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

Adaptação de *Helicoverpa armigera* aos inibidores de peptidase de soja envolve uma alteração no padrão de expressão das serino peptidases e sugere um controle epigenético

Pedro Alexander Velasquez Vasconez

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

Piracicaba 2022 Pedro Alexander Velasquez Vasconez Engenheiro Agrônomo

Adaptação de *Helicoverpa armigera* aos inibidores de peptidase de soja envolve uma alteração no padrão de expressão das serino peptidases e sugere um controle epigenético

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador: Prof. Dr. MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO

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

Piracicaba 2022

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

Velasquez Vasconez, Pedro Alexander

Adaptação de *Helicoverpa armigera* aos inibidores de peptidase de soja envolve uma alteração no padrão de expressão das serino peptidases e sugere um controle epigenético / Pedro Alexander Velasquez Vasconez. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

119 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Epialelos 2. Reprogramação germinal 3. Lepidoptera 4. Metiloma I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Pedro Velasquez e Sara Vasconez, por transmitir com amor

todo o seu potencial adaptativo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me brindar a paz necessária para superar os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, por toda a sua dedicação e o apoio incondicional. Ao Prof. Dr. Chris Bass, pelo suporte intelectual e apoio financeiro.

A Ben, Thais, Flavia, Camila e especialmente a Renata, pelos seus inestimáveis ensinamentos.

Ao Dr. Daniel Moura Dra. Caroline Quecine e Dr. Fabio Tebaldi pelo suporte intelectual. Ao grupo do Laboratório de Biologia de Insetos, em especial à Neide, Lucas, Aloiso, e o prof. Dr. Parra, pelo apoio que foi fundamental no desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas do laboratório, em especial Diego, Augusto, Karine, Larissa, Maressa pelos momentos agradáveis.

Aos meus pais, Sara e Pedro, pelo seu amor infinito.

Ao meu doce amor Angélica, por me dar os momentos mais felizes.

Aos meus irmãos, Juan, María e Jeral, pelo apoio e carinho sincero.

Aos meus familiares, em especial aos meus tios Margot, Robert, Rosa pelo carinho.

Aos meus amigos da República Central do Brasil, em especial a Diego, André, Enrique, Genésio, Max, pelo agradável acolhimento.

Aos todos os amigos de Piracicaba, em especial Rafael, Mónica, Fábio, Soledad, Diego, Andres, Yajahaira, Fernando, pelo carinho e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao crédito – bolsa de COLFUTURO pelo crédito dos meses que fiquei sem bolsa no Brasil. À Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz- FEALQ pela bolsa de 4 meses na etapa final do doutorado.

Ao Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas – PECEGE, ESALQ/USP, pelas duas bolsas de MBA em Gestão de Projetos e MBA em Data Science e Analytics.

A todos os que contribuíram à culminação deste projeto, obrigado!

A natureza não faz nada bruscamente Jean-Baptiste Lamarck

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. Objetivo geral	12
1.1.1. Objetivos específicos	12
REFERÊNCIAS	13
2. CAPÍTULO 1 – VISÃO GERAL DA INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE: PLA	NTAS-
INSETOS HERBÍVOROS	17
RESUMO	17
Abstract	17
2.1. Helicoverpa armigera	17
2.2. PEPTIDASES DIGESTIVAS DE INSETOS	18
2.3. INIBIDORES DE PEPTIDASE DE PLANTAS	20
2.4. CONTROLE DE INSETOS COM INIBIDORES DE PEPTIDASE DE PLANTAS	22
2.5. MECANISMOS DE ADAPTAÇÃO DE INSETOS AOS INIBIDORES DE PEPTIDASE DE F	LANTAS
	23
2.6. EPIGENÉTICA	25
2.7. FENÔMENOS EPIGENÉTICOS EM INSETOS	27
2.8. METILAÇÃO DO DNA EM INSETOS	30
2.9. MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE RESÍDUOS DE HISTONAS EM INSETOS	31
REFERÊNCIAS	32
3. CAPÍTULO 2 - A ADAPTAÇÃO DE LAGARTAS DE HELICOVERPA ARM	<i>ligera</i>
AOS INIBIDORES DE PEPTIDASE DE SOJA PODE SER MEDIADA POR HE	RANÇA
EPIGENÉTICA	39
RESUMO	39
Abstract	39
3.1. Introdução	40
3.2. Materiais e métodos	41
3.2.1. Extração de inibidores de peptidase de soja	41
3.2.2. Análise da concentração dos inibidores	42
3.2.3. Criação e manutenção de insetos de <i>H. armigera</i>	43
3.2.4. Análise fenotípico de insetos de <i>H. armigera</i> expostos aos inibidore	es 43

3.2.5. Criação de gerações de insetos de <i>H. armigera</i> 44
3.2.6. Análise de RNA-seq46
3.2.7. Mineração de dados de RNA-seq depositados no NCBI46
3.2.8. Validação de dados do transcritoma por RT-qPCR47
3.2.9. Identificação de sequências de genes serino peptidases
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO48
3.3.1. O extrato proteico presentou inibidores predominantemente contra tripsinas
3.3.2. As lagartas de H. armigera são resistentes à alimentação com IPs50
3.3.3. A expressão diferencial de peptidases digestivas é responsável pela
adaptação de <i>H. armigera</i> aos IPs53
3.3.4. Grande parte do perfil transcricional induzido pela alimentação com IPs foi
transmitido às progênies de insetos de <i>H. armigera</i> 55
3.3.5. Genes potencialmente envolvidos na regulação transcricional e na
formação de epialelos de <i>H. armigera</i> 61
3.3.6. A herança de características adquiridas e a evolução63
3.4. CONCLUSÕES63
REFERÊNCIAS64
MATERIAL SUPLEMENTAR73
4. CAPÍTULO 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUENCIAS DE SERINO
PEPTIDASES DE LAGARTAS DE HELICOVERPA ARMIGERA USANDO
PROGRAMAS DE BIOINFORMÁTICA79
Resumo79
ABSTRACT
4.1. Introdução
4.2. Materiais e Métodos80
4.2.1. Análise filogenética de genes de tripsinas e quimotripsinas81
4.2.2. Mapeamento de ilhas CG81
4.2.3. Identificação de elementos de transposição81
4.2.4. Identificação de motivos conservados82
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO82
4.3.1. A estrutura dos genes de serino peptidases sugere um possível controle
transcricional associado a fenômenos epigenéticos82

4.3.2. A arquitetura do promotor revela pistas sobre a ativação de genes serino
peptidase
4.3.3. Os genes de serino peptidases são enriquecidos com ilhas CG
predominantemente na região codante 86
4.4. Conclusões
Referências
MATERIAL SUPLEMENTAR
5. CAPÍTULO 4 – PAPEL DA METILAÇÃO DO DNA NA RESPOSTA MOLECULAR
DE HELICOVERPA ARMIGERA AOS INIBIDORES DE PEPTIDASE DE SOJA 98
Resumo
Abstract
5.1. Introdução
5.2. Materiais e Métodos 100
5.2.1. Análise funcional da metilação do DNA em lihas CG de genes serino
peptidase
5.2.2. Indução de desmetilação do DNA com 5-azacytidina
5.2.3. Caracterização do genoma completo da metilação do DNA 103
5.3. Resultados e Discussão 103
5.3.1. O tratamento com a 5-azacytidina altera os padrões de expressão de genes
de tripsinas e quimotripsinas do sistema digestivo de <i>H. armigera</i>
5.3.2. Genes serino peptidase são quase por completo hipometilados 106
5.3.3. Papel da metilação do DNA na resposta molecular de H. armigera aos IPs
5.4. Conclusões
REFERÊNCIAS
MATERIAL SUPLEMENTAR
6. CONCLUSÕES GERAIS 119

RESUMO

Adaptação de *Helicoverpa armigera* aos inibidores de peptidase de soja envolve uma alteração no padrão de expressão das serino peptidases e sugere um controle epigenético

Após décadas das primeiras publicações sobre a plasticidade transcricional do sistema digestivo dos insetos polífagos, ainda não se conhece em profundidade como os genes são regulados e as vias de sinalização envolvidas neste mecanismo adaptativo. Inicialmente, foi mostrado que a adaptação de lagartas de H. armigera à alimentação com inibidores de peptidase de soja (IPs) se deve à alteração do perfil transcricional de genes codificadores de serino peptidases do sistema digestivo. A presença dos IPs na dieta causou mudanças na regulação de genes de um amplo repertório de enzimas proteolíticas, principalmente com o aumento de genes de tripsinas. A regulação diferencial de enzimas digestivas foi associada à adaptação da H. armigera ao efeito anti-nutricional dos IPs. Além disso, a análise de dados de expressão gênica em larga escala (RNA-seg) mostrou que aproximadamente 40% dos transcritos (cerca de 500 epialelos potenciais) induzidos pelos IPs foram transmitidos à geração seguinte, apesar das lagartas desenvolverem-se em dietas desprovidas de IPs. A fim de caracterizar um possível mecanismo epigenético responsável por este mecanismo adaptativo, foi realizado o metiloma do sistema digestivo das lagartas da primeira geração (alimentadas com e sem IPs) e das progênies de lagartas expostas aos IPs. Epialelos de metilação do DNA foram associados aos controles transcricional e traducional, sugerindo um possível envolvimento da alteração do padrão de metilação na adaptação de H. armigera aos IPs. Este trabalho abre novas perspectivas no entendimento do polifagismo e a plasticidade dos insetos na alimentação de um amplo número de plantas hospedeiras, influenciando o seu curso evolutivo.

Palavras-chave: Tripsinas, Quimotripsinas, Epigenética, Helicoverpa armigera, Metilação do DNA, Plasticidade fenotípica, Insetos polífagos

ABSTRACT

Adaptation of *Helicoverpa armigera* to soy peptidase inhibitors involves an alteration in the expression pattern of serine peptidases and suggests an epigenetic control

After decades of the first publications on the transcriptional plasticity of the digestive system of polyphagous insects, it is not yet known in depth how genes are regulated and the signaling pathways involved in this adaptive mechanism. Initially, it was shown that the adaptation of Helicoverpa armigera larvae to feeding with soybean peptidase inhibitors (SPI) is due to the alteration of the transcriptional profile of genes encoding serine peptidases in the digestive system. The SPI in the diet caused changes in gene regulation of a wide repertoire of proteolytic enzymes, mainly with the increase of trypsin genes. Differential regulation of digestive enzymes was associated with the adaptation of *H. armigera* to the anti-nutritional effect of PIs. In addition, largescale gene expression data analysis (RNA-seq) showed that approximately 40% of the transcripts (about 500 potential epialleles) induced by PIs were passed on to the next generation, even though larvae thrived on deprived diets of IPs. In order to characterize a possible epigenetic mechanism responsible for this adaptive mechanism, the methylome of the digestive system of first-generation larvae (fed with and without SPI) and of the progenies of larvae exposed to SPI was evaluated. DNA methylation epialleles were associated with transcriptional and translational controls, suggesting a possible involvement of the alteration of the methylation pattern in the adaptation of H. armigera to SPI. This work opens new perspectives on the understanding of polyphagism and the plasticity of insects in feeding many host plants, influencing their evolutionary course.

Keywords: Trypsins, Chymotrypsins, Epigenetics, *Helicoverpa armigera*, DNA methylation, Phenotypic plasticity, Polyphagous insects

1. INTRODUÇÃO GERAL

Helicoverpa armigera (Hübner; Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto polífago extremamente voraz que causa grandes prejuízos econômicos em diversas empresas agrícolas. Este inseto-praga é adaptado a um amplo repertório de plantas hospedeiras, ameaçando mais de 172 espécies de plantas ao longo dos cinco continentes (Reigada, Guimarães, e Parra 2016). A infestação por *H. armigera* causou perdas superiores a 11 bilhões de reais até o ano 2017 (MAPA, 2017), ou seja, em apenas quatro anos após ter sido reportada no Brasil (Czepak et al., 2013).

Inibidores de peptidase de soja (IPs) são uma das principais defesas das plantas contra os ataques de insetos herbívoros. As plantas de soja, por exemplo, produzem predominantemente inibidores de tipo Kunitz e Bowman-Brik (Birk, Gertler, e Khalef 1963; Bowman, 1947; Kunitz 1945, 1947), encontrados principalmente nas sementes, os quais têm massa molecular ao redor de 20 e 8 kDa, respectivamente (Habib e Fazili, 2007). Genes de IPs são geralmente pequenos e sem introns, o que facilita a sua expressão em outras espécies de plantas. Devido a estas características foram considerados ideais para a produção de plantas transgênicas resistentes a insetos herbívoros (Boulter 1993; Hilder et al. 1987). Não obstante, insetos herbívoros conseguem superar a maquinaria de defensa das plantas.

A grande capacidade de explorar diversos habitats das pragas geralistas deve-se, entre outros fatores, à habilidade deste inseto para aproveitar diversas fontes de energia. A conquista exitosa de um amplo número de hospedeiros tem sido atribuída ao conjunto de genes de tripsinas e quimotripsinas que atuam na digestão dos alimentos (Chikate et al. 2013). Estima-se que o intestino médio da *H. armigera* contém um amplo conjunto de proteases diferentes (Bown, Wilkinson, e Gatehouse 1997, 2004), sendo responsáveis do 85% da digestão (Chandra, Asokan, et al. 2018). As enzimas digestivas são reguladas dinamicamente em resposta à fonte alimentar (Bown et al. 1997, 2004; Kuwar et al. 2015) o que parece ser uma característica comum dos noctuideos (Souza et al. 2016). A regulação transcricional é um dos mecanismos fundamentais da adaptação da *H. armigera* ao ambiente. Mecanismos de expressão diferencial de genes estão envolvidos na resistência das lagartas à maquinaria de defesa das plantas (Kuwar et al. 2015; Chandra, Asokan, et al. 2018), tolerância aos inseticidas (Xu et al. 2018), nos processos de reprodução sexual (Wang, Liu, e Wang 2018). Não obstante, os mecanismos moleculares que controlam a regulação dinâmica de genes de *H. armigera* ainda é um enigma (Chikate et al. 2013; Lomate et al. 2018; Terra et al. 2019).

Em organismos eucariotos, os processos de regulação da transcrição dos genomas ainda são pouco conhecidos. Inclusive, em organismos mais estudados como a *Escherichia*

coli ainda não foi possível caracterizar a regulação da metade dos genes anotados (Fang et al. 2017). Modelos simples do controle de expressão de genes foram propostos em organismos modelo (Jacob e Monod 1961), embora estudos posteriores demostraram que a complexidade transcricional depende da interação de uma série de elementos cuidadosamente coordenados (Phillips et al. 2019).

A arquitetura do promotor, por exemplo, é um dos fatores mais simples que controlam a produção de transcritos. Não obstante, é afetada muitas vezes pela presença de uma ou mais estruturas como: elementos de transposição (Klai et al. 2020), RNAs reguladores (Lomate et al. 2014), *cis elements* (Zhao et al. 2018), ilhas CG (Morgan e Marioni 2018) e modificações epigenéticas (Jones et al. 2018). Aqui sugerimos que a regulação de genes do sistema digestivo de lagartas de *H. armigera* pode ser controlada por mecanismos epigenéticos. Estes resultados levantaram questionamentos intrigantes não apenas sobre as bases moleculares da regulação de enzimas digestivas, mas também sobre a importância destes mecanismos nos processos evolutivos.

Inicialmente, os fenômenos epigenéticos podem ter grande valor adaptativo na evolução dos organismos. A grande maioria dos estímulos ambientais não afetam a sequência do DNA, enquanto as modificações epigenéticas respondem rapidamente ao ambiente, gerando novos fenótipos potencialmente úteis para adaptação dos organismos às condições ambientais (Kouzarides 2007). De tal forma que todos os estímulos externos podem causar modificações no epigenôma dos organismos. A dieta, por exemplo, é um dos principais fatores que causam modificações epigenéticas nos animais (Faulk e Dolinoy 2011). Alguns estímulos causam alterações na estrutura da cromatina ou na regulação de genes (fenótipos moleculares) que podem ser transmitidos à descendência (Grunau et al. 2019). Estes fenômenos moleculares geralmente são mais compatíveis com a ideias de Lamarck. Neste trabalho, mostramos que um conjunto de fenótipos moleculares induzidos por inibidores de peptidase de soja (IPs) em insetos polífagos podem ser transmitidos por herança epigenética. Estes fenômenos epigenéticos podem ter valor adaptativo, sugerindo uma visão mais ampla dos processos evolutivos. Além disso, identificamos genes potenciais que poderiam trazer novas informações sobre a adaptação de gerações de *H. armigera* à alimentação com IPs.

1.1. Objetivo geral

Caracterizar os mecanismos epigenéticos adaptativos de regulação transcricional de genes serino peptidases da *H. armigera* à alimentação com dieta suplementada com IPs.

1.1.1. Objetivos específicos

- Realizar um levantamento de literatura sobre a interação molecular entre: Plantas – insetos herbívoros.
- Comprovar a resistência da *H. armigera* à alimentação com dieta artificial suplementada com IPs.
- Identificar o perfil transcricional do sistema digestivo de lagartas de *H. armigera* expostas ou não aos IPs.
- Avaliar a herança epigenética de fenótipos moleculares induzidos por IPs em lagartas de *H. armigera*.
- Estudar da estrutura de genes serino peptidase da *H. armigera* usando ferramentas de bioinformática.
- Estudar o papel da metilação do DNA nos mecanismos moleculares de resposta da *H. armigera* aos IPs.

Referências

- Birk, Y., Gertler, A., e Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochemical Journal*, 87(2), 281–284. https://doi.org/10.1042/bj0870281
- Boulter, D. (1993). Insect pest control by copying engineered nature crops. *Phytochemistry*, *34*(6), 1453–1466.
- Bowman, E. D. (1947). Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Journal of Biological Chemistry*, 12(23), 547–550.
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (1997). Differentially regulated inhibitorsensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, Helicoverpa armigera, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7), 625–638. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00043-X
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiological Entomology*, *29*(3 SPEC. ISS.), 278–290. https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x
- Chikate, Y. R., Tamhane, V. A., Joshi, R. S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2013). Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 22(3), 258–272. https://doi.org/10.1111/imb.12018

- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O., e Carvalhas, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquiza Agropecuaria Tropical*, *43*(1), 110–113.
- Fang, X., Sastry, A., Mih, N., Kim, D., Tan, J., Yurkovich, J. T., Lloyd, C. J., Gao, Y., Yang, L., e Palsson, B. O. (2017). Global transcriptional regulatory network for *Escherichia coli* robustly connects gene expression to transcription factor activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(38), 10286–10291. https://doi.org/10.1073/pnas.1702581114
- Faulk, C., e Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything. *Epigenetics*, 6(7), 791–797. https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209
- Grunau, C., Le Luyer, J., Laporte, M., e Joly, D. (2019). The epigenetics dilemma. *Genes*, *11*(1), 23. https://doi.org/10.3390/genes11010023
- Habib, H., e Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68–85.
- Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F., e Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Letters to Nature*, 330(12), 160–163.
- Jacob, F., e Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 318–356). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7
- Jones, C. M., Lim, K. S., Chapman, J. W., e Bass, C. (2018). Genome-wide characterization of DNA methylation in an invasive lepidopteran pest, the cotton bollworm *Helicoverpa armigera. Genes/Genomes/Genetics*, *8*(March), 779–787. https://doi.org/10.1534/g3.117.1112
- Klai, K., Chenais, B., Zidi, M., Djebbi, S., Caruso, A., Denis, F., Confais, J., Badawi, M., Casse, N., e Mezghani, M. (2020). Screening of *Helicoverpa armigera* mobilome revealed transposable element insertions in insecticide resistance genes. *Insects*, *11*(12), 879. https://doi.org/10.3390/insects11120879
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693–705. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, *101*(2635), 668–669. https://doi.org/10.1126/science.101.2635.668
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: ii. General properties. *The Journal of General Physiology*, *30*(4), 291–310. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19873496
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., e Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 18–29. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.016

- Lomate, P. R., Dewangan, V., Mahajan, N. S., Kumar, Y., Kulkarni, A., Saxena, S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2018). Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. *Molecular and Cellular Proteomics*, *17*(7), 1324–1336. https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000533
- Lomate, P. R., Mahajan, N. S., Kale, S. M., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2014). Identification and expression pro fi ling of *Helicoverpa armigera* microRNAs and their possible role in the regulation of digestive protease genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 129–137. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.09.008
- Ministério de Agricultura, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, M. MAPA (2017). http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-concede-registro-definitivo-para-obenzoato
- Morgan, M. D., e Marioni, J. C. (2018). CpG island composition differences are a source of gene expression noise indicative of promoter responsiveness. *Genome Biology*, 19(1), 81. https://doi.org/10.1186/s13059-018-1461-x
- Phillips, R., Belliveau, N. M., Chure, G., Garcia, H. G., Razo-Mejia, M., e Scholes, C. (2019). Figure 1 theory meets figure 2 experiments in the study of gene expression. *Annual Review of Biophysics*, 48(1), 121–163. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115525
- Reigada, C., Guimarães, K. F., e Parra, J. R. P. (2016). Relative fitness of *Helicoverpa* armigera (lepidoptera: noctuidae) on seven host plants: A perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1), 3. https://doi.org/10.1093/jisesa/iev158
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., e Krishna Kumar, N. K. (2018). Double-Stranded RNA-mediated suppression of trypsin-like serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 746–761. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2584-3
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhano, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S., e Silva-Filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 196–197, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007
- Terra, W. R., Barroso, I. G., Dias, R. O., e Ferreira, C. (2019). Molecular physiology of insect midgut. In Advances in Insect Physiology (Vol. 56, pp. 117–163). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2019.01.004
- Wang, B., Liu, Y., e Wang, G.-R. (2018). Proceeding from in vivo functions of pheromone receptors: peripheral-coding perception of pheromones from three closely related species, *Helicoverpa armigera, H. assulta,* and *Heliothis virescens. Frontiers in Physiology, 9*(AUG), 1188. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01188
- Xu, L., Li, D.-Z., Luo, Y.-Y., Qin, J.-Y., e Qiu, L.-H. (2018). Identification of the 2-tridecanone cis -acting element in the promoter of cytochrome P450 CYP6B7 in *Helicoverpa armigera*. *Insect Science*, *25*(6), 959–968. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12479

Zhao, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, L., Marand, A. P., Wu, Y., e Jiang, J. (2018). Proliferation of regulatory DNA elements derived from transposable elements in the maize genome. *Plant Physiology*, pp.01467.2017. https://doi.org/10.1104/pp.17.01467

2. CAPÍTULO 1 – VISÃO GERAL DA INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE: PLANTAS-INSETOS HERBÍVOROS

Resumo

A interação planta-inseto oferece um excelente panorama para os estudos de coevolução. As plantas produzem moléculas antinutricionais para se defender dos ataques dos insetos herbívoros. Os genes responsáveis da maquinaria de defensa são potencialmente úteis para a produção de plantas transgênicas resistentes ao controle de pragas. Não obstante, os insetos polífagos, como a *H. armigera*, desenvolveram diversos mecanismos de resposta para a adaptação aos mecanismos de defesa das plantas. Fenômenos epigenéticos parecem ter um papel importante na plasticidade fenotípica e no curso evolutivo dos insetos herbívoros.

