentrado de IPS

A análise do padrão de bandas obtido na amostra do concentrado ativo de IPS utilizado para a alimentação das lagartas nos experimentos permitiu a identificação de duas bandas principais, apontadas pelas setas, com massas de, aproximadamente, 20 kDa e 30 kDa. Entre essas bandas, a menor (20 kDa) corresponde, em tamanho, com a banda do inibidor do tipo Kunitz purificado (Sigma/Aldrich), que apresenta massa molecular em torno de 21 kDa, o que nos sugere que essa banda observada na amostra do concentrado ativo de IPS corresponda a esse inibidor, presente nas sementes de soja. As duas bandas visualizadas de forma mais intensa na amostra de concentrado ativo de IPS foram detectadas tanto na dieta contendo IPS quanto nas fezes das lagartas alimentadas com essa dieta contendo o inibidor.

A banda supostamente correspondente ao inibidor de peptidases do tipo Kunitz foi observada na amostra de fezes de lagartas alimentadas com dieta contendo IPS. Entretanto, para determinar se esse inibidor apresentava ainda algum potencial anti-tríptico após sua passagem pelo trato digestório da lagarta, o extrato de fezes foi utilizado como fonte de inibidor de peptidases em um ensaio de

atividade triptica remanescente. A Figura 21 apresenta o gráfico de atividade triptica remanescente de amostras de tripsina bovina incubadas com 5 μ g de proteína de extrato de fezes de lagartas alimentadas com dieta controle e com dieta contendo concentrado de IPS 0,5% (m/v). Os valores obtidos foram relativos à atividade da tripsina bovina incubada sem o extrato proteico de fezes, considerada como zero de inibição. Uma inibição da atividade triptica (29,8%) foi observada, mesmo nas amostras de fezes de lagartas alimentadas com dieta controle. Entretanto, essa inibição foi acentuadamente maior (89%) quando a incubação da tripsina foi realizada na presença de extrato de fezes de lagartas alimentadas com dieta contendo IPS.

A análise dos dados revela o potencial inibitório do IPS, mesmo após sua passagem pelo sistema digestório de lagartas de *D. saccharalis*.

Figura 21 - Ensaio de inibição *in vitro* da atividade da tripsina bovina em função da presença de extrato de fezes de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta controle e com dieta contendo 0,5% (m/v) de IPS. Cada valor representa a média $\pm$ SD de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,001$) dos valores quando comparados entre si pelo teste de Tukey (ANOVA)

5 DISCUSSÃO

5.1 Identificação de sequências de serino peptidases em *D. saccharalis* e sua relação com o comportamento alimentar.

Devido à baixa disponibilidade de sequências de *D. saccharalis* nos bancos de dados genômicos, esse trabalho iniciou-se com a montagem de um transcriptoma obtido a partir de intestinos de lagartas no quinto ínstar do desenvolvimento, alimentadas com dieta contendo IPS, de modo a induzir a expressão de transcritos de serino peptidases digestivas. No total, foram identificadas 13 sequências completas de serino peptidases, sendo nove delas de quimotripsinas e quatro de tripsinas (Figuras 3 e 4 respectivamente). Esse número foi bem inferior ao observado para *Spodoptera frugiperda*, onde nove genes para tripsinas e 14 genes para quimotripsinas foram identificados (SOUZA, 2013) e, também, para *Ostrinia nubialis*, onde foram identificados 12 genes para tripsinas e 12 para quimotripsinas (YAO et al., 2012). Para se alimentarem de uma ampla diversidade de plantas, os insetos devem ser capazes de se tornarem insensíveis aos principais produtos tóxicos produzidos por seus hospedeiros. Insetos com hábito alimentar restrito, como é o caso de *D. saccharalis* precisam se especializar na detoxificação de compostos vegetais específicos das espécies das quais se alimenta, o que pode resultar na expressão constitutiva de um pequeno número de genes para esse fim (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004). Essa suposição está de acordo com o fato de ter sido identificado em *D. saccharalis* um conjunto menor de enzimas do tipo serino peptidases em relação ao encontrado nos intestinos de *S. frugiperda* e de *O. nubialis*.