Palavras-chave: Lepidoptera, epigenética, insetos generalistas, tripsinas, quimotripsinas.

Abstract

Plant-insect interaction offers an excellent overview for coevolution studies. Plants produce anti-nutritional molecules to defend against attacks from herbivorous insects. The genes responsible for the defense machinery are potentially useful for the production of transgenic plants resistant to pest control. Nevertheless, polyphagous insects, such as *H. armigera*, have developed several response mechanisms for adapting to plant defense mechanisms. Epigenetic phenomena seem to play an important role in the phenotypic plasticity and evolutionary course of herbivorous insects.

Keywords: Lepidoptera, epigenetics, generalist insects, trypsins, chymotrypsins.

2.1. Helicoverpa armigera

H. armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada como uma das pragas mais prejudiciais das commodities agrícolas do Brasil e do mundo. Até 1994, esta praga era distribuída em quatro continentes, a saber: Europa, África, Ásia e Oceania (Zalucki et al. 1994). No continente americano não era um problema até pouco tempo atrás, sendo considerada praga quarentenária no Brasil até 2012. No entanto, no ano seguinte foi relatada a primeira ocorrência do inseto em cultivos de soja e algodão nos estados de Goiás, Bahia e Mato Grosso (Czepak et al. 2013). Assim, desde que a praga invadiu o Brasil, estima-se que tem causado prejuízos superiores a 11 bilhões de reais no período de 2013-2017 (MAPA, 2017).

A *H. armigera* tem grande potencial de ampliar as áreas de infestação. Esta praga é migrante por natureza e tem a capacidade de se movimentar por distâncias de até 1000 km (Pedgley, Tucker, e Pawar 1987). No Brasil, por exemplo, os adultos desta praga colonizaram

rapidamente diferentes regiões agrícolas no território (Kriticos et al. 2015). Além da facilidade de dispersão no campo, este inseto apresenta uma alta taxa de reprodução. As mariposas fêmeas têm a capacidade de ovipositar de até 1500 ovos por postura e uma taxa de reprodução de até três gerações por ano, dependendo das condições ambientais (Liu et al. 2017). Dessa forma, a *H. armigera* é uma praga extremamente polífaga e ameaça mais de 172 espécies de plantas correspondentes a 68 famílias (Reigada et al. 2016) com grande potencial de se expandir nas áreas agrícolas e aumentar os índices de infestação.

O controle desta praga é realizado principalmente por inseticidas sintéticos. No entanto, os defensivos agrícolas além de controlar as pragas podem afetar outros organismos, causando sérios impactos ambientais. Além disso, vários casos de resistência a inseticidas foram relatados devido à pressão de seleção dos métodos de controle químicos, sendo mais difícil ainda controlar eficientemente as populações da praga (Baskar e Ignacimuthu 2012). Portanto, a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos é de grande interesse na biotecnologia agrícola. Assim, a expressão ectópica de genes que codificam inibidores de peptidases representa uma abordagem eficaz para melhorar o sistema de defesa das plantas contra os ataques de insetos.

2.2. Peptidases digestivas de insetos

Insetos são considerados como os organismos evolutivamente melhor adaptados do planeta. A grande capacidade de explorar diversos habitats deste grupo de animais deve-se, entre outros fatores, à habilidade de aproveitar diversas fontes de energia. Para isso, os insetos apresentam um amplo repertório de proteases digestivas no intestino atuando na digestão dos alimentos (Dias et al. 2015). Essas enzimas desempenham importantes papéis nos processos bioquímicos e fisiológicos no desenvolvimento desses organismos.

O processo digestivo tem um papel extremamente importante na biologia e evolução dos insetos. As peptidases (EC 3.4) são enzimas que clivam ligações entre os aminoácidos e estão envolvidas diretamente com a alimentação. Atualmente, existem mais de 4600 peptidases descritas e mais de 64000 especificidades de clivagens de substrato, de acordo com o banco de dados de enzimas proteolíticas da MEROPS (Rawlings, Barrett, e Bateman 2014). Estima-se que no intestino médio do inseto contém um conjunto de proteases digestivas que estão reguladas diferencialmente (Bown et al. 1997, 2004). Assim, essas proteínas estão envolvidas predominantemente em processos de digestão, ativação enzimática, metamorfose, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos e tem um papel no sistema imunológico (Huang et al. 2011). Além disso, estudos demostram que a regulação dinâmica da diversidade de enzimas digestivas pode estar envolvida com a evolução da

polifagia nestes insetos (Chandra et al. 2018; Souza 2013; Dias et al. 2015). Particularmente em lepidóptera, os insetos foram adquirindo um conjunto de enzimas digestivas especializadas que poderiam estar associadas à adaptação a diversas fontes alimentares (Dias et al. 2015).

As peptidases podem ser agrupadas em endopeptidases ou exopeptidases com base na posição da ligação peptídica a ser clivada na sequência do substrato. As endopeptidases, ou também conhecidas como proteinases, podem ser classificadas com base na natureza do nucleófilo na reação catalítica (Rawlings et al. 2014). Assim podemos formar seis subclasses baseados na cabeça nucleofílica: serina endopeptidases (serina), treonina endopeptidases (treonina), cisteína endopeptidases (cisteína), glutâmico endopeptidases (glutamato), aspártico endopeptidases (aspartato), metalo endopeptidases (íon metálico) (Rawlings et al. 2014). Contudo, as peptidases diferem na especificidade do substrato e no mecanismo catalítico.

Do grupo das serino endopeptidases, as tripsinas e quimotripsinas são predominantemente abundantes no sistema digestivo dos insetos da Ordem Lepidoptera (Sharath Chandra et al. 2018). As tripsinas (EC 3.4.21.4) têm alta especificidade por ligações peptídicas no lado carboxílico de dois aminoácidos básicos como arginina e a lisina. Em contraste, as quimotripsinas (EC 3.4.21.1) catalisam uma maior gama de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos como fenilalanina, tirosina, triptofano e leucina. A ativação das tripsinas e quimotripsinas ocorre pela clivagem de uma sequência N-terminal de comprimento variável (Hedstrom 2002). A remoção permite a mudança conformacional na região do sítio ativo que desencadeia a atividade catalítica (Hedstrom 2002). Os precursores de tripsinas e quimotripsinas são as sequências inativas de tripsinogênio e quimotripsinogênio, respectivamente. Os zimógenos possuem um aminoácido básico na mesma sequência que torna a região de ativação um substrato potencial para tripsinas (Rinderknecht 1986). Vários estudos mostraram que grande porcentagem dos zimógenos de serina peptidase são ativados pelas tripsinas, sugerindo que essas enzimas têm um papel importante na autoativação das peptidases.

Análises filogenéticos sugerem que as tripsinas de lepidópteras tem uma maior tendência à auto ativação do que as enzimas de outras ordens (Dias et al. 2015). Além disso, estudos de proteases intestinais de 12 espécies de insetos lepidópteros indicaram que as tripsinas desempenham um papel significativo na digestão das proteínas vegetais (Christeller et al. 1992). A grande diversidade de tripsinas e sua auto ativação podem ser resultado de mecanismos de adaptação dos lepidópteras à necessidade de alimentação incessante e de estratégias de escape de inibidores (Dias et al. 2015). Esses comportamentos são particulares em insetos que se alimentam de diversas fontes de energia.

Em *H. armigera*, existem pelo menos 29 genes que codificam para tripsinas e 20 genes semelhantes para quimotripsinas (Chikate et al. 2013). Assim, as tripsinas e quimotripsinas contribuem com cerca de 85% da digestão proteica da dieta de *H. armigera* (Sharath Chandra et al. 2018). Portanto, vários pesquisadores têm proposto como objetivo bloquear as atividades das serina peptidase como método de controle de *H. armigera* (Bown et al. 1997). Dessa forma, os inibidores podem ser potencialmente úteis para o controle de outros insetos polífagos. Entretanto, o bloqueio das peptidases é superado frequentemente pela plasticidade transcricional dos insetos desenvolvendo resistência aos inibidores.

2.3. Inibidores de peptidase de plantas

As plantas possuem inibidores de peptidase para se defenderem da degradação proteica de peptidases digestivas de insetos e patógenos. O primeiro inibidor foi descoberto há mais de 80 anos em farinha de soja (Read e Haas, 1938). Atualmente, o banco de dados de enzimas proteolíticas da MEROPS indicam que existem mais de 700 inibidores diferentes e mais de 6000 interações entre inibidores e peptidases (Rawlings et al. 2014).

Os inibidores de peptidases são proteínas amplamente abundantes nos organismos vivos. Essas proteínas geralmente são formadas de dímeros ou tetrâmeros e muitas vezes exibem um peso molecular entre 10 e 90 kDa (Habib e Fazili 2007). Os inibidores atuam como pseudo-substratos específicos (das peptidases digestivas de insetos ou patógenos) ligandose à peptidase de forma estável bloqueando a reação de proteólise. Portanto, os genes de inibidores de peptidases têm recebido atenção especial no desenvolvimento de cultivos transgênicos resistentes a insetos-praga. Esses genes codificam proteínas que atuam nos principais mecanismos de defesa das plantas à resposta ao estresse biótico e abiótico (Rehman, Aziz, e Akhtar 2017).

Os inibidores de peptidases são classificados detalhadamente no banco de dados MEROPS (Rawlings et al. 2014). O agrupamento é bastante complexo por causa da diversidade e abundância dos inibidores, no entanto, a classificação considera a homologia entre as sequencias, a estrutura da proteína e o tipo de peptidase inibida. Assim, os inibidores que bloqueiam a ação das serina peptidases (tripsinas e quimotripsinas, entre outras) podem-se classificar nos seguintes grupos: família Kunitz (inibidor de tripsina), família Bowman-Birk (inibidor de tripsina e quimotripsina), família de inibidores tipo I (inibidor para quimotripsinas e subtilisina), família de inibidores tipo II (inibidores para tripsina e quimotripsinas), família de inibidores para tripsina e quimotripsinas), família de inibidores de cereais (tripsinas) e família de inibidores *squash* (várias serino proteases) (Habib e Fazili 2007).

O maior grupo de inibidores de peptidase estudadas no reino vegetal é originaria de três famílias principais: Fabaceae, Solanaceae e Poaceae. Os inibidores são os principais constituintes de sementes e órgãos de armazenamento (5 a 15% da proteína total) e podem ser produzidos em tecidos e órgãos de armazenamento como efeito do dano mecânico ou de feridas causadas por insetos (Jongsma e Bolter 1997). Em folhas, os inibidores de peptidase estão em baixas concentrações, mas experimentos de Green e Ryan, (1972) revelaram que a concentração foliar de inibidores aumenta após as plantas serem atacadas por insetos ou danificadas mecanicamente.

O mecanismo molecular de indução de inibidores em plantas foi proposto por Farmer e Ryan no ano 1992. De acordo com os autores, os ferimentos provocados pela herbivoria, patógenos ou dano mecânico atuam como sinais extracelulares que ativam a via das lipoxigenases. Essas enzimas são responsáveis pela peroxidação lipídica, são amplamente distribuídas nas plantas e no reino animal e estão presentes em nos cloroplastos, mitocôndrias e vacúolos (Baysal e Demirdöven 2007). Nos cloroplastos, a lipoxigenase-13 catalisa a formação de ácido 13-hidroperoxido-octadecatrienóico (13-HPOT) através de ácido linolênico. Depois, o 13-HPOT é convertido em ciclopentanona pela ação da enzima aleno-óxidosintase. Em seguida, a ciclopentanona passa ao citoplasma onde é convertido em oxopentenilciclopentano, o qual é metabolizado no peroxissomo e forma ácido jasmônico. O ácido jasmônico passa ao citosol onde pode ser metilado formando metil jasmonato. Finalmente, o metil jasmonato pode ativar a transcrição de genes de inibidores de peptidase associados à defesa da planta. Essa resposta é sistêmica pela liberação do ácido jasmônico ou pela ação de outra molécula sinalizadora chamada sistemina. Assim, a liberação dessas duas moléculas através do floema pode ativar genes de inibidores em outros tecidos que ainda não foram danificados. Assim, a transcrição de genes que codificam inibidores de peptidases ocorre de maneira sistêmica.

As plantas de soja induzem dois tipos de inibidores para proteger-se de ataques de insetos e patógenos, uma vez que a soja apresenta um grupo de inibidores da família Kunitz. O nome foi dado pelo próprio autor M. Kunitz quem isolou e caracterizou esses inibidores pela primeira vez no ano 1945 (Kunitz 1945, 1947). Esses inibidores são produzidos em condições de estresse, as proteínas usualmente têm massa molecular entre 18-22 kDa e possuem duas pontes dissulfeto e um sitio ativo (Habib e Fazili 2007). Os inibidores dessa família são altamente específicos para serina peptidases, mas também podem inibir ação de outras proteases. Os inibidores de tipo Kunitz formam um complexo rígido com a protease alvo que se dissocia muito lentamente. A soja também apresenta outro grupo de inibidores da família Bowman-Birk. Essa família foi nomeada em homenagem aos cientistas D. E. Bowman e Y.

Birk quem identificaram e caracterizaram o primeiro inibidor dessa família, sendo agora nomeada como inibidor tipo Bowman-Birk (Birk et al. 1963; Bowman 1947).

Os inibidores Bowman-Birk são encontrados principalmente em sementes, mas também são induzidos nas folhas em condições de estresse. A estrutura dessas proteínas possui dois domínios independentes, um tem capacidade de inibir tripsinas, enquanto o outro além de inibir tripsinas também bloqueia quimotripsinas e elastases. Em dicotiledôneas, os inibidores Bowman-Birk são constituídos por uma única cadeia polipeptídica, cuja estrutura é estabilizada pela presença de sete ligações dissulfeto e usualmente têm massa molecular ao redor 8 kDa. Um estudo sobre a evolução das famílias de Bowman-Birk em monocotiledôneas e dicotiledôneas mostrou uma divisão em dois grupos distintos, sugerindo um padrão evolutivo diferente em plantas (Mello, Tanaka, e Silva-Filho 2003). Os autores mostraram que os inibidores encontrados em dicotiledôneas apresentaram um padrão conservado de sequências, com poucas alterações, enquanto as sequências em monocotiledôneas foram altamente variáveis, baseadas em duplicações gênicas e mutações.

As duas famílias de inibidores (Kunitz e Bowman-Brik) da soja são importantes mecanismos na defesa das plantas contra os ataques de insetos e patógenos. Os genes responsáveis têm sido amplamente estudados para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes principalmente para o controle de diferentes insetos praga.

2.4. Controle de insetos com inibidores de peptidase de plantas

Inibidores de peptidase são proteínas importantes que podem ser úteis para controle de patógenos e insetos praga. O primeiro sucesso de controle de insetos envolvendo inibidores de peptidase foi realizado por Hilder e colaboradores no ano 1987. Nesse estudo os pesquisadores conseguiram transferir um gene do inibidor de tripsina de *Vigna unguiculata* para plantas de tabaco e obtiveram plantas resistentes a vários insetos das ordens lepidóptera, coleóptera e ortóptera. A partir desse estudo, vários casos foram reportados relatando o sucesso na produção de plantas transgênicas resistentes a insetos praga. Em um trabalho pioneiro, nosso grupo obteve plantas transgênicas de cana-de-açúcar expressando os inibidores de peptidase de soja Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). As plantas foram desafiadas com a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* e os resultados mostraram que as lagartas da broca apresentaram um atraso significativo no desenvolvimento quando comparado com o controle, mostrando a efetividade da estratégia (Falco e Silva-Filho, 2003).

Os genes de inibidores de peptidases são ideais para a produção de plantas transgênicas. Os genes de inibidores de peptidase são geralmente pequenos e sem íntrons, o que facilita sua expressão em outras plantas (Boulter 1993). Desde o desenvolvimento do

primeiro cultivo transgênico para o controle de insetos (Hilder, 1987), uma ampla gama de espécies foi transformada como estratégias de controle de pragas.

Os efeitos adversos dos inibidores de peptidase sobre os insetos foram demostrados em diferentes estudos posteriores. Dentre estes estudos destaca-se o de Broadway (1995) que revelou que a ingestão de alimento com inibidores de proteínas reduz a síntese de proteínas em seis espécies de lepidópteras, como consequência da deficiência de aminoácidos essenciais. Como resultado, os inibidores afetaram significativamente o crescimento e desenvolvimento dos insetos.

Existem diversos fatores que podem afetar a toxicidade dos inibidores de peptidase nos organismos transgênicos. A baixa concentração dos inibidores nos tecidos de plantas é comum e pode tornar a tecnologia ineficiente no controle de insetos. Vários estudos indicam que a concentração adequada para a inibição completa da atividade de protease é entre 0,5 e 1,5%, tanto em plantas transgênicas resistentes como em dietas artificiais (Jongsma e Bolter 1997). Não obstante, essa concentração pode variar dependendo das características do inibidor e da peptidase alvo. Por outro lado, as plantas podem anular o efeito do transgene (IP) quando a especificidade desse inibidor são as mesmas que as dos inibidores endógenos (Jongsma e Bolter 1997). Esse problema pode ser recorrente devido as plantas possuírem um amplo espectro de diferentes inibidores.

Os inibidores de enzimas proteolíticas podem ser usados para a proteção das culturas de forma mais amigável com o ambiente. A engenharia genética tem sido explorada para produzir plantas com genes que codificam inibidores para melhorar a resistência a insetos (Jmel et al. 2021). Atualmente, prévios estudos *in sílico* mostram os inibidores que poderiam ter maior atividade inibitória, inclusive antes de que o gene fosse ser inserido na planta. Alguns inibidores tem sido desenhados com ferramentas computacionais para bloquear enzimas proteolíticas específicas e tem sido usados com sucesso no controle de pragas (Hemmati et al. 2021). Não obstante, os insetos conseguem superar o efeito anti-nutricional dos IPs.

2.5. Mecanismos de adaptação de insetos aos inibidores de peptidase de plantas

Assim como as plantas desenvolveram inibidores para se proteger das enzimas digestivas dos herbívoros, os insetos também desenvolveram diversos mecanismos de adaptação para subverter os mecanismos de defesa das plantas. Jongsma e colaboradores (1995) revelaram pela primeira vez as estratégias adaptativas dos insetos aos IPs. Os autores demostraram que lagartas de *Spodoptera exígua* são capazes de produzir peptidases insensíveis aos inibidores produzidos pelas plantas. Na mesma época, Broadway (1995)

demostrou que nem todas as peptidases digestivas dos insetos são susceptíveis os inibidores de plantas. Posteriormente, outros estudos surgiram indicando que os insetos são capazes de secretar enzimas insensíveis ou aumentar a produção de enzimas sensíveis, em resposta à ingestão de inibidores de peptidase (Broadway 1997; Jongsma e Bolter 1997). O anterior demostrou a capacidade adaptativa dos insetos aos inibidores de peptidase de plantas.

Estudos em nosso laboratório demostraram que lagartas de *Spodoptera frugiperda* conseguem se adaptar à alimentação com IP provavelmente por alterações na atividade tríptica e quimotríptica das enzimas digestivas das lagartas (Paulillo et al. 2000). Como resultado da adaptação aos inibidores, as lagartas dessa espécie de lepidóptera conseguem obter o mesmo crescimento e desenvolvimento comparado com lagartas alimentadas sem inibidores. Outro estudo do laboratório mostrou o mecanismo o adaptativo das lagartas da broca do algodoeiro *Heliothis virescens* aos inibidores de peptidade de plantas de fumo. Neste caso, mostrou-se pela primeira vez que a adaptação aos inibidores de peptidase se dava pela oligomerização das serino peptidases, ou seja, associações de tripsinas e quimotripsinas em compostos de alto peso molecular eram insensíveis à ação dos inibidores (Brito et al. 2001).

As estratégias adaptativas dos insetos polífagos aos inibidores de peptidases foram reveladas em investigações posteriores. Por um lado, Bown et al. (2004) demostrou que a expressão de um conjunto de genes de endopeptidases de H. armigera aumenta em resposta à alimentação com inibidores de peptidase. Não obstante, depois de um período de exposição, ocorre uma redução da expressão de genes de endopeptidases cujos produtos são sensíveis à ação dos inibidores. Esse mecanismo de retroalimentação, "feedback", sugere um tipo de comunicação para selecionar as peptidases que devem ser mantidas. Outro mecanismo de tipo "shotgun", que sugere um aumento geral do conjunto de genes de peptidase em resposta aos inibidores, foi identificado em lagartas de S. frugiperda (Brioschi et al., 2007). Segundo os autores, a estratégia adotada por esta espécie pode ser metabolicamente mais custosa para o inseto, mas também poderia aumentar as chances de adaptação. Depois, De Oliveira et al. (2013) comprovaram que a ingestão de inibidores aumenta globalmente a transcrição de peptidase de tripsinas e quimotripsinas em S. frugiperda. Além disso, os autores mostraram que a transcrição dos genes SfTry5, SfTry7 e SfChy5 conferem resistência aos inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk. Os autores ainda indicaram que a estratégia de adaptação aos inibidores provavelmente seja a formação de oligômeros de tripsina, o qual dificultaria a interação das enzimas com os inibidores alvos.

Uma análise filogenética de várias espécies revelou que os genes de tripsinas são agrupadas em um mesmo clado, o qual é composto exclusivamente de sequências da família Noctuidae (Dias et al., 2015). Recentemente, Souza et al. (2016) demostraram que o mesmo conjunto de genes é regulado positivamente em resposta aos inibidores de peptidase de plantas. Os autores sugerem que essa característica é ausente em *D. saccharalis* e que

poderia ser uma das razões subjacentes à alta susceptibilidade deste tipo de insetos especialistas aos inibidores de peptidase. Além disso, estudos prévios de Souza (2013) mostraram que padrões de expressão genes de tripsinas e quimotripsinas alterados em resposta à alimentação com inibidores de peptidase eram transmitidos na geração seguinte em lagartas de *S. frugiperda*. Estes resultados indicam que existe um mecanismo de alteração da cromatina que regula a expressão desses genes e que são conservados através da meiose. Portanto, algum mecanismo epigenético, até hoje não descrito, pode estar atuando na herança dos padrões de expressão desses genes.

2.6. Epigenética

O termo epigenética foi proposto por Conrad Waddington (1942) quem a definiu como "o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, que dão origem ao fenótipo". Waddington teorizou mecanismos epigenéticos a partir de estudos avaliando a influência do ambiente no desenvolvimento fenotípico de *Drosophila*. Atualmente, o prefixo "epi" é utilizado na epigenética molecular para indicar que existe um mecanismo operando acima dos genes.

A definição de epigenética tem sido alterada com os avanços da genética molecular. Holliday e Pugh (1975); Riggs (1975) publicaram os primeiros manuscritos sobre o papel da metilação do DNA sobre a expressão de genes. Embora o termo epigenética não foi mencionado, os estudos demostraram a existência de um mecanismo que controla a expressão de genes. A relação entre a metilação do DNA e a epigenética foi descrita posteriormente por Russo et al. (1996) que postularam uma das definições de epigenética mais citadas: "estudo das alterações hereditárias mitoticamente e/ou meioticamente na função dos genes que não podem ser explicadas por alterações na sequência de DNA". Esta definição envolve três aspectos importantes: 1) alterações epigenéticas afetam a expressão dos genes, 2) as mudanças epigenéticas precisam ser estáveis e 3) não envolvem modificações na sequência do DNA.

Inicialmente, a definição envolvia exclusivamente as mudanças na expressão de genes herdáveis, restringindo as mudanças transitórias, como as indexações epigenéticas envolvidas no reparo do DNA ou as modificações de histonas que ocorrem nas fases do ciclo celular. Portanto, surgiu a necessidade de unificar dois fenômenos epigenéticos contrastantes: por um lado, as histonas podem sofrer rápidas modificações, enquanto a metilação do DNA pode ser estável durante muitos ciclos celulares. Assim, o britânico Adrian Bird (2007) redefiniu epigenética como "a adaptação estrutural de regiões cromossômicas para registrar, sinalizar ou perpetuar o estado de atividade alterada". Esta definição inclui tanto

as modificações transitórias como as mudanças estáveis mantidas através de múltiplas gerações de células.

No entanto, a herdabilidade foi considerada novamente um critério de definição dos fenômenos epigenéticos em uma edição especial da Science no ano 2010. De acordo com Bonasio et al. (2010) o sistema epigenético deve ser "herdável, auto-perpétuo e reversível". Os autores definiram os fenômenos epigenéticos como os elementos que passam de uma geração à seguinte por retroalimentação positiva através do citosol ou fisicamente nos cromossomos durante a divisão celular. O novo conceito de epigenética excluiria as modificações transitórias como as indexações epigenéticas associadas ao reparo do genoma e incluiu outras moléculas juntamente com o DNA, como os príons.

Nos últimos anos a definição de epigenética foi estendida novamente. Segundo Cavalli e Heard (2019) a epigenética pode ser definida como "o estudo de moléculas e mecanismos que podem perpetuar estados alterados de atividade gênica no contexto da mesma sequência de DNA". A definição abrange novamente estados da cromatina ou padrões de expressão de genes que não atravessam a divisão celular, como por exemplo nos neurônios que possuem vida longa na etapa pós-mitótica. A definição sugere incluir o estudo do DNA das células do organismo para a herança mitótica, como também o DNA de qualquer outro organismo envolvido na herança transgeracional, como por exemplo o DNA da microbiota.

Biólogos evolutivos sugerem termos de herança "não genética" "extra-genético" "exogenético" para agrupar todos os fatores associados ao genoma que podem alterar a expressão do genoma de um organismo e afetar a expressão de genes na prole. A definição abrange os mecanismos associados ao genoma e fatores citoplasmáticos (RNAs dos parentais, proteínas, hormônios ou nutrientes) os quais podem ser potencialmente reguladores da transcrição gênica. Embora a definição seja mais abrangente, Adrian-Kalchhauser et al. (2020) assegura que é imprecisa devido a principalmente três fatores: mecanismos genéticos e epigenéticos herdados são funcionalmente interdependentes. Em segundo lugar, processos como a metilação do DNA atuam em uma multiplicidade de maneiras dependendo da espécie e do mecanismo de indução. Finalmente, a maioria dos epialelos não são definidos em um local específico do genoma, mas são probabilísticos, induzidos por fatores regulatórios interativos. O mesmo autor sugere que a "regulação genética herdada" (IGR, inherited gene regulation) poderia ser uma definição mais concisa e engloba todos os fatores herdados que modificam a regulação de transcritos na descendência. Assim, a plasticidade transgeracional poderia ser especificada com prefixos (por exemplo, IGR mediada por metilação de DNA).

Atualmente, ainda continua o debate para se definir um marco de estudo da epigenética. A fim de direcionar ao leitor, foi considerado como "herança epigenética" para a

conservação de fenótipos adquiridos através da mitose ou meiose e "mecanismo epigenético" para indicar o papel das marcas da cromatina envolvidas na regulação de expressão de genes. Os dois processos de regulação gênica que ocorrem entre células ou indivíduos, são essenciais no desenvolvimento, comportamento, na adaptação dos organismos ao meio ambiente, entre outros processos fisiológicos. A seguir, descrevemos alguns exemplos sobre os fenômenos epigenéticos em insetos.

2.7. Fenômenos epigenéticos em insetos

Os fenômenos epigenéticos podem ter grande valor adaptativo na evolução dos insetos, considerando que a grande maioria dos estímulos ambientais não afetam a sequência do DNA. As modificações epigenéticas respondem rapidamente ao ambiente, gerando novos fenótipos potencialmente úteis para adaptação dos organismos às condições de estresse. Assim, a capacidade de resposta das modificações epigenéticas aos estímulos ambientais podem ter um papel crítico na plasticidade fenotípica e na adaptação dos insetos ao seu respectivo habitat.

A plasticidade fenotípica é um fenômeno intrinsicamente relacionado com a influência do ambiente sobre o genótipo. A plasticidade fenotípica ocorre em todos os organismos e é definida como a capacidade de um genótipo único para exibir uma gama de fenótipos. As mudanças fenotípicas nos organismos são adquiridas pela exposição a fatores bióticos ou abióticos. Estes fatores não necessariamente são condições que causam distúrbios evidentes no equilíbrio dos insetos ou que provocam efeitos prejudiciais. Ou seja, na ausência de uma resposta ao fator indutor do polimorfismo não necessariamente causa doença ou a morte dos organismos. Portanto, qualquer estímulo ambiental (condições de estresse ou não) pode causar modificações no epigenôma dos seres vivos (epimutações).

A dieta é um dos principais fatores que causam modificações nos padrões de metilação do DNA e acetilação de histonas em animais, gerando novas características fenotípicas (Burdge et al. 2007; Faulk e Dolinoy 2011). Em camundongos, por exemplo, uma série de características contrastantes podem ser controladas nas progênies alterando o tipo de alimentação da mãe (Waterland e Jirtle 2003). De forma similar, o desenvolvimento dos insetos parece estar projetado pelo estado nutricional. Larvas de abelhas alimentadas com geleia real são destinadas a se tornarem rainhas por meio da reprogramação epigenética (Kucharski et al. 2008). O metiloma das abelhas pode ser alterado pela alimentação diferencial causando mudanças discrepantes nas características morfológicas e fisiológicas (Kucharski et al. 2008). De esta forma é determinada a trajetória do desenvolvimento das larvas das

abelhas (geneticamente idênticas) até se tornarem operárias ou rainhas (Kucharski et al. 2008).

A intensidade do estímulo (intensidade, duração etc.) nem sempre está associada à magnitude da resposta fenotípica. Inclusive, os insetos podem fornecer fenótipos discretos em resposta às mudanças do ambiente como no caso do polifenismo. Embora em alguns organismos existe uma relação direta entre as mudanças na norma de reação e as modificações epigenéticas. Por outro lado, nem todas as alterações nos mecanismos epigenéticos produzem mudanças fenotípicas evidentes. Alguns estímulos ambientais causam alterações na estrutura da cromatina ou na regulação de genes (fenótipos moleculares) que podem ser transmitidos sigilosamente à prole (Grunau et al. 2019). Assim, os fenótipos adquiridos podem ter efeitos adaptativos. Por exemplo, a exposição de lagartas da *H. armígera* a doses não letais de toxinas do organismo *Bacillus turingensis* (toxinas Bt) durante 12 gerações causa uma resposta metabólica que pode ser transmitida epigenéticamente à prole (Rahman et al., 2011a). Os autores asseguram que estes mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na tolerância adquirida de lagartas da *H. armígera* às toxinas Bt.

A herança de características adquiridas em insetos tem sido estudada desde muito antes de que se ouvisse falar de epigenética. Em um experimento pioneiro, Durken (1923) demonstrou que lagartas da couve (*Pieris brassica*) que são expostas à luz laranja produzem uma maior porcentagem de pupas verdes (66%), e que esta característica pode ser transmitida à geração seguinte. De tal forma que, quando a segunda geração é exposta a luz laranja, a proporção de lagartas verdes aumenta em torno de 64% em comparação com lagartas expostas à luz comum. A nosso conhecimento, este experimento revelou pela primeira vez a transferência transgeracional de características em insetos, que foram adquiridas pela exposição a fatores ambientais.

Os estímulos ambientais podem induzir uma resposta que pode ser transmitida por mais de uma geração. Estudos epigenéticos em multigerações são poucos e dificilmente é possível isolar o componente genético e ambiental. Mutações em *D. melanogaster*, por exemplo, podem provocar mudanças epimutações estáveis que podem ser transmitidas por mais de uma geração (Cavalli e Paro 1998; Dorn et al. 1993; Xing et al. 2007). Rearranjos genômicos (inversões, translocações, transposições, inserções de transgenes) podem deixar genes eucromáticos expostos aos efeitos do silenciamento como consequência da nova posição adjacente à heterocromatina. Essa estrutura altamente compactada, alberga poucos ou nenhum gene, e é típica de telômeros e centrômeros e está distribuída na periferia do núcleo das células. O silenciamento dos genes pode ser consequência do espalhamento da heterocromatina pela iniciação em um local incorreto. Uma segunda hipótese (não exclui a

primeira) é que os genes de regiões eucromáticas são arrastados a compartimentos específicos para seu empacotamento. Mais 150 genes têm sido identificados em *D. melanogaster* como modificadores de variegação por efeito de posição (PEV, *position-effect variegation*) chamados *Su(var)* ou *E(var)* para supressores ou intensificadores de PEV, respetivamente (Schotta et al. 2003). A maioria de genes detectado não tem uma função conhecida, enquanto alguns produtos deste grupo de genes atuam como remodeladores da cromatina e modificadores de histonas (Schotta et al. 2003).

Apesar da complexidade das bases moleculares epigenéticas, alguns estudos foram publicados. Por exemplo, a exposição de mosquitos parentais Aedes albopictus a inseticidas reduz a sensibilidade da prole até por duas gerações consecutivas, mesmo em ausência do estressor químico (Oppold et al. 2015). Os autores asseguram que padrões de metilação do DNA são formados no genoma dos insetos parentais e transmitidas de forma estável aos descendentes. Os mecanismos que conferem a impressão ambiental nos seres vivos a longo prazo são desconhecidos, embora exista evidência de que as marcas epigenéticas podem resistir a reprogramação germinal durante muitas gerações. Segundo Remy (2010) a atração aos sinais olfativos do nematoide Caenorhabditis elegans pode ser transmitida para a próxima geração de forma transitória (somente à primeira geração). Não entanto, a herança transgeracional da mesma característica pode se tornar estável quando os organismos são expostos quatro gerações sucessivas ao mesmo estímulo (Remy 2010). De tal forma que, na ausência dos odores desencadeantes, a impressão olfativa foi herdada ao longo de pelo menos 40 gerações. Este estudo indica que a natureza do estímulo pode ter uma influência na estabilidade das marcas epigenéticas ao longo das gerações. Outro exemplo interessante sob a herança epigenética estável ao longo de gerações foi descoberto em flores de Linaria vulgaris. Os fenótipos com flores de simetria radial, reportados inicialmente por Linneus, diferiam das plantas de tipo selvagem com flores de assimétricas bilaterais. Um estudo posterior demostrou que o silenciamento gênico por hipermetilação do locus Lcyc é o mecanismo responsável do desenvolvimento atípico da flor de L. vulgaris (Cubas, Vincent, e Coen 1999). De tal forma que, a herança epigenética desta característica tem sido mantida por pelo menos 260 anos (Cubas et al. 1999). Embora é desconhecido o número de gerações que são necessárias para restabelecer a marca epigenética. Assim, a plasticidade comportamental adaptativa pode ser assimilada no genoma dos seres vivos depois de certo número de gerações expostas ao mesmo estímulo.

A conservação meiótica da estrutura da cromatina dos centrômeros e telômeros, são o exemplo mais concreto de herança epigenética gamética. De forma similar, certas regiões do genoma poderiam ser naturalmente resistentes à reprogramação germinal (Youngson e Whitelaw 2008). Vários estudos indicam que perturbações do epigenôma podem levar várias gerações até retornar ao seus estado inicial (Youngson e Whitelaw 2008). Esforços estão sendo realizados desde várias frentes e as bases moleculares são cada vez mais bem compreendidas.

2.8. Metilação do DNA em insetos

A metilação do DNA ocorre em quase todos os organismos eucariotos, mas o conteúdo de metilação do DNA varia amplamente em os diferentes organismos. Em insetos, o nível de metilação do DNA é relativamente baixo comparado com outros organismos. Esses níveis de metilação do DNA vão depender da heterogeneidade do genoma e atividade de elementos de transposição (Redchuk et al. 2012). Assim, o conteúdo de 5-metilcitosina em insetos varia entre 0 e 3%, enquanto que o genoma de plantas pode ter até 30% de citosinas metiladas (Field et al. 2004). Particularmente, em *H. armigera* análises de conteúdo global da 5-metil-citosina indicam que possuí ao redor do 0,9% de citosinas metiladas (Jones et al. 2018). Os mesmos autores revelam que o conteúdo de metilação do DNA é conservado nas diferentes fases do inseto.

Estudos de metiloma revelam uma associação entre o grau de metilação do DNA e a adaptação ecológica. Em gafanhotos, por exemplo, densos níveis de metilação em sequências gênicas e transposons que são homogeneamente metilados revelam as bases moleculares do polifenismo nestes organismos (Falckenhayn et al. 2013). Curiosamente, o alto conteúdo de metilação global em insetos polífagos como gafanhoto (1,3%) (Falckenhayn et al. 2013) e *H. armigera* (Jones et al. 2018) é contrastante com os baixos níveis dos insetos que geralmente é ao redor de 0,1%. O alto nível de metilação significa que a metilação do DNA poderia ter um papel na preferência alimentar.

Por outro lado, a redução de nível de metilação do DNA é causada por diferentes tipos de estresse e pode ser um importante mecanismo na adaptação ambiental. Estudos demostram que os fatores de estresse químico reduzem o nível global de metilação do DNA em *Aedes albopictus* (A. Oppold et al. 2015). Os autores indicam que a redução do conteúdo de citosinas metiladas teve uma correlação significativa com a resistência a inseticidas. Além disso, as mudanças fenotípicas e de metilação do DNA foram herdáveis por pelo menos duas gerações. Estudos de Rahman, Baker, Powis, Roush, e Schmidt, (2010) demostraram que algum tipo de mecanismo transiente em insetos de *P. xylostella* é responsável pela resistência a pesticidas e que depois desaparece em ausência de pressão de seleção. Os autores sugerem que esses estados imunes dos insetos são transmitidos pelo menos em parte por mecanismos epigenéticos

Em contraste, a desmetilação do DNA altera mudanças fenotípicas em insetos. Pegoraro, Bafna, Davies, Shuker, e Tauber, (2016) conseguiram alterar os padrões de metilação do DNA incorporando 5-azacytidine na dieta dos adultos e através do "knockdown" de genes metiltransferase em *Nasonia*. Em ambos os casos, a desmetilação do DNA suprimiu a resposta dos insetos ao fotoperíodo. De forma similar comprovou-se que a metilação do DNA tem um papel no comportamento das abelhas em função da alimentação. De tal forma que o tipo de nutrição modifica padrões de metilação do DNA em *A. melífera* e mudanças de padrões de expressão de genes entre abelhas rainhas em comparação com zangões e abelhas operárias (Strachecka et al. 2015). Os estudos citados indicam que a metilação do DNA pode ter um papel importante na adaptação ambiental pelo controle da expressão de genes.