Nesse trabalho, o número de transcritos encontrado para quimotripsinas foi maior do que o encontrado para tripsinas em *D. saccharalis*. Esse resultado também foi obtido em estudos dessa natureza realizados com *S. frugiperda* (BRIOSCHI et al., 2007; SOUZA, 2013). Conforme já citado, o estudo das serino peptidases intestinais de *Ostrinia nubialis* resultaram em uma mesma proporção de genes referentes a tripsinas e a quimotripsinas (YAO et al., 2012), os quais foram estudados quanto à sua resposta à toxina Cry 1Ab.

5.2 Efeito da ingestão aguda e crônica dos inibidores de peptidases de soja na expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis*.

Inibidores de peptidases podem atuar como mecanismos de defesa das plantas em resposta ao ataque de insetos fitófagos (GREEN; RYAN, 1972; JAMAL et al., 2013; STEFFENS; FOX; KASSEL, 1978). Essa atuação ocorre pela ligação desses inibidores às peptidases digestivas dos insetos, impedindo sua atuação na digestão dos alimentos e, conseqüentemente, prejudicando a utilização dos aminoácidos presentes na dieta. Esse efeito pode causar diversos distúrbios fisiológicos nos insetos, prejudicando seu desenvolvimento e, muitas vezes, causando sua morte (CRUZ et al., 2013; DUNSE et al., 2010b; JOHNSON et al., 1989; PAULILLO et al., 2012; XU et al., 1996). Assim como as plantas utilizam esse recurso como um dos seus mecanismos de defesa, alguns insetos também desenvolveram estratégias fisiológicas para minimizar os efeitos antinutricionais dos inibidores de peptidases. O aumento na expressão de genes de serino peptidases como tripsinas e quimotripsinas e a produção de enzimas insensíveis aos inibidores de peptidases são amplamente documentados como possíveis adaptações aos IPs para diversas espécies de insetos (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004; BRIOSCHI et al., 2007; BROADWAY, 1997; HIVRALE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA, 2013).

Estudos sobre os efeitos da ingestão de IPS no desenvolvimento de *D. saccharalis* demonstraram que essa praga é sensível a esses inibidores (POMPERMAYER et al., 2001), dando margem a uma investigação molecular sobre a expressão das serino peptidases desse inseto quando os mesmos são desafiados pela presença de IPS na dieta. BRIOSCHI e colaboradores (2007) demonstraram que a ingestão aguda de IPS por *S. frugiperda* durante 48 horas foi suficiente para induzir um aumento generalizado na expressão de vários genes relacionados à síntese de peptidases digestivas, denominando esse efeito de “shotgun”. No presente trabalho, as mesmas condições foram empregadas para o estudo do efeito agudo da ingestão de IPS sobre a expressão das peptidases digestivas de *D. saccharalis*. Devido à provável variação temporal na expressão gênica em resposta à ingestão de IPS, a expressão gênica de tripsinas e quimotripsinas também foi estudada após a ingestão aguda de IPS por 24 horas. Bown, Wilkinson e Gatehouse (2004) estudaram o efeito temporal da ingestão de inibidor de Kunitz de soja (SKTI) na expressão de genes de proteases em *Helicoverpa armigera* (Hübner) e

identificaram diversas etapas na regulação da expressão desses genes. Segundo esses autores, inicialmente ocorre um aumento generalizado na expressão de todos os genes de proteases (até 12 horas de ingestão do SKTI), seguida de uma regulação ocasionada pela diminuição da expressão de genes de peptidases sensíveis ao inibidor e um aumento das insensíveis, as quais continuaram aumentando com 24 horas de ingestão do inibidor.

Esses estágios não foram observados para a expressão dos genes de tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis*. Os aumentos de expressão detectados nos experimentos de ingestão aguda de IPS foram pouco expressivos e envolveram poucos genes, no máximo dois por tratamento, entre os 13 genes analisados (Figura 7), o que não caracteriza um aumento generalizado da expressão gênica, conforme reportado por Bown, Wilkinson e Gatehouse (2004) e por Brioschi et al., (2007).