2.9. Modificações pós-traducionais de resíduos de histonas em insetos

As histonas são a unidade básica da cromatina e são as principais proteínas presentes no nucleossomo. Cada nucleossomo é composto por duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4) e uma fita de DNA ao redor de 146 pb. As histonas são proteínas de baixo peso molecular altamente conservadas entre eucariotos e alguns procariotos. As regiões C-terminais dessas proteínas se projetam da estrutura do nucleossomo e são alvos de modificações pós-translacionais, como acetilação, (mono-, di- e tri-) metilação e fosforilação. Como resultado dessas modificações ocorrem alterações na estrutura da cromatina que afetam processos reguladores do DNA como replicação do DNA, reparação do DNA e expressão de genes. Algumas dessas alterações são transmitidas durante em linhagens celulares e entre gerações, sendo chamado de herança epigenética.

O papel das modificações de histonas no desenvolvimento dos insetos não tem sido tão explorado como, por exemplo, a metilação do DNA. No entanto, uma revisão realizada por Burggren, O 'callaghan, Finne, e Torday (2016) revelam mais de 160 modificações de histonas descritas em insetos. A técnica de espectrometría de massas tem sido utilizada para identificar variantes e modificações pós-traducionais de histonas no genoma de insetos. Assim, essa técnica é frequentemente aplicada para identificar as modificações da cromatina em função de diferentes tipos de estresse e abre a possibilidade de compreender a função dessas modificações na adaptação dos insetos ao ambiente.

Frequentemente, a verificação do papel das variantes e MPT de histonas têm sobre o controle de expressão de genes é realizado utilizando técnicas de imunoprecipitação da cromatina – ChIP. Por meio dessa técnica Lu, Denlinger, e Xu (2013) demostraram que a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K2me3) afeta a transcrição do gene PTTH em *H. armigera*, o qual afeta diretamente o tempo de desenvolvimento do inseto. Assim, os autores sugerem que o desenvolvimento da metamorfose da *H. armigera* está regulado em parte por

modificações epigenéticas. A técnica de imunoprecipitação da cromatina também tem sido utilizada para revelar os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação de expressão de genes que atuam no processo de diapausa em insetos de *H. armigera* (Bao et al. 2011).

Referências

- Adrian-Kalchhauser, I., Sultan, S. E., Shama, L. N. S., Spence-Jones, H., Tiso, S., Keller Valsecchi, C. I., e Weissing, F. J. (2020). Understanding "non-genetic" inheritance: insights from molecular-evolutionary crosstalk. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 35, Issue 12, pp. 1078–1089). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.08.011
- Bao, B., Hong, B., Feng, Q. L., e Xu, W. H. (2011). Transcription factor fork head regulates the promoter of diapause hormone gene in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, and the modification of SUMOylation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(9), 670– 679. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.04.009
- Baskar, K., e Ignacimuthu, S. (2012). Chemosphere antifeedant , larvicidal and growth inhibitory effects of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Chemosphere*, *88*(4), 384–388. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.051
- Baysal, T., e Demirdöven, A. (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme* and *Microbial Technology*, 40(4), 491–495.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396–398. https://doi.org/doi:10.1038/nature05913
- Birk, Y., Gertler, A., e Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochemical Journal*, *87*(2), 281–284. https://doi.org/10.1042/bj0870281
- Bonasio, R., Tu, S., e Reinberg, D. (2010). Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330(6004), 612–616. https://doi.org/10.1126/science.1191078. Molecular
- Boulter, D. (1993). Insect pest control by copying engineered nature crops. *Phytochemistry*, *34*(6), 1453–1466.
- Bowman, E. D. (1947). Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Journal of Biological Chemistry*, *12*(23), 547–550.
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (1997). Differentially regulated inhibitorsensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7), 625–638. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00043-X
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiological Entomology*, *29*(3 SPEC. ISS.), 278–290. https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x
- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., e Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1283–1290. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016
- Brito, L. O., Lopes, A. R., Parra, J. R. P., Terra, W. R., e Silva-Filho, M. C. (2001). Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry*

and Molecular Biology, 128(2), 365–375. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00325-0

- Broadway, R. M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*, *41*(2), 107–116. https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)00101-L
- Broadway, R. M. (1997). Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, *43*(9), 855–874. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00028-0
- Burdge, G. C., Hanson, M. A., Slater-Jefferies, J. L., e Lillycrop, K. A. (2007). Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *British Journal of Nutrition*, 97(6), 1036–1046. https://doi.org/10.1017/S0007114507682920
- Burggren, W., O 'callaghan, C., Finne, J., e Torday, J. S. (2016). Epigenetic inheritance and its role in evolutionary biology: re-evaluation and new perspectives. *Biology*, *4*(24), 22. https://doi.org/10.3390/biology5020024
- Cavalli, G., e Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, *571*(7766), 489–499. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0
- Cavalli, G., e Paro, R. (1998). The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell*, *93*(4), 505–518. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81181-2
- Chikate, Y. R., Tamhane, V. A., Joshi, R. S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2013). Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 22(3), 258–272. https://doi.org/10.1111/imb.12018
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. p., e Burgess, E. P. J. (1992). Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary a n d protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(7), 735–746.
- Cubas, P., Vincent, C., e Coen, E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Letters to Nature*, *401*, 157–161.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O., e Carvalhas, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquiza Agropecuaria Tropical*, *43*(1), 110–113.
- De Oliveira, C. F. R., de Paula Souza, T., Parra, J. R. P., Marangoni, S., de Castro Silva-Filho, M., Macedo, M. L. R., Fernando, C., Oliveira, R. De, Paula, T. De, Roberto, J., Parra, P., Marangoni, S., Silva-filho, M. D. C., Ligia, M., Macedo, R., De Oliveira, C. F. R., Souza, T. P., Parra, J. R. P., Marangoni, S., ... Macedo, M. L. R. (2013). Insensitive trypsins are differentially transcribed during Spodoptera frugiperda adaptation against plant protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(1), 19–25. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.008
- Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G., e Saumweber, H. (1993). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 11376–11380. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11376
- Durken, B. (1923). The effect of coloured light on the pupae of the cabbage white butterfly (Pieris brassicae) and the conduct of the offspring. *Archiv Fur Mikroskopische Anatomie Und Entwicklungsmechanik*, *99*(99), 222–389.

Falckenhayn, C., Boerjan, B., Raddatz, G., Frohme, M., Schoofs, L., e Lyko, F. (2013).

Characterization of genome methylation patterns in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, *216*(8), 1423–1429. https://doi.org/10.1242/jeb.080754

- Farmer, E. E., e Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-Inducible proteinase Inhibitors. *The Plant Cell*, *4*(February), 129–134.
- Faulk, C., e Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything. *Epigenetics*, 6(7), 791–797. https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209
- Field, L. M., Lyko, F., Mandrioli, M., e Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology*, *13*(2), 109–115. https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00470.x
- Green, T. R., e Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase-inhibitors in plant leaves: a possible defence mechanism against insects. *Science*, *175*(1967), 776–777. https://doi.org/10.1126/science.175.4023.776
- Grunau, C., Le Luyer, J., Laporte, M., e Joly, D. (2019). The epigenetics dilemma. *Genes*, *11*(1), 23. https://doi.org/10.3390/genes11010023
- Habib, H., e Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68–85.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *chemical reviews*, *10*2(12), 4501–4524. https://doi.org/10.1021/cr000033x
- Hemmati, S. A., Karam Kiani, N., Serrão, J. E., e Jitonnom, J. (2021). Inhibitory potential of a designed peptide inhibitor based on zymogen structure of trypsin from spodoptera frugiperda: in silico insights. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 27(3), 1677–1687. https://doi.org/10.1007/s10989-021-10200-4
- Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F., e Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Letters to Nature*, 330(12), 160–163.
- Holliday, R., e Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. source: Science, New Series, 187(4173), 226–232. http://www.jstor.org/stable/1739057
- Huang, Y., Crim, J. W., Nuss, A. B., Brown, M. R., Npf, D., Npf, H., e Npf, H. (2011). Peptides neuropeptide f and the corn earworm, *Helicoverpa zea:* a midgut peptide revisited. *Peptides*, *32*(3), 483–492. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.09.014
- Jmel, M. A., Aounallah, H., Bensaoud, C., Mekki, I., Chmelař, J., Faria, F., M'ghirbi, Y., e Kotsyfakis, M. (2021). Insights into the role of tick salivary protease inhibitors during ectoparasite-host crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 892. https://doi.org/10.3390/ijms22020892
- Jones, C. M., Lim, K. S., Chapman, J. W., e Bass, C. (2018). Genome-wide characterisation of dna methylation in an invasive lepidopteran pest, the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Genes/Genomes/Genetics*, *8*(March), 779–787. https://doi.org/10.1534/q3.117.1112
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W. J., e Ryan, C. A. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(August), 8041–8045. https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8041

Jongsma, M. A., e Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors.

34

Journal of Insect Physiology, *43*(10), 885–895. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00040-1

- Kriticos, D. J., Ota, N., Hutchison, W. D., Beddow, J., Walsh, T., Tay, W. T., Borchert, D. M., Paula-moreas, S. V, e Czepak, C. (2015). The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in north america: is it just a matter of time? *PLoS ONE*, 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119618
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., e Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, *319*(5871), 1827–1830. https://doi.org/10.1126/science.1153069
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, *101*(2635), 668–669. https://doi.org/10.1126/science.101.2635.668
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor : ii. general properties. *The Journal of General Physiology*, *30*(4), 291–310. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19873496
- Liu, J., Huang, W., Chi, H., Wang, C., Hua, H., e Wu, G. (2017). Effects of elevated CO2 on the fitness and potential population damage of *Helicoverpa armigera* based on two-sex life table. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01257-7
- Lu, Y. X., Denlinger, D. L., e Xu, W. H. (2013). Polycomb repressive complex 2 (PRC2) protein ESC regulates insect developmental timing by mediating H3K27me3 and activating prothoracicotropic hormone gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23554–23564. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482497
- Mello, M. O., Tanaka, A. S., e Silva-Filho, M. C. (2003). Molecular evolution of Bowman–Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(1), 103–112. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00373-1
- Oppold, A., Kreß, A., Bussche, J. Vanden, Diogo, J. B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte, M. B., e Müller, R. (2015). Ecotoxicology and environmental safety epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the asian tiger mosquito *Aedes albopictus. Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036
- Paulillo, L. C. M. S., Lopes, A. R., Cristofoletti, P. T., Parra, J. R. P., Terra, W. R., e Silva-Filho, M. C. (2000). Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *Journal of Economic Entomology*, *93*(3), 892–896. https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.892
- Pedgley, D. E., Tucker, M. R., e Pawar, C. S. (1987). Windborne migration of *Heliothis armigera* (hubner) (lepidoptera: noctuidae) in india. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(4/5/6), 599–604. https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1742758400022669
- Pegoraro, M., Bafna, A., Davies, N. J., Shuker, D. M., e Tauber, E. (2016). DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia. Genome*, *26*(2), 203–210. https://doi.org/10.1101/gr.196204.115
- Rahman, M., Glatz, R., Roush, R., e Schmidt, O. (2011). Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from Bacillus thuringiensis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1443–1448. https://doi.org/10.1128/AEM.01467-10
- Rahman, M. M., Baker, G., Powis, K. J., Roush, R. T., e Schmidt, O. (2010). Induction and transmission of tolerance to the synthetic pesticide emamectin benzoate in field and laboratory populations of diamondback moth. *Journal of Economic Entomology*, *103*(4), 1347–1354. https://doi.org/10.1603/EC09171
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., e Bateman, A. (2014). Using the MEROPS database for proteolytic enzymes and their inhibitors and substrates. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Issue December, pp. 1.25.1-1.25.33). John Wiley e Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0125s48
- Redchuk, T. A., Rozhok, A. I., Zhuk, O. W., Kozeretska, I. A., e Mousseau, T. A. (2012). DNA methylation in *Drosophila melanogaster* may depend on lineage heterogeneity. *Cytology* and Genetics, 46(1), 58–61. https://doi.org/10.3103/S0095452712010094
- Rehman, S., Aziz, E., e Akhtar, W. (2017). Structural and functional characteristics of plant proteinase. *Biotechnology Letters*, 39(5), 647–666. https://doi.org/10.1007/s10529-017-2298-1
- Reigada, C., Guimarães, K. F., e Parra, J. R. P. (2016). Relative fitness of *Helicoverpa* armigera (lepidoptera: noctuidae) on seven host plants: a perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1), 3. https://doi.org/10.1093/jisesa/iev158
- Remy, J. J. (2010). Stable inheritance of an acquired behavior in caenorhabditis elegans. In *Current Biology* (Vol. 20, Issue 20). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.013
- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. Cytogenet, Cell Genetic, 14, 9–25.
- Rinderknecht, H. (1986). Activation of pancreatic zymogens normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Digestive Diseases and Sciences*, *31*(3), 314–321.
- Russo, V. E. A. (Vincenzo E. A. ., Martienssen, R. A., e Riggs, A. D. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300304567
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R., e Reuter, G. (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 67–75). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00138-6
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., e Krishna Kumar, N. K. (2018). Double-stranded RNA-mediated suppression of trypsin-like serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 746–761. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2584-3
- Souza, T. P. (2013). Efeito dos inibidores de proteinase de soja no padrão de expressão de proteinases de *Spodoptera frugiperda*. Tese doutorado em Genética e Melhoramento de Platnas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. https://doi.org/10.11606/T.11.2013.tde-05112013-150120
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhano, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S., e Silva-Filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 196–197, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007

- Strachecka, A., Olszewski, K., Bajda, M., e Demetraki-Paleolog, J. (2015). Natural larval diet differently influences the pattern of developmental changes in DNA 5-methylcytosine levels in *Apis mellifera* queens as compared with workers and drones. *Biochemistry* (*Moscow*), 80(8), 1019–1025. https://doi.org/10.1134/S0006297915080076
- Dias, A., Dias, R. O., Via, A., Brand, M. M., Silva-filho, M. C., Brandão, M. M., Dias, A., e Silvafilho, M. C. (2015). Digestive peptidase evolution in holometabolous insects led to a divergent group of enzymes in lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.009
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, *41*, 10–13. https://doi.org/10.1093/ije/dyr184
- Waterland, R. A., e Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(15), 5293–5300. https://doi.org/10.1128/mcb.23.15.5293-5300.2003
- Xing, Y., Shi, S., Le, L., Lee, C. A., Silver-Morse, L., e Li, W. X. (2007). Evidence for transgenerational transmission of epigenetic tumor susceptibility in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *3*(9), 1598–1606. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030151
- Youngson, N. A., e Whitelaw, E. (2008). Transgenerational epigenetic effects. In Annual Review of Genomics and Human Genetics (Vol. 9, pp. 233–257). Annual Reviews . https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164445
- Zalucki, M., Murray, D., Gregg, P., Fitt, G., Twine, P., e Jones, C. (1994). Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Heliothis punctigera* (Wallengren) in the inland of Australia - larval sampling and host-plant relationships during winter and spring. *Australian Journal of Zoology*, *42*(3), 329. https://doi.org/10.1071/ZO9940329

3. CAPÍTULO 2 - A ADAPTAÇÃO DE LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera* AOS INIBIDORES DE PEPTIDASE DE SOJA PODE SER MEDIADA POR HERANÇA EPIGENÉTICA

Resumo

Fenótipos moleculares induzidos por estímulos ambientais podem ser transmitidos à descendência por herança epigenética. A fim de verificar se a adaptação dos insetos generalistas aos mecanismos de defesa das plantas pode envolver um controle epigenético, dois insetos polífagos Helicoverpa armigera foram alimentados com dietas artificiais suplementadas com inibidores da peptidase de soja (IPs). As moléculas anti-nutricionais não causaram nenhum efeito negativo nos parâmetros adaptativos dos insetos. A regulação de enzimas digestivas foi o mecanismo mais importante responsável pela adaptação de os dois insetos geralistas ao efeito anti-nutricional dos IPs. Análise de RNA-seq do sistema digestivo da primeira geração (lagartas alimentadas com e sem IPs) e das progênies de larvas da H. armigera expostas aos IPs (lagartas alimentadas sem IPs) revelou que grande parte do perfil transcricional é transmitido por herança epigenética. Aproximadamente 40% do perfil transcricional induzido pelos IPs foi transmitido de uma geração à seguinte, mesmo quando as progênies não foram expostas à dieta com IPs. Desta forma, foram identificados 496 epialelos potenciais que podem ser transmitidos por pelo menos uma geração. Este trabalho sugere que mecanismos epigenéticos podem fazer parte da maquinaria molecular de colonização ao amplo número de plantas hospedeiras, influenciando o curso evolutivo de H. armigera.

Palavras-chave: Tripsinas, quimotripsinas, epigenética, *Helicoverpa armigera*, metilação do DNA, plasticidade fenotípica, insetos polífagos.

Abstract

Molecular phenotypes induced by environmental stimuli can be transmitted to offspring through epigenetic inheritance. In order to verify whether the adaptation of generalist insects to plant defense mechanisms may involve epigenetic control, two polyphagous insects Helicoverpa armigera and Spodoptera frugiperda were fed artificial diets supplemented with soy peptidase inhibitors (SPI). Anti-nutritional molecules had no negative effect on the adaptive parameters of insects. The regulation of digestive enzymes was the most important mechanism responsible for the adaptation of the two generalist insects to the anti-nutritional effect of SPI. RNA-seg analysis of digestive system of the first generation (larvae fed with and without SPI) and of the progenies of *H. armigera* larvae exposed to SPI (larvae fed without SPI) revealed that a large part of the transcriptional profile was transmitted by epigenetic inheritance. Approximately 40% of the SPI-induced transcriptional profile was transmitted from one generation to the next, even when the progenies were not exposed to the SPI diet. Thus, 496 potential epialleles can be transmitted for at least one generation. This work suggests that epigenetic mechanisms may be part of the molecular machinery of colonization to a large range of host plants, influencing the evolutionary course of *H. armigera*.

Keywords: Trypsins, chymotrypsins, epigenetics, *Helicoverpa armigera*, DNA methylation, phenotypic plasticity, polyphagous insects.

3.1. Introdução

Nada existe para sempre. Desde as estrelas até os átomos que as compõem tem um destino fatal no universo (Verresen, Moessner, e Pollmann 2019).

A vida parece desejar a imortalidade. Uma das características fundamentais dos seres vivos é a necessidade de propagar informações metabólicas do ambiente ao longo do tempo (Kempes e Krakauer 2021). Provavelmente desde o surgimento das primeiras células primitivas foram necessários mecanismos para transmitir informações adaptativas a traves do tempo. As análises filogenéticas e registros fósseis suportam que o surgimento da vida há mais de 4 bilhões de anos (Hedges 2002; Nutman et al. 2016), mas apenas há sete décadas foi descoberto a estrutura da molécula que armazena a informação genética nos seres vivos (Watson e Crick 1953). Mais recentemente tem sido revelados novos mecanismos responsáveis do fluxo da informação entre gerações de seres vivos, o que geralmente está associado ao campo de estudo da epigenética.

Os avanços da biologia molecular têm contribuído a redefinir a epigenética inúmeras vezes. O vínculo entre a metilação do DNA e expressão gênica levantou uma das definições de epigenética mais citadas "estudo das alterações hereditárias mitoticamente e/ou meioticamente na função dos genes que não podem ser explicadas por alterações na sequência de DNA" (Russo et al. 1996).

Os estímulos ambientais podem afetar o epigenôma dos insetos (epimutações) alterando os padrões de reprogramação transcricional, que em alguns casos são herdados ao longo de gerações (epialelos). Os principais mecanismos moleculares responsáveis do fluxo de informação epigenética em insetos incluem os RNAs não codantes, a metilação do DNA e as modificações de histonas (Glastad, Hunt, e Goodisman 2019). Estes mecanismos epigenéticos são responsáveis por traduzir os estímulos ambientais a características fenotípicas herdáveis que podem influenciar significativamente a seleção natural (Mukherjee et al. 2017).

Registros da herança de características adquiridas existem desde antes que se ouvisse falar de epigenética. A nosso conhecimento, o primer experimento registrado de herança epigenética em insetos foi descrito por Durken (1923). Os autores demostraram que o cumprimento de onda da luz pode influenciar a cor das progênies das lagartas da couve (*Pieris brassica*), mesmo na ausência do estímulo. Publicações posteriores suportam a ideia da herança epigenética transgeracional em insetos (revisado por Matsuura, 2020; Mukherjee e Vilcinskas, 2019). Por exemplo, a resistência a toxinas em *H. armigera* (Rahman et al. 2011a), a resistência a inseticidas em *Aedes albopictus* (A Oppold et al. 2015) *Galleria mellonella* (Mukherjee et al. 2017), a cor do olho em *Drosophila* (Ciabrelli et al. 2017). A dieta é um dos principais fatores que causam modificações epigenéticas em insetos (Chittka e

Chittka 2010; Mukherjee, Twyman, e Vilcinskas 2015) e outros animais, afetando diretamente os padrões de metilação do DNA e acetilação de histonas (Burdge et al. 2007; Faulk e Dolinoy 2011). Em camundongos, por exemplo, uma série de fenótipos discrepantes podem ser formados nas progênies alterando o tipo de alimentação da mãe (Waterland e Jirtle 2003). Em humanos é amplamente aceito que restrições nutricionais das mães causam modificações epigenéticas que são transmitidas por herança materna ao embrião por mais de uma geração (Godfrey et al. 2007; Pentecost e Meloni 2020; Ramírez-Alarcón et al. 2019).

Inclusive, o desenvolvimento dos insetos parece estar projetado pelo estado nutricional dos estágios imaturos. O metiloma das abelhas pode ser alterado pela alimentação com geleia real determinando a trajetória do desenvolvimento das larvas (geneticamente idênticas) até se tornarem operárias ou rainhas (fenotipicamente discrepantes) (Kucharski et al. 2008). Certamente, o polifenismo em organismos que são genéticamente iguais é um assunto espinhoso para ser explicado exclusivamente pelo determinismo genético.

Os insetos polífagos como a *H. armigera* e *Spodoptera frugiperda* são exemplos de raridades evolutivas. Loxdale et al. (2011) asseguram que os insetos generalistas são uma improbabilidade evolutiva na natureza. A seleção natural dirige as espécies animais a nichos ecológicos especializados, de tal forma que a evolução não poderia operar na formação espécies generalistas (Loxdale et al. 2011). A teoria de que a evolução da preferência à especialização está apoiada em que o 98% dos insetos herbívoros são especialistas e constituem quase a metade de todas as espécies eucariotas da terra (Silva e Clarke 2020). Mecanismos moleculares de regulação transcricional tem sido propostos para explicar a polifagia em insetos (Malka et al. 2021; Souza et al. 2016).

A reprogramação transcricional está intrinsicamente relacionada com os mecanismos epigenéticos (Chittka e Chittka 2010; Mukherjee et al. 2017). Os mecanismos subjacentes da transferência da informação epigenética das células somáticas às células germinativas, são pobremente compreendidos. Aqui desafiamos o dogma do determinismo genético, sugerindo que grande parte dos fenótipos moleculares adquiridos podem ser transmitidos por herança epigenética, e alguns caracteres podem ter valor adaptativo.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Extração de inibidores de peptidase de soja

Os IPs foram extraídos de sementes da variedade Potência (BMX POTÊNCIA RR). Uma porção de 100 g foi triturada no liquidificador usando 1 L de solução salina (NaCl 0,15 M) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada em oito camadas de gaze para facilitar a remoção do material sólido. Uma etapa posterior de separação por densidade foi realizada a 3000xg durante 20 minutos a 4 °C. Após coletar o sobrenadante e calcular o seu volume, foi acrescentada acetona gelada em condições de agitação até alcançar uma concentração aproximada de 70% (v/v). O estrato foi precipitado por centrifugação a 6000xg durante 20 minutos a 4 °C. Finalmente, o precipitado foi liofilizado durante 72 horas para remover a acetona residual do extrato semipurificado de IPs.

3.2.2. Análise da concentração dos inibidores

A quantidade de proteínas no concentrado foi determinada de acordo com a metodologia desenvolvida por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para determinar o potencial inibitório do concentrado de IPs sobre a atividade proteolítica, foi realizada uma curva padrão quantificando a atividade tríptica remanescente de alíquotas de tripsina bovina incubadas com doses crescentes do concentrado de IPs. A quantificação da atividade tríptica foi determinada utilizando o substrato cromogênico *N*-benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA) (Erlanger, Kokowsky, e Cohen 1961) que é específico para tripsinas.

As leituras de absorbância para avaliação da atividade da tripsina foram realizadas em cubetas de quartzo de 3 ml. Nestes recipientes foram adicionados 100 µL de tripsina a uma concentração de 15,4 µg/ml em 0,001N HCl, 2,6 ml de tampão (0,046M Tris-HCl, pH 8,1 com 0,0115M CaCl₂), concentrações crescentes do extrato IPs (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80 e 100 µl) e 0,3 ml do substrato TAME (0,01M). A concentração de tripsina inicial foi de 1 mg/ml de tripsina (Sigma) em 0,001M HCl. Essa concentração foi confirmada por absorbância a 280 nm (mg tripsina por ml=Abs₂₈₀*0,70). O espectrofotômetro foi zerado com uma solução contendo todos os componentes do ensaio menos a tripsina e o extrato de IPs. Doses crescentes do concentrado proteico IPs foram incubados com a solução de trabalho de tripsina e 200 µL de tampão durante 5 minutos a temperatura ambiente. Depois do período de incubação, adicionou-se o restante do tampão e do substrato. Por último, as leituras de absorbância a 247 nm foram registradas a cada 30 segundos durante os 4 minutos imediatamente depois da adição do substrato. Este experimento foi repetido 3 vezes. Para obtenção da atividade total da tripsina foi realizado o mesmo ensaio sem a adição dos inibidores.

Os ensaios de inibição de quimotripsinas foram realizados como descrito anteriormente, usando o substrato benzoil-L-tirosina etil ester –BTEE (Sigma). As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo de 3 ml. Em estes recipientes foi adicionado 100 μ L de quimotripsinas (concentração de 15,4 μ g/ml em 0,001N HCl), 1,5 ml de tampão (0.08M Tris-HCl, pH 7,8 com 0,1M CaCl₂) concentrações crescentes do extrato IPs (0, 1, 3, 5, 10, 15,

20, 30, 50, 80 e 100 µl) e 1,4 ml do substrato BTEE (0,00107M). A solução da quimotripsinas foi preparada a partir de uma solução concentrada de 1 mg/ml de quimotripsinas (Sigma) em 0,001M HCI. A confirmação da concentração da enzima realizou-se por absorbância a 280 nm (mg quimotripsinas por ml = $Abs_{280}*0,49$). O espectrofotômetro foi zerado com uma solução contendo todos os componentes do ensaio menos a solução de quimotripsinas e o extrato IPs. Doses crescentes de concentrado proteico IPs foram incubados com a solução de trabalho de tripsina e 200 µL de tampão durante 5 minutos a temperatura ambiente. Depois do período de incubação, adicionou-se o restante do tampão e do substrato. Por último, as leituras de absorbância a 256 nm, foram registradas a cada 30 segundos durante os 4 minutos imediatamente depois da adição do substrato. Este experimento foi repetido 3 vezes para obter uma média dos incrementos. Para obtenção da atividade total da quimotripsina realizou-se o mesmo ensaio sem a adição do extrato enriquecido com IPs.

3.2.3. Criação e manutenção de insetos de H. armigera

Os insetos de *H. armigera* foram cedidos pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, responsável pelo Laboratório de Biologia de Insetos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. As colônias de insetos foram acondicionadas individualmente em tubos de vidro, contendo a dieta artificial descrita por Greene et al. (1976) suplementada ou não (dependendo de cada tratamento) com o concentrado ativo de IPs. As condições do ambiente interior da sala de criação foram mantidas entorno de 25 °C de temperatura, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 h (dia: noite). As lagartas foram expostas à dieta artificial contendo 0,5% (p/v) de IPs desde a eclosão das lagartas até o final do experimento. Amostras de intestinos de lagartas de cada tratamento foram coletadas quando os insetos atingiram o sexto instar (último instar) de desenvolvimento.

3.2.4. Análise fenotípico de insetos de *H. armigera* expostos aos inibidores

Os insetos foram avaliados diariamente em todas as fases de desenvolvimento. Para a análise fenotípica na fase de lagartas, populações de 150 insetos foram usadas por cada tratamento. Posteriormente, grupo de 25 adultos casais foram separados em gaiolas independentes para avaliar o desenvolvimento reprodutivo. Ao longo do experimento foi avaliado a duração e viabilidade de cada fase de desenvolvimento, a sobrevivência dos insetos em cada estágio, o número de ovos colocados diariamente por fêmea, o peso de pupas com 24 horas de idade. Os dados foram testados quanto a normalidade e independência dos resíduos. Posteriormente, foi realizado uma análise de variância para cada variável e os tratamentos com diferencias significativas foram comparados utilizando o teste de Tukey (*p*<0,05).

3.2.5. Criação de gerações de insetos de H. armigera

Após a coleta de uma amostra de insetos da primeira geração, as lagartas restantes foram criadas visando obter uma segunda geração. Portanto, as lagartas de cada grupo continuaram sendo alimentadas com cada tratamento proposto (com e sem IPs) até a atingir a fase de pupa. As pupas obtidas foram retiradas da dieta com auxílio de uma pinça higienizada com solução de sulfato de cobre a 0,65% e colocadas em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm de altura x 25 cm de diâmetro). Cada gaiola foi revestida internamente com folhas de papel sulfite A4 e fechadas na parte superior com tecido tipo *tule.* Os adultos provenientes de cada tipo de alimentação (com e sem IPs) emergiram dentro das gaiolas e foram alimentados com solução aquosa de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas na sala de criação nas mesmas condições dos parentais.

As posturas foram retiradas a cada três dias, e ao mesmo tempo, foi substituída a solução de mel. As posturas contidas no papel e no tecido tipo *tule* foram recortadas e colocadas em copos plásticos transparentes (500 ml), juntamente com um pedaço de papel filtro umedecido com água destilada para manter a umidade interna. Os copos com as posturas foram mantidos em câmaras climatizadas reguladas à 25 °C e fotoperíodo de 14:10 h (dia:noite) até a eclosão das lagartas. Estas lagartas recém eclodidas foram transferidas com auxílio de um pincel fino, para copos plásticos transparentes de 100 ml contendo novamente os tratamentos de dieta artificial com e sem IPs (de acordo com cada tratamento). Estas lagartas foram mantidas nas suas respectivas dietas até alcançar o último instar, da mesma forma que os seus progenitores. O fluxograma do experimento é esquematizado na (Figura 1).



Figura 1. Fluxograma do experimento conduzido para estudar a herança de padrões de expressão gênica adquiridos em insetos de *H. armigera* pela alimentação com inibidores de peptidase de soja.

Nesta fase do desenvolvimento, as lagartas de segunda geração foram coletadas novamente para realizar avaliações de expressão gênica. Os resultados foram comparados com as lagartas da primeira geração (expostas ou não aos IPs) para estudar o tipo de herança transgeracional. Para os estudos de expressão gênica foram utilizados intestinos das lagartas do último instar do desenvolvimento.

A identificação massiva de epialelos foi realizada analisando o transcritoma do sistema digestivo da primeira geração (alimentadas com e sem IPs) e segunda geração (progênies das lagartas alimentadas aos IPs) (Figura 1). Um grupo de lagartas foi alimentada com dieta controle e com IPs (geração F₀) como descrito anteriormente. As lagartas dos dois tratamentos foram criadas com o propósito de obter uma segunda geração. As progênies geradas a partir de um grupo de lagartas expostas aos IPs foram usadas nos experimentos de RNA-seq. Cada tratamento (dieta controle-F₀, dieta suplementada com IPs-F₀, e progênies de lagartas expostas aos IPs foram usadas nos experimentos de lagartas expostas aos IPs-F₁) foi composto por três replicatas para um total de 9 unidades experimentais. Grupos de 10 lagartas foram usados para a extração de intestinos de cada replicata. O RNA total foi extraído usando o *kit RNAeasy Mini Plant* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA extraído foi determinado por *Nanodrop Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e a integridade por gel de agarose 1% e *bioanalyzer* (Agilent Technologies, Inc).

3.2.6. Análise de RNA-seq

O sequenciamento do RNA foi realizado na empresa NGS Soluções Genômicas. As bibliotecas foram preparadas por enriquecimento de poli A com base no protocolo Illumina TruSeg Stranded mRNA Sample Prep. O sequenciamento foi realizado na plataforma da Illumina HiSeq 2500 v4 por meio do protocolo paired-end e os fragmentos esperados foram de 100 pares de bases (2x100 pb). A análise de controle de qualidade foi realizada pelo programa FastQC V 0.11.9 (Schmieder et al. 2011). O pré-processamento dos dados como a trimagem dos adaptadores foi realizado com o programa Trimmomatic V 0.32 (Bolger et al. 2014). A remoção foi realizada para os reads de qualidade menor a Phred<35. Da mesma forma foram removidos os adaptadores oriundos do sistema Illumina. O mapeamento dos reads no genoma de referência da Helicoverpa armigera depositado no NCBI (GCA 002156985.1 Harm 1.0), foi realizado com o programa STAR V 2.7.0 (Dobin et al. 2013). O mapeamento dos reads nas sequencias codantes foram usados os parâmetros padrão do programa. Para cada biblioteca foi gerado um arquivo com extensão bam, contendo o alinhamento dos fragmentos em relação ao genoma de referência da H. armigera. A fim de aumentar a consistência e integridade dos dados de RNA-seg descartamos duas amostras que apresentaram desvios muito discrepantes (Figura S1-S2), as quais não agruparam com nenhum dos tratamentos. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos usando o pacote DESeq2 (Love et al. 2014) do software R V 4.0.5 (https://www.r-project.org/). Para isso, foram usados os resultados de mapeamento dos reads no genoma da H. armigera do software STAR. Uma vez obtidos os resultados, foram considerados como genes diferencialmente expressos de forma significativa aqueles que tiveram valores inferiores a p-adjust<0.05, o qual corrige os erros associados com os múltiplos testes. Para cada conjunto de genes superexpressos ou silenciados parcialmente foram selecionados apenas aqueles com valores >1 ou < -1 Log2 Fold-Change. Os genes diferencialmente expressos identificados foram usados para a construção de diagramas de Venn, no programa R V 4.0.5 (https://www.rproject.org/).

3.2.7. Mineração de dados de RNA-seq depositados no NCBI

Os dados brutos de experimentos de RNA-seq de *H. armigera* foram baixados do NCBI. Foram selecionados experimentos que usaram o tecido de intestino para a extração de ácidos nucleicos e posterior quantificação de transcritos. A sequência de reads brutos (SRR) estão descritas na Tabela S1. A análise de controle de qualidade, a trimagem e o mapeamento dos *reads* contra o genoma de referência foram realizadas como descrito anteriormente no item 3.3.6. Os dados de transcritos por milhão (TPM) foram padronizados e plotados usando

as funções scale e Heatmaply, respetivamente, do software R V 4.0.5 (https://www.r-project.org/).

3.2.8. Validação de dados do transcritoma por RT-qPCR

A extração do RNA foi realizada usando 25 mg de tecido de intestinos previamente macerados em nitrogênio líquido. Os três tratamentos correspondem às lagartas provenientes da primeira geração (alimentadas com dieta artificial com e sem IPs) e as lagartas da segunda geração (progênies das lagartas expostas aos IPs), os quais foram repetidos três vezes e cada repetição foi conformada por lotes de cinco lagartas. A extração de RNA foi realizada usando o *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação das amostras foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a 260 nm e a pureza das amostras foi verificada pela razão dos valores de absorbância a 260/280 e 260/230 nm. Finalmente, a integridade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose ao 1%.

A síntese de cDNA foi realizada usando 1 µg de RNA total utilizando o *kit ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, 1 µL do primer Oligo (dT) 18 (50 µM) foi adicionado ao RNA total e o volume completado para 5 µL com água ultrapura. Depois, os tubos foram incubados a 70 °C durante 10 minutos e colocados em gelo durante 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-IITM (Promega). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador, com um ciclo de reação de 25 °C durante 10 minutos, 42 °C durante 60 minutos e 72 °C durante 10 minutos. A quantificação das amostras foi realizada pela leitura em espectrofotômetro a 260 nm e a pureza das amostras foi verificada pela razão dos valores de absorbância a 260/280 e 260/230 nm.

As reações de amplificação por RT-qPCR quantitativo foram realizadas no equipamento *StepOne[™] Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Cada tratamento continha três repetições independentes e foram usadas duas replicatas técnicas para cada repetição. O volume final de cada reação foi de 25 µL, com uma solução de 3 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 e 7,9 µL de água livre de nucleases. O programa de amplificação foi de um ciclo de 50 °C por dois minutos, outro ciclo a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 58-62 °C (dependendo da temperatura de anelamento do iniciador) durante um minuto. A curva de "Melting" foi realizada após a amplificação dos fragmentos a

partir da temperatura de anelamento do iniciador e permitindo incrementos de 1 °C até atingir 95 °C.

Os iniciadores foram desenhados a partir das sequências genicas de genes serino peptidases de *H. armigera*. O *software Primer-Blast* foi utilizado para desenhar iniciadores específicos para cada sequência. Os genes foram selecionados quando apresentaram o domínio catalítico característico das serino peptidases. Posteriormente, realizaram-se amplificações de PCR não quantitativo para determinar a temperatura de anelamento dos iniciadores. Em cada reação, 100 ng de cDNA foi amplificado 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). O tamanho do amplicon foi analisado por eletroforese em gel de agarose ao 1%. Posteriormente, os produtos de amplificação foram precipitados e sequenciados para a confirmação da especificidade dos iniciadores e da identidade do produto amplificado.

A eficiência de amplificação dos iniciadores foi determinada usando o programa LinReg (Ramakers et al. 2003). As análises de expressão relativa dos genes foram realizados usando o programa Relative Expression Software Tell 384 - REST 384® (Pfaffl 2001). Para o teste estatístico adotou-se o padrão de 1000 randomizações entre os valores de fluorescência (CTs: "cycle threshold") dos controles e tratamentos de cada gene e teste t (p<0,05). Os genes de proteínas ribossomais RPL27 e RsP18 foram utilizados como genes de referência para a normalização dos valores de expressão.

3.2.9. Identificação de sequências de genes serino peptidases

Sequências de genes serino peptidases foram recuperadas do banco de dados do *NCBI GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome) usando o programa *BLASTP*. As sequências previstas foram divididas em serino peptidases selecionando aquelas que apresentam o domínio característico da família (IPR001254). Uma segunda seleção se realizou identificando as sequências que apresentavam a tríade catalítica completa (His57, Asp102 e Ser195). Posteriormente, se realizou a classificação das tripsinas e quimotripsinas de acordo com o aminoácido na posição 159 (Asp para tripsina).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. O extrato proteico contém inibidores predominantemente contra tripsinas

O extrato semipurificado de IPs apresentou ação inibitória predominante contra tripsinas. De acordo com as curvas de inibição, com 5 µL de extrato foi possível inibir até

quase o 80% da atividade tríptica (Figura 2). Para inibir os mesmos valores da atividade remanescente da quimotripsina foi necessário adicionar dez vezes mais volume do extrato IPs (Figura 3). A estimativa da redução de 50% da atividade remanescente da tripsina (IC₅₀) ocorreu com adição de 3.8 μ L do inibidor. Em contrapartida, o IC₅₀ da quimotripsina foi atingido com cerca de 24.3 μ L do extrato. Com base nesses resultados, a concentração de inibidores de tripsina resultou em 11 mg por 100 mg de extrato (11%) e 1.4 mg de inibidor de quimotripsina por 100 mg de extrato (1.4%).



Figura 2. Atividade inibitória dos extratos proteicos de soja para tripsinas.



Figura 3. Atividade inibitória dos extratos proteicos de soja para quimotripsinas.