Visando ampliar um pouco mais o efeito temporal e acumulativo da ingestão de IPS sobre a expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas em *D. saccharalis*, esse estudo também foi realizado em lagartas submetidas à ingestão de IPS na dieta desde a sua eclosão, o que foi denominado de efeito crônico da ingestão de IPS. Os resultados obtidos tanto para a ingestão aguda quanto para a ingestão crônica do concentrado ativo de IPS por *D. saccharalis* sugerem que esse inseto não é capaz de modular a expressão dos genes de tripsinas e quimotripsinas identificados nesse estudo frente à ingestão de 0,5% (m/v) de concentrado de IPS na dieta. Embora a expressão relativa de alguns genes de tripsinas e quimotripsinas tenham apresentado uma discreta alteração na presença de IPS na dieta (Figuras 6, 7, 9, 11 e 13), em todos os casos esses valores ficaram próximos de 1,0. Estudos similares realizados para outras espécies de lepidópteros, onde os inibidores de peptidases foram capazes de desencadear uma resposta diferencial na expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas, reportam valores de expressão relativa superiores aos encontrados nesse trabalho (BOWN; WILKINSON, GATEHOUSE, 1997; BRIOSCHI et al., 2007; NADALINI, 2007; PETEK et al., 2012; SOUZA, 2013). Esse fato, aliado à altíssima sensibilidade da técnica de RT-PCR quantitativo, que foi a metodologia empregada para esse estudo, traz a possibilidade de que as pequenas diferenças observadas nesse estudo sejam artefatos técnicos e não uma resposta fisiológica real referente a um mecanismo adaptativo desse inseto à ingestão de inibidores de peptidases de soja. Além do tipo de exposição das lagartas ao IPS, esse estudo considerou, também, o possível efeito da fase do

desenvolvimento larval na resposta do inseto. A realização dessas análises de expressão no terceiro e no quinto ínstaes do desenvolvimento larval permitiu avaliar se a ausência de resposta na expressão gênica poderia ser um evento pontual relacionado à fase do desenvolvimento larval escolhida para esse estudo. Novamente, os resultados suportaram as observações já realizadas de que a ingestão de IPS não induziu a expressão gênica diferencial de enzimas digestivas em *D. saccharalis*.

Os estudos dessa natureza já realizados, em geral, utilizaram espécies que apresentam alguma capacidade de adaptação fisiológica à presença de inibidores de peptidases na dieta. Nesse trabalho, a resposta de genes de serino peptidases foi estudada em uma espécie na qual os efeitos fisiológicos ocasionados pela ingestão de inibidores de peptidases foram bem evidentes. Uma vez que a modulação da expressão gênica de enzimas digestivas atua como um mecanismo adaptativo dos insetos fitófagos à presença de inibidores de peptidases na dieta, os dados de expressão gênica obtidos nesse estudo são coerentes com a hipótese de que *D. saccharalis* não faz uso desse mecanismo, justificando sua dificuldade de adaptação aos inibidores de peptidases de soja. A ausência de expressão diferencial dos genes de tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* em resposta ao IPS pode estar relacionada à falta de algum mensageiro secundário relacionado à ativação da cascata de sinalização desses genes. Essa possibilidade está de acordo com o mecanismo regulatório proposto por Broadway (1997), no qual a ativação da síntese e o monitoramento das tripsinas sensíveis e insensíveis aos inibidores de peptidases é realizada por fatores peptídicos distintos e específicos para essas categorias de enzimas. Embora alguns autores tenham proposto mecanismos visando explicar a ativação de genes relacionados a essas enzimas digestivas, é importante frisar que o mecanismo molecular exato pelo qual os insetos identificam e reagem à presença de inibidores de peptidases ainda não foi desvendado (SPIT et al., 2014).

5.3 Efeitos da ingestão aguda e crônica de inibidores de peptidases de soja sobre a atividade de enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas em *D. saccharalis*

Já foi determinado que os maiores danos ocasionados pelo ataque de lepidópteros às plantas ocorrem durante a fase larval do inseto, devido à intensa ingestão de alimentos. Consequentemente, uma maior atividade digestiva é

necessária durante essa fase da vida. As lagartas de *D. saccharalis* inicialmente se alimentam do colmo da cana de açúcar e só após a primeira ecdise conseguem perfurá-lo para se alimentarem do seu interior, cavando galerias (GALLO, et al., 2002). O quinto ínstar do desenvolvimento larval de *D. saccharalis* foi escolhido para os estudos de atividade enzimática e de expressão gênica por representarem, possivelmente, o momento de maior atividade enzimática desse inseto. Em condições artificiais de criação, são observados seis ínstaes durante a fase larval de *D. saccharalis*, entretanto, já no sexto ínstar a atividade metabólica começa a diminuir para que o inseto inicie a fase de pupa. O terceiro ínstar foi escolhido como um ponto adicional para esse estudo por ser uma fase onde há intensificação da atividade alimentar e, conseqüentemente, aumento na produção das enzimas relacionadas à digestão dos alimentos. A comparação da atividade das tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* nas duas fases do desenvolvimento estudadas reforça essa afirmativa (Figuras 16, 17, 18 e 19). Além disso, seria oportuno averiguar uma possível regulação temporal da expressão dos genes que codificam as peptidases.

Estudos *in vitro* demonstraram que os inibidores de peptidases de soja são capazes de inibir a atividade de tripsinas presentes no intestino de *D. saccharalis* (POMPERMAYER et al., 2003). No presente trabalho, o potencial inibitório do IPS sobre a atividade trípica e quimotríptica do conteúdo intestinal de *D. saccharalis* foi estudado *in vivo*. A atividade enzimática *in vivo* pode diferir da observada *in vitro* por envolver diversos fatores que contribuem para uma maior complexidade das interações enzimáticas no ambiente digestório do inseto. Nesse estudo, lagartas no terceiro ínstar do desenvolvimento mantiveram o nível de atividade trípica intestinal mesmo após a ingestão crônica ou aguda de dieta contendo IPS (Figuras 16 e 17). A ingestão aguda de IPS por lagartas do quinto ínstar causou uma pequena inibição da atividade das tripsinas presentes no intestino, o que era esperado em função dos efeitos fisiológicos já citados em resposta à ingestão dos inibidores de peptidases (Figura 16). Entretanto, quando a ingestão de IPS ocorreu de forma crônica, o efeito inibitório não foi observado e a atividade enzimática se igualou à de lagartas alimentadas com dieta controle (Figura 17). Diante desse resultado, é possível supor que a exposição das lagartas aos inibidores de peptidases de soja por um período mais prolongado de tempo (ingestão crônica), tenha promovido alguma resposta

pós-transcricional ou pós-traducional como tentativa de contornar os efeitos negativos da ingestão do concentrado de IPS.

Nos experimentos realizados, foi observada uma discreta inibição na atividade das quimotripsinas em lagartas do quinto instar alimentadas de forma crônica com dieta contendo IPS (Figura 19), entretanto, nos demais tratamentos essa atividade foi igual à de lagartas alimentadas com dieta controle (Figuras 18 e 19). O fato da atividade das quimotripsinas ter sido diminuída apenas na ingestão crônica de IPS dá margem para a realização de estudos complementares visando confirmar se há um sinergismo na atuação dessas enzimas, no qual o aumento inicial da atividade de quimotripsinas em resposta à ingestão de IPS é complementado, posteriormente, pelo aumento da atividade de tripsinas. A obtenção de valores muito baixos de atividade de enzimas do tipo quimotripsinas, próximos ao limite de detecção do equipamento utilizado para essa medição, pode ter mascarado algum possível efeito em lagartas de terceiro instar. Christeller e colaboradores (1992) estudaram a atividade de algumas peptidases no intestino de 12 espécies de lepidópteros pertencentes a cinco famílias diferentes. Os dados obtidos indicaram que a atividade de quimotripsinas em lepidópteros geralmente é baixa, o que pode justificar os baixos níveis de atividade quimotríptica encontrados nesse trabalho.