Os ensaios de inibição sugerem que a extração forneceu um substrato enriquecido principalmente com inibidores do tipo Kunitz. Este grupo de inibidores possui um sítio ativo que inibe a tripsina formando um complexo rígido com esta proteína, o qual se dissocia muito lentamente (Habib e Fazili 2007). Em contraste, a afinidade dos inibidores Kunitz com as quimotripsinas é menor, como resultado de ligações fracas que inibem parcialmente atividade destas peptidases. Os resultados dos ensaios de inibição da quimotripsinas pode ser a consequência da baixa afinidade dos inibidores Kunitz com esta protease. A soja é caracterizada por produzir outros inibidores incluindo um grupo da família Bowman-Birk. Não obstante, a montagem e anotação do genoma da soja revelou que possui 26 genes que codificam inibidores de tipo Kunitz e apenas 12 genes de tipo Bowman-Birk (Shen et al. 2018). Além disso, a estrutura deste grupo de inibidores possui dois domínios independentes, um com a capacidade de inibir tripsinas, enquanto, o outro domínio é um potente inibidor de quimotripsinas. Pelo fato de que os valores de inibição foram diferentes para tripsinas e quimotripsinas, pode ser que a presença deste grupo de inibidores no estrato seja menor comparado com a concentração de inibidores tipo Kunitz.

3.3.2. As lagartas de *H. armigera* são resistentes à alimentação com IPs

A incorporação de inibidores na dieta de *H. armigera* não causou praticamente nenhum efeito fenotípico sobre os parâmetros biológicos do inseto. O período larval foi a única característica afetada na presença dos IPs. Os estágios imaturos tiveram um período ligeiramente menor (0,4 dias) quando são alimentados com IPs (Tabela 1). A longevidade das pupas e das mariposas teve em média 14,6 e 9,1 dias, respetivamente, quando foram alimentadas com qualquer tratamento (Tabela 1). A incorporação dos inibidores na dieta tampouco afetou o peso das pupas, embora o peso dos machos tenha sido ligeiramente maior quando as lagartas foram alimentadas com dieta controle (Figura 4). A taxa de sobrevivência do inseto e o número de postura das fêmeas foi similar para os dois tratamentos (Figura 5). O número médio de ovos registrado durante o período de vida das fêmeas foi de 960 e 935 ovos para os adultos que resultaram de lagartas expostas à alimentação sem e com IPs, respectivamente (Figura 6).

Estágio	Dieta	Média	Teste de Tukey (<i>p</i> <0,05)
Larva	Artificial	18,0	а
	Artificial com IPs (0.5%)	17,6	b
Pupa	Artificial	14,7	а
	Artificial com IPs (0.5%)	14,5	а
Adulto	Artificial	9,3	а
	Artificial com IPs (0.5%)	9,0	а

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento de insetos *H. armigera* alimentados com IPs



Figura 4. Peso de pupa de *H. armigera* provenientes de lagartas alimentadas com IPs.



Figura 5. Taxa de sobrevivência de quatro estágios de *H. armigera* alimentadas com IPs.



Figura 6. Número de ovos produzidos no período de longevidade das fêmeas. Os sombreamentos correspondem ao intervalo de confiança de 80%.

A *H. armigera* é mais outra praga insensível à alimentação com IPs. Estas moléculas não causaram nenhuma alteração significativa nos indicadores adaptativos do inseto. O período de desenvolvimento larval foi menor (p<0,05) devido ao grande número de insetos utilizados neste estudo (n=300). De tal forma que o experimento foi sensível o suficiente para detectar diferenças significativas entre os dois tratamentos, es mas otra mesmo sendo muito pequenas (~2%). Os demais indicadores adaptativos demostram que a *H. armigera* consegue superar o efeito anti-nutricional dos IPs.

Desde que foi caraterizado o primer inibidor em 1945 (Kunitz 1945), estas moléculas têm chamado a atenção dos cientistas devido ao grande potencial de usá-las no controle de pragas. O interesse aumentou quando estudos posteriores demostraram que reduzem significativamente o crescimento dos insetos herbívoros, tanto pela incorporação dos inibidores na dieta (Broadway et al. 1986; Hines et al. 1990; Johnston, Gatehouse, e Anstee 1993; Kuwar, Pauchet, e Heckel 2020; Meriño-Cabrera et al. 2020; Ryan 1990) como também pelo aumento da concentração nas plantas (Hilder et al., 1987; McManus, White e McGregor, 1994; Clemente et al., 2019; Singh et al., 2020). Mas nem todos os insetos são susceptíveis à ingestão de inibidores. Como a *H. armígera,* muitas espécies de insetos foram identificadas como resistentes aos efeitos anti-nutricionais dos IPs (Brioschi et al. 2007; Paulillo et al. 2000; Souza et al. 2016; Dias et al. 2015). O atual foco de pesquisa está no intestino dos insetos polífagos, particularmente nos mecanismos de expressão diferencial de peptidases digestivas.

3.3.3. A expressão diferencial de peptidases digestivas é responsável pela adaptação de *H. armigera* aos IPs

A exposição das lagartas aos IPs alterou o perfil transcricional do sistema digestivo da *H. armigera*. Um total de 999 genes foram diferencialmente expressos no intestino das lagartas expostas aos IPs. A ingestão dos IPs aumentou de forma significativa (*p*<0.05 e Log2 Fold-Change >1) o número de transcritos de 65 genes dos quais 20 codificam enzimas proteolíticas, sendo a metade tripsinas, cinco serino proteases, duas serino hidrolases, duas enzimas *brachyurin* e uma colagenase. Todos os genes com funções potencialmente digestivas foram selecionados e agrupados de acordo com o perfil transcricional (Figura 7). Consideramos que o principal mecanismo de resistência das lagartas à alimentação com IPs é a síntese de proteínas insensíveis às moléculas antinutricionais. Tripsinas resistentes aos IPs são capazes de formar oligômeros com menor afinidade aos IPs (Brito et al., 2001; Dias et al. 2013) e parece ser uma característica particular das enzimas digestivas dos lepidópteras (Lima et al. 2020; Tamaki e Terra 2015).

Por outro lado, a alimentação com IPs reduz a produção de transcritos de sete enzimas carboxipeptidases, duas serino proteases, duas hialuronidases, uma metalloproteinase, uma tripsina e uma quimotripsina (Figura 7). A redução da expressão de determinado grupo de genes provavelmente está associada com o balanço do metabolismo catabólico do sistema digestivo. A síntese de uma proteína é de entorno de quatro moléculas de ATPs por cada aminoácido e ainda existe uma demanda energética da maquinaria de transporte e secreção (Gutierrez et al. 2020). O silenciamento parcial de genes inapropriados pode ser uma estratégia útil para melhorar a eficiência do sistema digestivo dos insetos herbívoros.





Inibidores endógenos são regulados significativamente quando as lagartas são expostas aos inibidores na dieta. A presença dos IPs na dieta reduz a síntese de transcritos de três proteínas *zonhadesins*. Estas enzimas têm até 18 domínios ricos em cisteína semelhantes a inibidores de tripsina (TIL domain, InterPro: IPR002919) e têm sido atribuído o potencial de inibir a atividade de proteases, principalmente tripsinas, quimotripsinas e

cathepsinas (Li et al. 2012; Rouhova et al. 2021). Em *B. mori*, por exemplo, proteínas com domínios TIL atuam na defensa patogênica pela inibição de proteases fúngicas (Li et al. 2012). Inclusive, as duas isoformas *zonhadesins* codificadas pelo gene LOC110384106 têm um domínio Serpin (Serine Proteinase Inhibitors, InterPro: IPR023796) na região c-terminal, que provavelmente confere às *zonhadesins* a capacidade de formar complexos covalentes com proteases específicas. Pode parecer contraintuitivo que a regulação de inibidores endógenos pudesse neutralizar o efeito anti-nutricional dos IPs exógenos, mas já foi proposto um mecanismo similar de regulação translacional de proteases em *H. armigera* expostas a inibidores de *Capiscum annuum* (Lomate et al. 2018). Os autores sugerem que inibidores endógenos se ligam a proteases intestinais específicas para manter a integridade de monitores receptores de peptídeos, e consequentemente promover o fluxo continuo de proteases digestivas (Lomate et al. 2018). O aumento dos IPs externos reduz a taxa de transcritos das *zonhadesins*, mas se existe uma relação direta com a regulação translacional de proteases digestivas ainda precisa ser estudado com mais profundidade.

Assim, a expressão dinâmica dos genes que codificam enzimas digestivas parece ser necessária para a nutrição eficiente das lagartas alimentadas com dieta suplementada com IPs. A plasticidade transcricional dos genes de enzimas proteolíticas é um mecanismo conservado nos lepidópteras (Chikate et al. 2013; De Oliveira et al. 2013; Kuwar et al. 2015; Meriño-Cabrera et al. 2020; Souza et al. 2016) e pode estar implicado na conquista exitosa do grande número de plantas hospedeiras. No entanto, as bases moleculares que controlam a regulação diferencial das serino peptidases são ainda desconhecidas (Chikate et al. 2013; Lomate et al. 2018; Terra et al. 2019). Aqui revelamos que grande parte do perfil transcricional é transmitido à progênie em ausência do estímulo nutricional. Este estudo indica que mecanismos epigenéticos podem estar controlando a expressão de genes no sistema digestivo e a formação de epialelos na *H. armigera*.

3.3.4. Grande parte do perfil transcricional induzido pela alimentação com IPs foi transmitido às progênies de insetos de *H. armigera*

Os resultados da análise de controle de qualidade indicaram a necessidade de remover duas amostras que foram consideradas *outliers* experimentais CT-1 e SG-2 (Figura S1Figura S2). Assim, a variabilidade total dos dados no componente principal 1 aumentou um 9% em comparação com os resultados das unidades experimentais iniciais (Figura 8). Os genes diferencialmente expressos derivados da segunda geração se agrupam mais com os progenitores que foram alimentados com os IPs, comparado com os progenitores alimentados com IPs, as lagartas alimentadas com IPs

transmitiram grande parte do perfil transcricional às suas progênies (Figura 7Figura 10). O transcriptoma digestivo da segunda geração coincide com o transcriptoma das lagartas expostas aos IPs com um aumento do 42.3% no número de genes regulados, quando comparado com 0% as lagartas alimentadas com dieta controle (Figura 9-10). Um total de 496 genes diferencialmente expressos foram identificados tanto em lagartas alimentadas com IPs como nas suas progênies (epialelos potenciais). O anterior sugere que os fenótipos moleculares induzidos pelos IPs podem ser transmitidos por pelo menos uma geração.



Figura 8. Análise de componentes principais dos sete tratamentos. Lagartas da primeira geração alimentadas com dieta artificial controle (CtI), lagartas da primeira geração alimentadas com dieta artificial suplementada com IPs (IPS), progênies de lagartas alimentadas com dieta com IPs (SG). Duas amostras podem estar sendo influenciadas por algum fator externo ao experimento e por tanto não foram agrupadas junto com as outras do mesmo tratamento. Para ter mais confiabilidade nos dados foram excluídas para as análises subsequentes.



Figura 9. *Heatmap* da distância entre cada amostra dos nove tratamentos, incluindo duas amostras de intestinos de lagartas alimentadas com dieta artificial controle (CT), três amostras de intestinos de lagartas expostas aos IPs (IPS) e duas amostras de intestinos das progênies de lagartas expostas aos IPs (SG). O dendograma indica que o transcriptoma

digestivo da segunda geração tem maior similaridade com as lagartas expostas aos IPs. A distância foi calculada com o pacote *PoissonDistance* do R e corresponde à distância de Poisson.



Figura 10. Diagrama de Venn usando o número de genes que foi diferencialmente expresso em cada tratamento. Quantificamos o número de genes diferencialmente expressos da segunda geração (F1) comparando com lagartas da primeira geração alimentadas com dieta artificial sem e com IPs. Consideramos como epialelos potenciais os genes que foram regulados pelos IPs e que tiveram a mesma resposta na segunda geração do grupo de lagartas alimentadas com dieta controle sem IPs.

Os epialelos potenciais de padrões de expressão gênica identificados estão associados principalmente à adaptação da *H. armigera* aos IPs. Como esperado, dos 12 genes que foram ativados nas duas gerações cinco codificam tripsinas e outros dois são precursores de uma enzima oxidoreductases (Tabela 2). Epialelos de genes diferencialmente expressos foram selecionados para validação por RT-qPCR. Os resultados da análise de expressão gênica por *RNA-seq* foram consistentes com os resultados da RT-qPCR para três genes que codificam tripsinas e quatro genes de funções regulatórias (Figura 11).

	IPS	IPS vs. Ctl SG vs. Ctl		_	
Locus	Log2 Fold- Change	<i>p-adjust</i> < 0.05	Log2 Fold- Change	<i>p-adjust</i> < 0.05	Nome da proteina
LOC110370568	1,03	0,002	1,76	0,000	diuretic hormone
LOC110371086	1,03	0,000	2,48	0,000	uricase
LOC110372133	2,03	0,000	1,50	0,012	probable aldehyde oxidase 2
LOC110375492	1,16	0,012	1,81	0,000	uncharacterized protein LOC110375492
LOC110377152	1,13	0,020	1,59	0,001	uncharacterized protein LOC110377152
LOC110378559	4,75	0,036	6,43	0,003	trypsin, alkaline C-like
LOC110378803	1,37	0,035	1,47	0,025	gloverin-like
LOC110379025	1,90	0,000	1,48	0,009	trypsin CFT-1-like, partial
LOC110380575	1,33	0,001	1,40	0,001	trypsin, alkaline C-like
LOC110380583	1,59	0,000	1,90	0,000	trypsin CFT-1-like
LOC110383800	1,87	0,000	1,69	0,001	lipoprotein lipase-like
LOC110384494	1,13	0,022	1,08	0,040	Serine proteases, trypsin domain (IPR001254)

Tabela 2. Epialelos potenciais de genes *up-regulated* em *H. armigera* induzidos pela exposição das lagartas aos IPs.



Figura 11. Validação de epialelos potenciais de *H. armigera* induzidos pela alimentação com IPS por RT-qPCR. Os dados foram normalizados com os genes de referência de RsP 18 e Rpl27 (Pfaffl 2001). * = diferenças significativas (Log2 > 1 e < -1, p<0.05) para genes diferencialmente expressos.

Nos últimos anos, a evidência de epialelos em insetos vem crescendo rapidamente (Tabla 3). A literatura indica que ampla variedade de estímulos pode induzir uma resposta fenotípica passível de ser herdada por mais de uma geração (Tabla3). Por exemplo, a exposição de mosquitos *Aedes albopictus* a inseticidas reduz a sensibilidade da prole até por duas gerações consecutivas, mesmo em ausência do estressor químico (Oppold et al., 2015). Os autores asseguram que padrões de metilação do DNA são formados no genoma dos insetos parentais e herdados de forma estável nas progênies. Os mecanismos que conferem a impressão ambiental nos seres vivos a longo prazo são desconhecidos, embora sabe-se que certas as marcas epigenéticas podem resistir a reprogramação germinal durante mais de uma geração.

Tabela 3. Alguns exemplos de epialelos reportados em insetos induzidos por diferentes estímulos.

		1			
Espécie	Fator ambiental	Característi ca adquirida	Heranç a	Mecanismo molecular	Referência
Pieris brassica	Intensidad e da luz	Cor da cutícula	Pelo menos uma geraçã o	?	(Durken 1923; Heslop- Harrison 1927)
Sarcophaga bullata	Dias curtos	Inibição da diapausa	Matern a, uma geraçã o	?	(Henrich e Denlinger 1982)
Grillus rubens	Variação ambiental	Mudanças na fertilidade e na metamorfos e	Predo minant emente matern a. Três geraçõ es	?	(Zera e Rankin 1989)
Allonemobi us fasciatus	Dias curtos, frio	Diapausa	Matern a, uma geraçã o	?	(Tanaka 1992)
Acyrthosiph on pisum	Fotoperíod o	Sistema de reprodução	Duas geraçõ es	?	(Le Trionnaire et al. 2009)
Schistocerc a gregariae	Variação ambiental	Polifenismo	Uma geraçã o	?	(Miller et al. 2008)
H. armígera	Toxinas cristal (Cry1Ac)	Resistência a toxinas Cry1Ac	12 geraçõ es	?	(Rahman et al. 2011)
Aedes albopictus	Estressore s químicos	Redução da sensibilidad	Duas geraçõ es	Metilação do DNA	(A Oppold et al. 2015)

		e a inseticidas			
Araschnia Ievana	Variação ambiental	Polifenismo	Uma geraçã o	Reprogramação transcricional*	(Vilcinskas e Vogel 2016)
H. armígera	Inibidores de peptidase de soja	496 Fenótipos moleculares	Uma geraçã o	<i>Cross-talking</i> entre acetilação de histonas e metilação do DNA?	Este estudo

A herança de características adquiridas poderia ter um papel direto nos processos evolutivos. Os fenômenos epigenéticos podem ter grande valor adaptativo na evolução dos organismos, considerando que a grande maioria dos estímulos ambientais não afetam a sequência do DNA. As modificações epigenéticas respondem rapidamente ao ambiente, gerando novos fenótipos potencialmente úteis para adaptação dos organismos às condições de estresse. Assim, a capacidade de resposta das modificações epigenéticas aos estímulos ambientais podem ter um papel crítico na plasticidade fenotípica e na adaptação dos insetos ao seu respectivo habitat.

A estabilidade dos epialelos tem sido estudada em espécies modelo. Segundo Remy (2010), a atração aos sinais olfativos do nematoide Caenorhabditis elegans pode ser transmitida para a próxima geração de forma transitória (somente à primeira geração). No entanto, a herança transgeracional da mesma característica pode se tornar estável quando os organismos são expostos durante quatro gerações sucessivas ao mesmo estímulo (Remy, 2010). Quando a exposição ocorre de forma intensiva, a impressão olfativa pode ser herdada ao longo de pelo menos 40 gerações na ausência dos odores desencadeantes. Este estudo indica que a natureza do estímulo pode ter uma influência na estabilidade das marcas epigenéticas ao longo das gerações. Outro exemplo, de talvez o epialelo mais estável descrito até hoje, foi descoberto em flores de Linaria vulgaris. Os fenótipos com flores de simetria radial, reportados inicialmente por Linneus, diferiam das plantas de tipo selvagem com flores assimétricas bilaterais. Um estudo posterior demostrou que o silenciamento gênico causado por hipermetilação do lócus Lcyc causa o desenvolvimento atípico da flor de L. vulgaris (Cubas et al., 1999). A herança epigenética desta característica tem sido mantida por pelo menos 260 anos (Cubas et al., 1999). Atualmente, se desconhece o número de gerações necessárias para restabelecer uma marca epigenética e muitos dos mecanismos moleculares continuam sendo um enigma.

3.3.5. Genes potencialmente envolvidos na regulação transcricional e na formação de epialelos de *H. armigera*

Entre os genes candidatos observados, convém destacar a ativação de genes LOC110377152 e LOC110375492, os quais aparentemente fazem parte de um mesmo gene que codifica uma proteína com domínio da família Acyl-CoA N-acyltransferase (InterPro: IPR016181), um membro potencial das acetil transferases de histona (HAT, Histone Acetyltransferases) (Tabela 2, Figura 11). Estudos sugerem que tem sido difícil determinar o número de genes HATs do genoma da *H. armigera* devido a que existe pouca identidade entre as sequências de essas enzimas (Yuan e Marmorstein 2013), talvez por esse motivo os genes LOC110377152 e LOC110375492 foram anotados independentemente. Embora a sequência das HATs conservem pouca similaridade, todas realizam as mesmas funções bioquímicas mediadas por diversos processos biológicos (Fiorentino, Mai, e Rotili 2020). Estas enzimas usam a acetil coenzima A para transferir um grupo acetil para uma ampla gama de substratos, incluindo a adição do grupo acetil aos N-terminais de proteína e resíduos de lisina de histonas (Bienvenut et al. 2020). As HATs parecem ter certa similaridade com a superfamília de enzimas quinase, embora estas últimas tenham uma sequência mais bem conservada. Como as quinases, muitas HATs são autorreguladas (por autoaceitação) e interagem com outras subunidades de proteínas para modular a sua atividade ou mediar sinais biológicos (Yuan e Marmorstein 2013). Recentemente foi sugerido que as HATs podem se tornar rapidamente em outra família importante de reguladores de transdução de sinais e controladores da expressão gênica. Assim, a ativação do possível gene HAT é um forte candidato a ser responsável dos mecanismos epigenéticos de resposta aos IPs na H. armigera.

Pelo menos 36 genes potencialmente envolvidos em processos regulatórios foram reprimidos na primeira e segunda geração de larvas de *H. armigera* (Figura 12). Estes genes regulados negativamente na presença dos IPs podem estar associados a mecanismos de regulação gênica, controlando a sínteses de transcritos no sistema digestivo da *H. armigera*. Os candidatos aos processos regulatórios incluem genes que podem atuar como fatores de elongação (ex. 1-alpha 2) ou fatores de transcrição (ex. NF-kappa-B) (Figura 11Figura 12). A regulação da síntese de transcritos do sistema digestivo pode depender de uma série de fatores regulatórios, incluindo os processos de controle transcricional e traducional (Jayachandran, Hussain, e Asgari 2013; Lomate et al. 2014; Chandra et al. 2018). Mais estudos serão necessários para determinar o papel dos genes candidatos à plasticidade transcricional do sistema digestivo dos insetos polífagos.





A redução de transcritos de enzimas N-terminal metiltransferase 1 pode estar modificando a acessibilidade da cromatina à maquinaria da transcrição, tendo um papel direto na formação de epialelos (Figura 12). A metilação de histonas tem sido funcionalmente vinculada à herança epigenética transgeracional em vários tipos de insetos (Villagra e Frías-Lasserre 2020). A metiltransferase 1 pode catalisar a transferência do grupo metil para

resíduos de lisina ou arginina das proteínas, regulando diversos processos biológicos, incluindo regulação da transcrição, reparo do DNA e metabolismo do RNA (Guccione e Richard 2019; Luo 2018). Enzimas metiltransferases podem ativar genes ou desativar controlando as funções do genoma. Outros candidatos interessantes no processo de regulação do genoma são os genes que codificam proteínas com domínios Zn (Figura 12).

A mineração de dados de RNA-seq demostrou que alguns genes que possuem domínios de Zn podem estar sendo co-expressos (Figura 3S). Os genes *translational regulator orb2* e protein yippee cg15309 tiveram o perfil transcricional similar nas 52 unidades experimentais analisadas (Figura 3S). Curiosamente, o aumento da síntese de transcritos destes genes tem uma correlação inversa com a síntese de algumas tripsinas (Figura 3S). Estas proteínas com domínios de Zn podem atuar como fatores de transcrição ou recrutar remodeladores da cromatina, como demostrado em *Drosophila* (Walther et al. 2020) e *Bombyx mori* (Z. Li et al. 2012). Além disso, genes com funções na regulação pós-traducional foram agrupados com um conjunto e tripsinas e uma quimotripsina, o que sugere ter um papel na regulação desse conjunto de enzimas (Figura 3S). Os genes aqui descritos são responsivos aos inhibidores, mais estudos são necessários para descrever com precisão o mecanismo de atuação na resposta molecular aos IPs.

3.3.6. A herança de características adquiridas e a evolução

Alguns cientistas consideram que a teoria da evolução deveria ser reformulada (Laland et al. 2014). Como mencionado nos parágrafos anteriores, a herança das características adquiridas não parece ser um fenômeno exclusivo dos insetos polífagos. As variações epigenéticas tem efeitos adaptativos em plantas (Akimoto et al. 2007; Minow e Colasanti 2020; Miryeganeh e Saze 2020) e em outros animais (Anastasiadi et al. 2021; Burton e Greer 2021; Stajic e Jansen 2021). Estes exemplos talvez se encaixem em uma teoria evolutiva mais ampla. Pelo menos em insetos, a evolução darwiniana falha em descrever a rápida adaptação aos inseticidas por diversos motivos (Brevik et al. 2021). As mutações são raras e geralmente de polimorfismo neutro ou deletério (Karasov, Messer, e Petrov 2010; Keightley et al. 2015) e os novos alelos podem ser perdidos por deriva genética (Kimura 1983). Epialelos dos fenótipos moleculares parecem ser numerosos em insetos polífagos e poderiam ser importantes motores evolutivos. Assim, os traços moleculares adquiridos no desenvolvimento podem estar somando às forças causais da evolução. As bases moleculares dos fenómenos epigenéticos será fundamental para determinar o papel do ambiente na construção dos organismos.

3.4. Conclusões

A exposição das lagartas *H. armigera* aos IPs não causou nenhum efeito negativo nos parâmetros adaptativos do inseto. A plasticidade transcricional do sistema digestivo foi considerada o mecanismo mais importante na resposta molecular aos IPs. Fenótipos moleculares induzidos pelos IPs são transmitidos de uma geração à seguinte, mesmo na ausência das moléculas antinutricionais. Pelo menos em insetos polífagos, a herança de padrões de expressão de genes pode ocorrer antes do surgimento de novos polimorfismos genéticos, que suportem alguma vantagem adaptativa.

Referências

- Akimoto, K., Katakami, H., Kim, H.-J., Ogawa, E., Sano, C. M., Wada, Y., Sano, H., Iro, H., e San, S. (2007). Epigenetic inheritance in rice plants. *Annals of Botany*, *100*(2), 205–217. https://doi.org/10.1093/aob/mcm110
- Anastasiadi, D., Venney, C. J., Bernatchez, L., e Wellenreuther, M. (2021). Epigenetic inheritance and reproductive mode in plants and animals. *Trends in Ecology e Evolution*. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.08.006
- Bienvenut, W. V, Brünje, A., Boyer, J., Mühlenbeck, J. S., Bernal, G., Lassowskat, I., Dian, C., Linster, E., Dinh, T. V, Koskela, M. M., Jung, V., Seidel, J., Schyrba, L. K., Ivanauskaite, A., Eirich, J., Hell, R., Schwarzer, D., Mulo, P., Wirtz, M., ... Finkemeier, I. (2020). Dual lysine and N-terminal acetyltransferases reveal the complexity underpinning protein acetylation. *Molecular Systems Biology*, *16*(7), e9464. https://doi.org/10.15252/msb.20209464
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brevik, K., Bueno, E. M., McKay, S., Schoville, S. D., e Chen, Y. H. (2021). Insecticide exposure affects intergenerational patterns of DNA methylation in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. *Evolutionary Applications*, 14(3), 746–757. https://doi.org/10.1111/eva.13153
- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., e Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1283–1290. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016
- Brito, L. O., Lopes, A. R., Parra, J. R. P., Terra, W. R., e Silva-Filho, M. C. (2001). Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 365–375. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00325-0

- Broadway, R. M., Duffey, S. S., Pearce, G., e Ryan, C. A. (1986). Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *41*(1), 33–38. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x
- Burdge, G. C., Hanson, M. A., Slater-Jefferies, J. L., e Lillycrop, K. A. (2007). Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *British Journal of Nutrition*, 97(6), 1036–1046. https://doi.org/10.1017/S0007114507682920
- Burton, N. O., e Greer, E. L. (2021). Multigenerational epigenetic inheritance: transmitting information across generations. *Seminars in Cell e Developmental Biology*. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2021.08.006
- Chittka, A., e Chittka, L. (2010). Epigenetics of royalty. *PLOS Biology*, 8(11), e1000532. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000532
- Ciabrelli, F., Comoglio, F., Fellous, S., Bonev, B., Ninova, M., Szabo, Q., Xuéreb, A., Klopp, C., Aravin, A., Paro, R., Bantignies, F., e Cavalli, G. (2017). Stable polycomb-dependent transgenerational inheritance of chromatin states in *Drosophila*. *Nature Genetics*, *49*(6), 876–886. https://doi.org/10.1038/ng.3848
- Clemente, M., Corigliano, M., Pariani, S., Sánchez-López, E., Sander, V., e Ramos-Duarte, V. (2019). Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1345. https://doi.org/10.3390/ijms20061345
- de Oliveira, C. F. R., de Paula Souza, T., Parra, J. R. P., Marangoni, S., de Castro Silva-Filho, M., e Macedo, M. L. R. (2013). Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 165(1), 19–25. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.008.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics, 29*(1), 15-21.
- Durken, B. (1923). The effect of coloured light on the pupae of the cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*) and the conduct of the offspring. *Archiv Fur Mikroskopische Anatomie Und Entwicklungsmechanik*, 99(99), 222–389.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., e Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 271– 278. https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X
- Faulk, C., e Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything. *Epigenetics*, 6(7), 791–797. https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209
- Fiorentino, F., Mai, A., e Rotili, D. (2020). Lysine acetyltransferase inhibitors from natural sources. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1243. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01243
- Glastad, K. M., Hunt, B. G., e Goodisman, M. A. D. (2019). Epigenetics in insects: genome regulation and the generation of phenotypic diversity. *Annual Review of Entomology*, *64*(1), 185–203. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111914

Godfrey, K. M., Lillycrop, K. A., Burdge, G. C., Gluckman, P. D., e Hanson, M. A. (2007).

Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatric Research*, 61(5 Part 2), 5R-10R. https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318045bedb

- Greene, G. L., Leppla, N. C., e Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium123. *Journal of Economic Entomology*, *69*(4), 487–488. https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487
- Guccione, E., e Richard, S. (2019). The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(10), 642–657. https://doi.org/10.1038/S41580-019-0155-X
- Gutierrez, J. M., Feizi, A., Li, S., Kallehauge, T. B., Hefzi, H., Grav, L. M., Ley, D., Baycin Hizal, D., Betenbaugh, M. J., Voldborg, B., Faustrup Kildegaard, H., Min Lee, G., Palsson, B. O., Nielsen, J., e Lewis, N. E. (2020). Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nature Communications*, *11*(1), 68. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y
- Habib, H., e Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2(3), 68–85.
- Hedges, S. B. (2002). The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, *3*(11), 838–849. https://doi.org/10.1038/nrg929
- Henrich, V. C., e Denlinger, D. L. (1982). A maternal effect that eliminates pupal diapause in progeny of the flesh fly, Sarcophaga bullata. Journal of Insect Physiology, 28(10), 881– 884. https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90102-0
- Heslop-Harrison, J. W. (1927). Experiments on the egg-laying instincts of the sawfly, pontania salicis christ, and their bearing on the inheritance of acquired characters, with some remarks on a new principle in evolution. *Proceedings of the Royal Society, (London), Series B*, *101*(707), 115–126.
- Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F., e Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Letters to Nature*, 330(12), 160–163.
- Hines, M. E., Nielsen, S. S., Shade, R. E., e Pomeroy, M. A. (1990). The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 57(3), 201–207. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01431.x
- Jayachandran, B., Hussain, M., e Asgari, S. (2013). An insect trypsin-like serine protease as a target of microRNA: utilization of microRNA mimics and inhibitors by oral feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(4), 398–406. https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2012.10.004
- Johnston, K. A., Gatehouse, J. A., e Anstee, J. H. (1993). Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, *39*(8), 657–664. https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90071-X
- Karasov, T., Messer, P. W., e Petrov, D. A. (2010). Evidence that adaptation in *Drosophila* is not limited by mutation at single sites. *PLoS Genetics*, *6*(6), e1000924. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000924

Keightley, P. D., Pinharanda, A., Ness, R. W., Simpson, F., Dasmahapatra, K. K., Mallet, J.,

66

Davey, J. W., e Jiggins, C. D. (2015). Estimation of the spontaneous mutation rate in *Heliconius melpomene*. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 239–243. https://doi.org/10.1093/molbev/msu302

Kempes, C. P., e Krakauer, D. C. (2021). The multiple paths to multiple life. Journal of Molecular Evolution 2021 89:7, 89(7), 415–426. https://doi.org/10.1007/S00239-021-10016-2

Kimura, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press.

- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., e Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, *319*(5871), 1827–1830. https://doi.org/10.1126/science.1153069
- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, *101*(2635), 668–669. https://doi.org/10.1126/science.101.2635.668
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., e Heckel, D. G. (2020). Effects of class-specific, synthetic, and natural proteinase inhibitors on life-history traits of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(4). https://doi.org/10.1002/arch.21647
- Laland, K., Uller, T., Feldman, M., Sterelny, K., Müller, G. B., Moczek, A., Jablonka, E., Odling-Smee, J., Wray, G. A., Hoekstra, H. E., Futuyma, D. J., Lenski, R. E., Mackay, T. F. C., Schluter, D., e Strassmann, J. E. (2014). Does evolutionary theory need a rethink? *Nature* 2014 514:7521, 514(7521), 161–164. https://doi.org/10.1038/514161a
- Le Trionnaire, G., Francis, F., Jaubert-Possamai, S., Bonhomme, J., De Pauw, E., Gauthier, J.-P., Haubruge, E., Legeai, F., Prunier-Leterme, N., Simon, J.-C., Tanguy, S., e Tagu, D. (2009). Transcriptomic and proteomic analyses of seasonal photoperiodism in the pea aphid. *BMC Genomics*, *10*(1), 456. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-456
- Li, Y., Zhao, P., Liu, S., Dong, Z., Chen, J., Xiang, Z., e Xia, Q. (2012). A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(10), 766–775. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.07.004
- Li, Z., Cheng, D., Mon, H., Tatsuke, T., Zhu, L., Xu, J., Lee, J. M., Xia, Q., e Kusakabe, T. (2012). Genome-wide identification of polycomb target genes reveals a functional association of pho with scm in *Bombyx mori. PLOS ONE*, *7*(4), e34330. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034330
- Lima, L. R., Dias, R. O., Fuzita, F. J., Ferreira, C., Terra, W. R., e Silva-Filho, M. C. (2020). The Evolution, Gene expression profile, and secretion of digestive peptidases in lepidoptera species. *Catalysts*, *10*(2), 217. https://doi.org/10.3390/catal10020217
- Lomate, P. R., Dewangan, V., Mahajan, N. S., Kumar, Y., Kulkarni, A., Saxena, S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2018). Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in Helicoverpa armigera. *Molecular and Cellular Proteomics*.
- Lomate, P. R., Mahajan, N. S., Kale, S. M., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2014). Identification and expression profiling of *Helicoverpa armigera* microRNAs and their possible role in the regulation of digestive protease genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *54*, 129–137.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and

dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome biology, 15(12), 1-21.

- Loxdale, H. D., Lushai, G., e Harvey, J. A. (2011). The evolutionary improbability of 'generalism' in nature, with special reference to insects. *Biological Journal of the Linnean Society*, *103*(1), 1–18. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01627.x
- Luo, M. (2018). Chemical and biochemical perspectives of protein lysine methylation. *Chemical Reviews*, *118*(14), 6656–6705. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00008
- Malka, O., Feldmesser, E., Van Brunschot, S., Santos-Garcia, D., Han, W.-H., Seal, S., Colvin, J., e Morin, S. (2021). The molecular mechanisms that determine different degrees of polyphagy in the *Bemisia tabaci* species complex. *Evolutionary Applications*, 14, 807– 820. https://doi.org/10.1111/eva.13162
- Matsuura, K. (2020). Genomic imprinting and evolution of insect societies. *Population Ecology*, 62(1), 38–52. https://doi.org/10.1002/1438-390X.12026
- McManus, M. T., White, D. W. R., e McGregor, P. G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Research*, 3, 50–58.
- Meriño-Cabrera, Y., Oliveira Mendes, T. A., Castro, J. G. S., Barbosa, S. L., Macedo, M. L. R., e Almeida Oliveira, M. G. (2020). Noncompetitive tight-binding inhibition of Anticarsia gemmatalis trypsins by Adenanthera pavonina protease inhibitor affects larvae survival. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 104(3). https://doi.org/10.1002/arch.21687
- Miller, G. A., Islam, M. S., Claridge, T. D. W., Dodgson, T., e Simpson, S. J. (2008). Swarm formation in the desert locust *Schistocerca gregaria*: Isolation and NMR analysis of the primary maternal gregarizing agent. *Journal of Experimental Biology*, 211(3), 370–376. https://doi.org/10.1242/jeb.013458
- Minow, M. A. A., e Colasanti, J. (2020). Does variable epigenetic inheritance fuel plant evolution? *Genome*, 63(5), 253–262. https://doi.org/10.1139/gen-2019-0190
- Miryeganeh, M., e Saze, H. (2020). Epigenetic inheritance and plant evolution. *Population Ecology*, *6*2(1), 17–27. https://doi.org/10.1002/1438-390X.12018
- Mukherjee, K., Grizanova, E., Chertkova, E., Lehmann, R., Dubovskiy, I., e Vilcinskas, A. (2017). Experimental evolution of resistance against *Bacillus thuringiensis* in the insect model host *Galleria mellonella* results in epigenetic modifications. *Virulence*, 8(8), 1618– 1630. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1325975
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., e Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *118*(1–2), 69–78. https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2015.02.009
- Mukherjee, K., e Vilcinskas, A. (2019). Transgenerational epigenetic inheritance in insects. *Transgenerational Epigenetics*, 315–329. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816363-4.00014-6
- Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Kranendonk, M. J. Van, e Chivas, A. R. (2016). Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*, 537(7621), 535–535. https://doi.org/10.1038/NATURE19355

- Oppold, A., Kreß, A., Bussche, J. Vanden, Diogo, J. B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte, M. B., e Müller, R. (2015). Ecotoxicology and environmental safety epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the asian tiger mosquito *Aedes albopictus. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036
- Paulillo, L. C. M. S., Lopes, Á. R., Cristofoletti, P. T., Parra, J. R. P., Terra, W. R., e Silva-Filho, M. C. (2000). Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *Journal of Economic Entomology*, *93*(3), 892–896. https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.892
- Pentecost, M., e Meloni, M. (2020). "It's never too early": preconception care and postgenomic models of life. *Frontiers in Sociology*, *5*, 21. https://doi.org/10.3389/fsoc.2020.00021
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2001–2007. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45
- Rahman, M., Glatz, R., Roush, R., e Schmidt, O. (2011a). Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from Bacillus thuringiensis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1443–1448. https://doi.org/10.1128/AEM.01467-10
- Rahman, M., Glatz, R., Roush, R., e Schmidt, O. (2011b). Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1443–1448. https://doi.org/10.1128/AEM.01467-10
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., Moorman, A. F. M., Lekanne Deprez, R. H., e Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- Ramírez-Alarcón, K., Sánchez-Agurto, Á., Lamperti, L., e Martorell, M. (2019). Epigenetics, maternal diet and metabolic programming. *The Open Biology Journal*, *7*(1), 45–51. https://doi.org/10.2174/1874196701907010045
- Rouhova, L., Kludkiewicz, B., Sehadova, H., Sery, M., Kucerova, L., Konik, P., e Zurovec, M. (2021). Silk of the common clothes moth, *Tineola bisselliella*, a cosmopolitan pest belonging to the basal ditrysian moth line. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *130*, 103527. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103527
- Russo, V. E. A. (Vincenzo E. A. ., Martienssen, R. A., e Riggs, A. D. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. http://agris.fao.org/agris-search/search.do? recordID=US201300304567
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425–449. https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864.
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., e Krishna Kumar, N. K. (2018). Double-Stranded RNA-mediated suppression of

trypsin-like serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 746–761. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2584-3

- Shen, Y., Liu, J., Geng, H., Zhang, J., Liu, Y., Zhang, H., Xing, S., Du, J., Ma, S., e Tian, Z. (2018). De novo assembly of a Chinese soybean genome. *Science China Life Sciences*, 61(8), 871–884. https://doi.org/10.1007/s11427-018-9360-0
- Silva, R., e Clarke, A. R. (2020). The "sequential cues hypothesis": a conceptual model to explain host location and ranking by polyphagous herbivores. *Insect Science*, *27*(6), 1136–1147. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12719
- Singh, S., Singh, A., Kumar, S., Mittal, P., e Singh, I. K. (2020). Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect Science*, *27*(2), 186–201. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12641
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhano, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S., e Silva-filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 196–197, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007
- Stajic, D., e Jansen, L. E. T. (2021). Empirical evidence for epigenetic inheritance driving evolutionary adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1826). https://doi.org/10.1098/RSTB.2020.0121
- Tamaki, F. K., e Terra, W. R. (2015). Molecular insights into mechanisms of lepidopteran serine proteinase resistance to natural plant defenses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(4), 885–891. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.049
- Tanaka, S. (1992). Factors influencing embryonic diapause in the striped ground cricket, Allonemobius fasciatus (Orthoptera: Gryllidae). *Japon Journal Entomology*, *60*(1), 149– 155.
- Dias, A., Dias, R. O., Via, A., Brand, M. M., Silva-filho, M. C., Brandão, M. M., Dias, A., e Silvafilho, M. C. (2015). Digestive peptidase evolution in holometabolous insects led to a divergent group of enzymes in lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.009
- Verresen, R., Moessner, R., e Pollmann, F. (2019). Avoided quasiparticle decay from strong quantum interactions. *Nature Physics 2019 15:8*, *15*(8), 750–753. https://doi.org/10.1038/s41567-019-0535-3
- Vilcinskas, A., e Vogel, H. (2016). Seasonal phenotype-specific transcriptional reprogramming during metamorphosis in the European map butterfly *Araschnia levana*. *Ecology and Evolution*, *6*(11), 3476–3485. https://doi.org/10.1002/ece3.2120
- Villagra, C., e Frías-Lasserre, D. (2020). Epigenetic molecular mechanisms in insects. *Neotropical Entomology 2020 49:5, 49*(5), 615–642. https://doi.org/10.1007/S13744-020-00777-8
- Walther, M., Schrahn, S., Krauss, V., Lein, S., Kessler, J., Jenuwein, T., e Reuter, G. (2020). Heterochromatin formation in *Drosophila* requires genome-wide histone deacetylation in cleavage chromatin before mid-blastula transition in early embryogenesis. *Chromosoma*

70

2020 129:1, 129(1), 83-98. https://doi.org/10.1007/S00412-020-00732-X

Waterland, R. A., e Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(15), 5293–5300. https://doi.org/10.1128/mcb.23.15.5293-5300.2003
- Watson, J. D., e Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. https://doi.org/10.1038/171737a0
- Yuan, H., e Marmorstein, R. (2013). Histone acetyltransferases: rising ancient counterparts to protein kinases. *Biopolymers*, *99*(2), 98–111. https://doi.org/10.1002/bip.22128
- Zera, A. J., e Rankin, M. A. (1989). Wing dimorphism in *Gryllus rubens*: genetic basis of morph determination and fertility differences between morphs. *Oecologia*, *80*(2), 249–255. https://doi.org/10.1007/BF00380159

Material suplementar



Figura S1. *Heatmap* da distância entre cada amostra dos nove tratamentos, incluindo três amostras de intestinos de lagartas alimentadas com dieta artificial controle (CT), três amostras de intestinos de lagartas expostas aos IPs (IPS) e duas amostras de intestinos das progênies de lagartas expostas aos IPs (SG). A mostra SG-2 não foi agrupada com nenhum dos tratamentos propostos neste estudo. O dendograma indica que o transcriptoma digestivo da segunda geração tem maior similaridade com as lagartas expostas aos IPs. A distância foi calculada com o pacote *PoissonDistance* do R e corresponde à distância de Poisson.