5.4 Filogenia comparativa entre as serino peptidases de *D. saccharalis* e de *S. frugiperda* com relação à expressão diferencial pela ingestão de IPS

Recentemente, Souza (2013) demonstrou haver correlação entre a filogenia das tripsinas expressas em *S. frugiperda* e a sensibilidade diferencial ao IPS, onde as tripsinas não responsivas formaram clados distintos das tripsinas responsivas. Uma vez que as tripsinas expressas por *D. saccharalis* não foram responsivas ao IPS, uma nova proposição filogenética incluindo sequências dessas duas espécies foi elaborada. Os resultados demonstram que as sequências de *D. saccharalis* formaram um grupo com sequências de tripsinas não responsivas em *S. frugiperda* (Figura 14). O mesmo estudo foi realizado utilizando as sequências de quimotripsinas e, novamente, houve uma tendência das quimotripsinas de *D. saccharalis* se agruparem com quimotripsinas de *S. frugiperda* não responsivas ao IPS. Oito das nove quimotripsinas identificadas em *D. saccharalis* se agruparam com quatro quimotripsinas de *S. frugiperda*, duas sensíveis e duas insensíveis ao IPS. No entanto, no outro ramo, ficaram agrupadas a maioria das quimotripsinas insensíveis

de *S. frugiperda* e apenas a quimotripsina 4 de *D. saccharalis* ficou incluída nesse grupo (Figura 15). Essa proposição filogenética mista entre *D. saccharalis* e *S. frugiperda* e sua relação com a resposta transcricional das duas espécies com relação à ingestão de IPS reforça a proposta de que as serino peptidases de *D. saccharalis* não são responsivas ao IPS.

5.5 Efeito da ação de enzimas digestivas de *D. saccharalis* sobre os inibidores de peptidases de soja

A hidrólise de moléculas de inibidores de peptidases de plantas por enzimas digestivas de insetos é reportada como um dos mecanismos desenvolvidos pelos insetos para minimizar os efeitos nocivos da ingestão de inibidores de peptidases (GIRARD et al., 1998; GIRI et al., 1998). Com o objetivo de investigar se *D. saccharalis* seria capaz de promover a proteólise dos inibidores de peptidases de soja como mecanismo de defesa pela ação das enzimas presentes no seu trato digestório, foram utilizadas duas abordagens, a análise da integridade das proteínas presentes no concentrado ativo de IPS utilizado para a alimentação das lagartas nesse estudo por PAGE-SDS e, também, a estimativa da atividade inibitória dessas moléculas com relação à tripsina bovina. Após a separação das proteínas por PAGE-SDS foi possível visualizar duas bandas principais no concentrado ativo de inibidores de peptidases de soja, com massas moleculares de, aproximadamente, 20 kDa e 30 kDa. A proteína de 20 kDa correspondeu em tamanho com o inibidor do tipo Kunitz de soja purificado, o qual tem massa molecular de 21 kDa, o que sugere tratar-se, possivelmente, desse inibidor (Figura 20). Essa mesma banda de 20 kDa aparece de forma mais intensa na amostra de dieta contendo 0,5% (m/v) de concentrado ativo de IPS e no extrato de fezes de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com essa dieta, o que reforça a possibilidade de tratar-se do inibidor de soja tipo Kunitz. A visualização dessa banda não foi clara nas amostras de extrato digestivo de *D. saccharalis* possivelmente devido a interações proteicas nesse ambiente, podendo causar alterações no tamanho das moléculas visualizadas. Considerando a identidade da proteína de 20 kDa como sendo a do inibidor Kunitz da soja, é possível inferir que, pelo menos, parte desse inibidor não foi degradado durante seu percurso pelo trato digestório de *D. saccharalis*. Para determinar se as moléculas de inibidor eliminadas nas fezes apresentavam alguma atividade inibitória sobre a tripsina bovina, foi realizado ensaio utilizado o extrato de fezes de lagartas

alimentadas com dieta controle e com dieta contendo IPS como fontes de inibidores em um ensaio de atividade trípica remanescente. Os dados obtidos revelaram que o extrato de fezes de lagartas alimentadas com dieta contendo IPS foi mais eficiente em inibir a tripsina bovina do que o extrato de fezes de lagartas alimentadas com dieta controle (Figura 21). Esses resultados sugerem que *D. saccharalis* não é capaz de promover a proteólise eficiente de moléculas de inibidores de peptidases de soja como mecanismo de adaptação, o que era esperado em virtude dos efeitos fisiológicos nocivos reportados pela ingestão do IPS (POMPERMAYER et al., 2001).

6 CONCLUSÕES

- ✓ A abordagem transcriptômica utilizada nesse trabalho permitiu a identificação de nove quimotripsinas e quatro tripsinas completas de *D. saccharalis*;
- ✓ Nesse estudo a modulação da expressão gênica não foi identificada como um mecanismo adaptativo utilizado por lagartas de *D. saccharalis* em resposta à ingestão de IPS;

REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 2104-2105, May, 2005.
- ARENCIBIA, A.; VÁZQUEZ, R.I.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNÁNDEZ, L.; De la RIVA, G.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, Belgium, v. 3, p. 247-255, 1997.
- BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soybean. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, n. 87, p. 281-284, 1963.
- BOWMAN, D.E. Differentiation of soybean antitryptic factor. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 63, p. 547-550, 1946.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive 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.
- _____. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidoptera larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, London, v. 29, p. 278-290, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 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. 1283-1290, 2007.
- BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 128 Part B, p. 365-375, 2001.
- 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.
- _____. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 855-874, 1997.
- CHIKATE, Y.R.; TAMHANE, V.A.; JOSHI, R.S.; GUPTA, V.S.; GIRI, A.P. Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 258-272, 2013.

CHOUGULE, N.P.; DOYLE, E.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 54, p. 563-572, 2008.

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

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P. BURGESS, E.P.J. Midgut, protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.

CONESA, A. GÖTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 3674-3676, Sep. 2005.

COSTA LIMA, A. da. **Insetos do Brasil: Lepidópteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1950. 420 p. (Série didática, 8).

CRUZ, A.C.B.; MASSENA, F.S.; MIGLIOLO, L.; MACEDO, L.L.P.; MONTEIRO, N.K.V.; OLIVEIRA, A.S.; MACEDO, F.P.; UCHOA, A.F.; GROSSI de SÁ, M.F.; VASCONCELOS, I.M.; MURAD, A.M.; FRANCO, O.L.; SANTOS, E.A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 70, p. 61-68, 2013.

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

Del MAR, E.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.; GEOKAS, M. A sensitive new substrate from chymotrypsin. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 99, p. 316-320, 1979.

Di MARO, A.; FARISEI, F.; PANICHI, D.; SEVERINO, V.; BRUNI, N.; FICCA, A.G.; FERRANTI, P.; CAPUZZI, V.; TEDESCHI, F.; POERIO, E. WCI, a novel wheat chymotrypsin inhibitor: purification, primary structure, inhibitory properties and heterologous expression. **Planta**, Berlin, v. 234, p. 723-735, 2011.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. p. 349-422.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; dos ANJOS, I.A.; da COSTA, V.P.; FRACASSO, J.V. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n.1, p. 1-7, jan. 2012.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V.; da COSTA, V.P.; dos ANJOS, I.A.; LOPES, D.O.P. Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p.29-34, 2013.

DOW, J.A.T. pH gradients in Lepidopteran midgut. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 172, p. 355-375, 1992.

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 D.C., v. 107, n. 34, p. 15016-15021, 2010a.

DUNSE, K.M.; STEVENS, J.A.; LAY, F.T.; GASPAR, Y.M.; HEATH R.L.; ANDERSON, M.A. Coexpression of potato type I and II 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 D.C., v. 107, n. 34, p. 15011-15015, 2010b.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKI, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 95, p. 271-278, 1961.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

FAN, S-G.; WU, G-J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 46, p. 273-292, 2005.

FRATTALI, V. Soybean inhibitors: III Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 224, n. 2, p. 274, 280, 1969.

GAHLOTH, D.; SHUKLA, U.; BIRAH, A.; GUPTA, G.P.; KUMAR, P.A.; DHALIWAL, H.S.; SHARMA, A.K. Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculin-like protein against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 78, n. 3, p. 132–144, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3.ed.Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. **The Protein Journal**, New York, v. 23, n. 5, 343-350, July 2004.

GARCÍA-OLMEDO, F; SALCEDO, G.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. In: MIFLIN, B. (Ed.) **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1987.v. 4, p. 275-334.

GATEHOUSE, L.N.; SHANNON, A.L.; BURGESS, E.P.; CHRISTELLER, J.T. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 929-944, 1997.

GHODKE, A.B.; CHAVAN, S.G.; SONAWANE, B.V.; BHAROSE, A.A. Isolation and *in vitro* identification of proteinase inhibitors from soybean seeds inhibiting *helicoverpa* gut proteases. **Journal of Plant Interactions**, London, v.8. n.2, p. 170-178, 2013.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM -DELÈGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 229-237, 1998.

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

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

GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro: Instituto do açúcar e do álcool, 1972. 622 p.

GUBB, D.; SANZ-PARRA, A.; BARCENA, L.; TROXLER, L.; FULLAONDO, A. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. **Biochimie**, Paris, v. 92; p. 1749-1759, 2010.

HABIB, H.; FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review** [s.l.] v. 2, n. 3, p. 68-85, Aug. 2007.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 431, p. 145–159, 2004.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, Washington, D.C., v. 102, p. 4501-4523, 2002.

HIVRALE, V.K.; LOMATE, P.R.; BASAIYYE, S.S.; KALVE, N.D. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors from *Albizia lebbek* seeds in the *Helicoverpa armigera* larvae. **Arthropod-Plant Interactions**, Dordrecht, v. 7; p. 259–266, 2013.

HOLLOWAY, T.E.; HALEY, W.E.; LOFTIN, U.C.; HEINRICH, C. **The sugarcane moth borer in the United States**. Washington D. C.: United States Department of Agriculture, 1928. 77 p. (Technical Bulletin , 41).

JAMAL, F.; PANDEY, P.K.; SINGH, D.; KHAN, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochemistry Review**, New York, v. 12, p. 1–34, 2013.

JANY, K-D.; BEKELAR, K.; PFLEIDERER, G.; ISHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotrypsin from the larvae of the hornet *Vespa orientalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 110, n. 1, p. 1-7, 1983.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington D.C., v. 86, p. 9871-9875, 1989.

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

JONGSMA, M.A.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor- insensitive proteases of insect pests. **Tibtech**, Amsterdam, v. 14, p. 331-333, Sept. 1996.

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

KING, E.G.; HARTLEY, G.C. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook on insect rearing**. New York: Elsevier, 1985, p.265-270.

KING, E.G; BREWER, F.D.; MARTIN, D.F. Development of *Diatraea saccharalis* (Lep. : Pyralidae) at constant temperatures. **Entomofhaga**, Paris, v. 20, n. 3, p. 301-306, 1975.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; RASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 10, p. 379-384, Oct. 1997.

KRAUT, J. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 331-358, 1977.

KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, Washington D.C., v. 101, n. 2635, p. 668-669, 1945.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 22, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LASKOWSKI JR, M.; KATO, I. Protein inhibitor of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p. 593-626, 1980.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Eletronic journal of biotechnology**, Valparaíso, v. 5; n. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/fbpe/img/ejb/v5n1/03/3.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G.S.; LIENER, I.E. Growth Inhibitors: Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium Confusum*. **Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 2, n. 8, p. 410-414, Apr., 1954.

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

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

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

NAKANO, O. **Entomologia econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2011. 464 p.

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

ODANI, S.; KOIDE, T.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: III Isolation and sequence determination of the tryptic peptides of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 71, p. 831-838, 1972.

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

PARDE, V.D.; SHARMA, H.C.; KACHOLE, M.S. *In vivo* inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 56, p. 1315-1324, 2010.

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

PAULILLO, L.C.M.S.; SEBBEN, A.M.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; GÓES-NETO, A.; BROTTTO, M.A.P.; FIGUEIRA, A. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* effects of semipurified proteinase inhibitors from *Tehobroma* seeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 81, n. 1, p. 34–52, 2012.

PETEK, M.; TURNSEK, N.; GASPARIC, M.B.; NOVAK, M.P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N.; POPOVIC, T.; STRUKELJ, B.; JONGSMA, M.A. A Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 79, n. 3, p. 153–181, 2012.

PFFAFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, 2001. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

PÓLGAR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 53, n. 1, p. 2161-2172, 2005.

POMPERMAYER, P. **Estudo *in vivo* e *in vitro* da ação de inibidores de proteinase de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (FABR, 1794)**. 2000. 78 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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.

RAMOS, V.D.; CABRERA, O.G.; CAMARGO, E.L.O.; AMBOSIO, A.B.; VIDAL, R.O.; da SILVA, D.S.; GUIMARÃES, L.C.; MARANGONI, S.; PARRA, J.R.P.; PEREIRA, G.A.G.; MACEDO, M.L.R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 156, n. 3/4, p. 148-158, Nov. 2012.

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemistry Journal**, London, v. 398, p.705-716, 2004.

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

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: RODGERS, L.J.(Ed.). **Methods in plant biochemistry, Amino acids, proteins and nucleic acids**. New York: Academic Press, 1991. p. 259-305.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, Aug. 2003.

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

SAADATI, F.; BANDANI, A.R. Effects of serine srotease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 11, n.72, 2011. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1673/031.011.7201>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

SAADATI, F.; BANDANI, A.R.; MOSLEMI, A. Effect of plant seeds protein extract on the sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton, growth and development and its gut serine protease activity. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 55, p. 11502-11510, Sept., 2011.

SAIKIA, M.; SINGH, Y.T.; BHATTACHARYA, A.; MAZUMDAR-LEIGHTON, S. Expression of diverse midgut serine proteinases in the sericigenous Lepidoptera *Antheraea assamensis* (Helfer) is influenced by choice of host plant species. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2011.

SAKAL, E.; APPLEBAUM, S.W.; BIRK, Y. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 32, p. 590-598, 1988.

SANCHEZ-SERRANO, J.; SCHMIDT, R.; SCELL, J.; WILLMITZER, L. Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 203, p. 15-20, 1986.

SILVA C.P.; LEMOS, F.J.A.; da SILVA, J.R. Digestão em insetos. In: TERMIGNONI, C.; MASUDA, H.; da SILVA NETO, M.A.C. (Ed.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCT-EM, 2013. cap. 5, p. 1-32.

SILVA, W.; FREIRE, M.D.M.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of the *Adenantha pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry**, London, v. 47, n. 2, p. 257-263, 2012.

SMIGOCKI, A.C.; IVIC-HAYMES, S.; LI, H.; SAVIC, J. Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, Feb., 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0057303>>. Acesso em: 27 maio 2013.

SOUZA, T.P. **Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda***. 2013. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências: Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SOUZA, J.R.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; PERECIN, D.; CARGNELUTTI FILHO, A.; daCOSTA, J.T. Divergência genética de cultivares de cana-de-açúcar quanto à resistência a *Diatraea saccharalis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, supl. 1, p. 3367-3376, 2013.

SPIT, J.; ZELS, S.; DILLEN, S.; HOLTOF, M.; WYNANT, N.; BOECK, J.V. Effects of different dietary conditions on the expression of trypsin- and chymotrypsin-like protease genes in the digestive system of the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 48, p. 100-109, 2014.

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

STEFFENS, R.; FOX, F.R.; KASSEL, B. Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 1, 170-174, 1978.

TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 181-200, 1990.

_____. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 47, p. 47-61, 2001.

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

_____. Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap 4, p. 175-209.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, S.R.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. W71-W74, 2007. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/content/35/suppl_2/W71.full?sid=9c42b8f0-55ca-4fdf-a5c1-aef7de378d0f>. Acesso em: 24 nov. 2010.

XU, D.; XUE, Q.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; VAUGHAN, A.H.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2; p. 167-173, 1996.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, R.; ABEL, C.; LUTTRELL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, Oct. 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0025783>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

YAO, J.; BUSCHMAN, L.L.; OPPERT, B.; KHAJURIA, C.; ZHU, K.Y. Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0044090>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

ZERBINO D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, New York, v.18, n.5, p.821-9, May 2008.