Figura S2. Análise de componentes principais dos nove tratamentos. Lagartas da primeira geração alimentadas com dieta artificial controle (Ctl), lagartas da primeira geração alimentadas com dieta artificial suplementada com IPs (IPS), progênies de lagartas alimentadas com dieta com IPs (SG). Duas amostras podem estar sendo influenciadas por algum fator externo ao experimento e por tanto não foram agrupadas junto com as outras do mesmo tratamento. Para ter mais confiabilidade nos dados foram excluídas para as análises subsequentes.



Figura S3. *Heatmap* construído a partir de dados de RNA-seq de *H. armigera* depositados no NCBI. Foram selecionados os genes alterados significativamente pela exposição aos IPs (Log2-FoldChange > 1 e < -1 e *p-adjustado* <0.05) com funções proteolíticas e funções regulatórias. Os valores de transcritos por milhão (TPM) foram quantificados de cada unidade experimental (SRR*). Todos os tratamentos foram selecionados de experimentos de RNA-seq

74

que usaram o tecido de intestino da *H. armigera.* Os dados foram padronizados usando a função *scale* do software R.

Corrida (NCBI)	Instituição de pesquisa	Local de coleta	Equipamento
SRR1577114	GEO	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR1577115	GEO	Não disponível	Illumina HiSeq 2000 Illumina HiSeq
SRR1577116	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577117	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577118	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577119	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577120	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577121	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577122	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577123	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577124	GEO	Não disponível	2000 Illumina HiSeq
SRR1577125	GEO Embrapa Genetic	Não disponível	2000
SRR10345445	Resources and Biotechnology Embrapa Genetic	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR10345446	Resources and Biotechnology Embrapa Genetic	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR10345447	Resources and Biotechnology Embrapa Genetic	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR10345448	Resources and Biotechnology	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR10345449	Embrapa Genetic	Não disponível	Illumina HiSeq 2000

Tabela 1S. Código dos experimentos de RNA-seq em *H. armigera* que foram disponibilizados no NCBI

	Resources and Biotechnology		
	Embrapa Genetic		
SRR10345450	Resources and Biotechnology	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR10424544	Chongqing University Chongging	China	HiSeq X Ten
SRR10424545	University	China	HiSeq X Ten
SRR10424546	Chongqing University	China	HiSeq X Ten
SRR10424547	Chongqing University	China	HiSeq X Ten
SRR1980933	Institute of Plant Physiology and Ecology, Shangha	China	Illumina HiSeq 2000
	Institute of Plant Physiology and		
SRR1980934	Ecology, Shangha Institute of Plant Physiology and	China	Illumina HiSeq 2000
SRR1980935	Ecology, Shangha	China	Illumina HiSeq 2000
SRR1980937	Institute of Plant Physiology and Ecology, Shangha	China	Illumina HiSeq 2000
SRR1980938	Institute of Plant Physiology and Ecology, Shangha	China	Illumina HiSeq 2000
	Institute of Plant Physiology and Ecology,		Illumina HiSeq
SRR1980940	Shangha Institute of	China	2000 Illumina HiSea
SRR5631167	Zoology, Cas	China	2000
SRR5631168	Zoology, Cas	China	2000

SRR5631169	Institute of Zoology, Cas	China	Illumina HiSeq 2000
SRR5631170	Institute of Zoology, Cas	China	Illumina HiSeq 2000
SRR5631171	Institute of Zoology, Cas	China	Illumina HiSeq 2000
SRR5631172	Institute of Zoology, Cas	China	Illumina HiSeq 2000
SRR7035886	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035891	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035893	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035894	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035895	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035896	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035897	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035900	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035901	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035904	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035905	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR7035907	Northwest A&F University	China	Illumina HiSeq 2500
SRR8061514	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061515	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061516	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061517	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061518	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000

SRR8061519	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061520	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8061521	Henan Agricultural University	Não disponível	Illumina HiSeq 2000
SRR8442774	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR8442775	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR8442776	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR8442777	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR8442778	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR8442779	Chines Academy of Agricultural Sciences	China	Illumina HiSeq 2000
SRR9594315	Henan Agricultural University	China	Illumina HiSeq 2000
SRR9417763	Henan Agricultural University	China	Illumina HiSeq 2000
SRR9594314	Henan Agricultural University	China	Illumina HiSeq 2000
SRR9594316	Henan Agricultural University	China	Illumina HiSeq 2000

4. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUENCIAS DE SERINO PEPTIDASES DE LAGARTAS DE *Helicoverpa armigera*

Resumo

Insetos generalistas conseguem superar os efeitos antinutricionais dos inibidores de peptidase produzidos pelas plantas, pela regulação dinâmica de genes que codificam serino peptidases. Além disso, é possível especular a ocorrência de mecanismos epigenéticos no controle de expressão. Para estudar os mecanismos estruturais que podem estar associados à plasticidade transcricional, foi realizada uma análise comparativa da estrutura dos genes de tripsinas e quimotripsinas de H. armigera usando ferramentas de bioinformática. Elementos de transposição (ETs), motivos conservados e ilhas CG foram caracterizados em genes de serino peptidases. Um total de 31 genes de tripsinas e 25 genes de quimotripsinas foram identificados com a triada catalítica completa. Seis dos genes de serino peptidases podem ter funções não catalíticas. Grande parte dos genes de serino peptidases são provavelmente resultado de duplicação recente e estão localizados em tandem (como se fossem sequencias repetitivas) compartilhando regiões regulatórias. Foram identificados (ETs) e motivos conservados na região promotora, mas não foram associados na resposta aos inibidores de peptidase de soja (IPs). Ilhas CG são abundantes ao longo das sequencias de tripsinas e quimotripsinas, sugerindo que mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação diferencial de tripsinas e quimotripsinas de acordo às necessidades da H. armigera.

Palavras-chave: Insetos generalistas, proteases, epialelos, lepidóptera.

Abstract

Generalist insects can overcome the antinutritional effects of plantproduced peptidase inhibitors by dynamically regulating genes encode serine peptidases. Furthermore, it is possible to speculate the occurrence of epigenetic mechanisms in expression control. To study the structural mechanisms that may be associated with transcriptional plasticity, a comparative analysis of the structure of trypsin and chymotrypsin genes from H. armigera was performed using bioinformatics tools. Transposition elements (ETs), conserved motifs and CG islands were characterized in serine peptidase genes. A total of 31 trypsin genes and 25 chymotrypsin genes were identified with the complete catalytic screen. Six of the serine peptidase genes may have non-catalytic functions. Most of the serine peptidase genes are probably the result of recent duplication disposed in tandem (as if they were repetitive sequences) sharing regulatory regions. We identified (ETs) and conserved motifs in the promoter region but were not associated in response to soy peptidase inhibitors (SPI). CG islands are abundant along the trypsin and chymotrypsin sequences, suggesting that epigenetic mechanisms may be involved in the differential regulation of trypsins and chymotrypsins according to the needs of H. armigera.

Keywords: Generalist insects, proteases, epialleles, lepidoptera.

Os insetos polífagos ameaçam diversas produções agrícolas ao redor do mundo. A conquista exitosa do grande número de plantas hospedeiras é atribuído à regulação dinâmica de enzimas digestivas (Chikate et al. 2013; Souza et al. 2016). Lagartas de *H. armigera* são capazes de produzir um amplo espectro de enzimas proteolíticas no sistema digestivo (Bown et al. 1997, 2004), sendo as serino peptidases responsáveis do em torno de 85% dos processos digestivos (Lomate et al. 2018; Chandra et al. 2018). As plantas tentam superar os ataques dos insetos herbívoros produzindo inibidores de enzimas digestivas. Não obstante, os insetos polífagos superam o efeito anti-nutricional dos inibidores devido ao amplo repertorio de enzimas digestivas (Terra et al. 2019; Dias et al. 2015) e a plasticidade transcricional (Brioschi et al. 2007; Souza et al. 2016).

A regulação de expressão gênica é o maior responsável da plasticidade fenotípica da *H. armigera*. A regulação da síntese de transcritos está envolvida na adaptação do inseto a moléculas de defensa das plantas (Kuwar et al. 2015; Chandra et al. 2018), tolerância aos inseticidas (Xu et al., 2018), formação de epialelos moleculares (Capitulo 2, este estudo). Não obstante, as bases moleculares são pouco compreendidas (Chikate et al., 2013; Lomate et al., 2018; Terra et al., 2019). Modelos do controle de expressão de genes foram propostos desde inícios dos anos 60 (Jacob e Monod, 1961). No entanto, estudos posteriores demostraram que a regulação transcricional é muito mais complexa e depende da interação promotora são um dos fatores que mais afetam a taxa da síntese de transcritos. A regulação gênica é afetada frequentemente pela presença de elementos de transposição (Klai et al., 2020), RNAs reguladores (Lomate et al., 2014), cis elementos (Zhao et al., 2018), ilhas CG (Morgan and Marioni, 2018) e modificações epigenéticas (Jones et al., 2018).

Os mecanismos de regulação gênica são ainda pouco conhecidos. Inclusive, nos organismos modelo mais estudados, como a *Escherichia coli*, grande parte dos mecanismos de regulação gênica ainda não são completamente entendidos (Fang et al., 2017). Diferentes abordagens matemáticas estão sendo estabelecidas em espécies modelos para a predição da regulação gênica (Tantale et al., 2016; Cao et al., 2019; Phillips et al., 2019). A fim de estudar se a estrutura dos genes de serino peptidases desempenha papel no mecanismo de ativação transcricional e na formação de epialelos moleculares, foram realizadas análises comparativas de genes de tripsinas e quimotripsinas de *H. armigera* utilizando ferramentas de bioinformática.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Análise filogenética de genes de tripsinas e quimotripsinas

Sequências de genes serino peptidases foram recuperadas do banco de dados do NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome) usando o programa BLASTP. As sequências previstas foram divididas em serino peptidases selecionando aquelas que apresentam o domínio característico da família (IPR001254). Uma segunda seleção se realizou identificando as sequências que apresentavam a tríade catalítica completa (His57, Asp102 e Ser195). Posteriormente, se realizou a classificação das tripsinas e quimotripsinas de acordo com o aminoácido na posição 159 (Asp para tripsina).

As sequencias de aminoácidos de tripsinas e quimotripsinas foram alinhadas usando o programa MAFFT (https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/) (Katoh, Rozewicki, e Yamada 2018). árvore filogenética foi construída **IQ-TREE** А com 0 software (http://www.igtree.org/doc/molevol) modelo considerando 0 de melhor ajuste (Kalyaanamoorthy et al. 2017). O suporte estatístico da árvore filogenética foi realizado com o teste Bootstrap com 1000 repetições. A árvore foi analisada no software FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Os valores de expressão gênica foram recuperados da análise de RNA-seg e plotados junto com a árvore filogenética usando o pacote ggplot2 do software R (Wickham 2009).

4.2.2. Mapeamento de ilhas CG

O mapeamento de ilhas CG foi realizada nas sequencias de genes de tripsinas e quimotripsinas como também das regiões regulatórias. Sequências de genes de serino peptidase foram obtidas do banco de dados do NCBI GenBank (https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/genome) como o descrito anteriormente. Um total de 29 genes de tripsinas e 21 genes de quimotripsinas foram identificados com a triada catalítica completa. As sequencias gênicas foram analisadas com o programa de predição de ilhas CG CpGPLOT (http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/). A análise foi realizada com os parâmetros padrão do CpGPLOT: em uma média de 10 janelas e não menos que 200 bases, o conteúdo calculado (%G+%C) é superior a 50% e a relação observada/esperada calculada é superior a 0,6. Da mesma forma, foram mapeadas as ilhas CG de 5 kb das regiões regulatórias (upstream e downstream). Finalmente, foi realizada uma análise descritiva da posição, comprimento e frequência das ilhas CG ao longo das sequencias gênicas.

4.2.3. Identificação de elementos de transposição

A identificação de elementos de transposição em genes de tripsinas e quimotripsinas foi realizada segundo método de Kohany et al. (2006). Para a análise, foi selecionar a região promotora (-250 pb) desde o começo da região codante. As sequências foram submetidas ao banco de dados de DNA repetitivo *RepBase* (https://www.girinst.org/) (Kohany et al. 2006). Os genes foram classificados de acordo com as características definidas pelo programa.

4.2.4. Identificação de motivos conservados

A identificação de sequências conservadas foi realizada somente na região promotora dos genes de tripsinas e quimotripsinas. Arquivos contendo 1 kb da região *upstream* genes foram alinhados de acordo com a metodologia descrita por (Bailey e Elkan 1994). As análises foram realizadas usando o programa *MEME Version* 5.3.0. (http://meme-suite.org/) usando os parâmetros recomendados pelo *software MEME* (Bailey e Elkan 1994). Finalmente, os resultados foram comparados com os dados de expressão gênica com o propósito de identificar motivos que podem estar envolvidos no controle da expressão de genes de serino peptidases.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. A estrutura dos genes de serino peptidases sugere um possível controle transcricional associado a fenômenos epigenéticos

Grande parte dos genes das serino peptidase estão agrupados no mesmo fragmento do DNA, muito próximos um dos outros à semelhança de sequências repetitivas. A microsintenia – aqui estimada em um genoma muito fragmentado com 998 *scaffolds* e 24,552 *contigs* (Pearce et al. 2017) – de genes de tripsinas e quimotripsinas sugere que as espécies ancestrais da *H. armigera* herdaram poucos genes de serino peptidases e que cópias extras foram obtidas por duplicação gênica, o que parece ser um fenômeno comum nos dípteras e lepidópteros (Sánchez-paz, Muhlia-almazán, e García-carreño 2008). Embora as sequências exibiram pouco polimorfismo, os resultados de expressão gênica indicam que em alguns casos a diversidade genética foi suficiente para causar divergência funcional (Figura 1-2). Portanto, nem todos os genes com alto grau de identidade foram significativamente regulados na presença dos IPs, embora o 88% tendem a ser ativados pelos IPs (Figura 1-2). Inclusive, genes que perderam aminoácidos da tríade catalítica (necessária para clivar as ligações peptídicas) foram significativamente regulados (Figura 1-2), o que aponta para um possível papel funcional destas proteínas na resposta aos IPs.



Figura 1. Filogenia molecular das sequencias de tripsinas *H. armigera* e expressão relativa de genes no sistema digestivo das lagartas expostas aos IPs. As análises filogenéticas foram realizadas usando o algoritmo *Neighbor-Joining*. O número de cada nó representa o valor de *bootstrap* para 1000 repetições. Os resultados de expressão gênica foram recuperados dos resultados de RNA-seq (como descrito no capítulo 2). Em vermelho, estão destacadas as sequencias sem a tríade catalítica completa (His57, Asp102 e Ser195). Detalhes do alinhamento da tríade catalítica são apresentados na Figura S1. Em amarelo, estão destacados os genes que foram expressos significativamente (*p-adjust* <0.05, Fold-Change >1 ou < -1) expressos no sistema digestivo das progênies de lagartas que foram expostas aos IPs na primeira geração (epialelos potenciais).

A formação de amplos *clusters* no genoma de *H. armigera* pode ser devido a duplicações gênicas e *crossing over* desigual, como foi sugerido em *Bombix mori* (Ross et al. 2003). Como resultado, a alta densidade de genes de serino peptidases agrupadas no genoma compartilham regiões regulatórias usando combinações de terminador/promotor que podem afetar a transcrição gênica. Estudos em *Plutella xylostella*, sugerem que os arranjos de genes serino peptidase em lepidopteras não têm nenhuma significância biológica no controle transcricional (Lin et al. 2015). No entanto, recente evidência indica que, em outros organismos, os genes ligados podem proporcionar um mecanismo coordenado de controle de expressão gênica (Hegde e Crowley 2019) e pode favorecer a eficiência do processo transcricional (Nakajima, Costa, e Lemke 2020). Consequentemente, as unidades de transcrição dispostas em tandem podem sofrer pressão seletiva.



Figura 2. Filogenia molecular das quimotripsinas de *H. armigera* e expressão relativa de genes no sistema digestivo das lagartas expostas aos IPs. As análises filogenéticas foram realizadas usando o algoritmo *Neighbor-Joining*. O número de cada nó representa o valor de *bootstrap* para 1000 repetições. Os resultados de expressão gênica foram recuperados dos resultados de RNA-seq. Em vermelho, estão destacadas as sequencias sem a tríade catalítica completa (His57, Asp102 e Ser195). Detalhes do alinhamento da tríade catalítica são apresentados na Figura S2.

A transcrição de genes que compartilham regiões regulatórias pode interferir diretamente na transcrição do gene oposto, o que tem sido denominado como interferência transicional (Prescott e Proudfoot 2002). Este fenômeno pode ocorrer com o aumento da densidade das polimerases (Ali et al. 2019) ou quando o alongamento da transcrição não termina adequadamente (Prescott e Proudfoot 2002). Em consequência, o avanço da transcrição bloqueia fisicamente o avanço da polimerase da cadeia oposta (em genes orientados de forma convergente) ou também inativa a região promotora do gene adjacente (em genes orientados em tandem). De forma simples, o aumento da transcrição de um gene pode ser a causa da inibição de outro gene adjacente, supondo que o primeiro seja deficiente no sinal de terminação para interromper o avanço da polimerase.

Por outro lado, genes curtos são sintetizados a uma velocidade maior. Em bactérias, por exemplo, a RNA polimerase selvagem sintetiza transcritos a uma velocidade de 80-90 nucleotídeos por segundo (Dennis et al. 2009; Nakajima et al. 2020). Considerando estas propriedades biofísicas, a ativação de genes curtos como LOC110380585 seria uma estratégia de resposta aos IPs nove vezes mais rápida que a ativação de genes longos como

LOC110372637, e a um custo metabólico menor. Embora modelos indicam que a taxa de transcrição pode ser independente do comprimento do gene. Por exemplo, o número de transcritos pode ser igual ao número de polimerases espaçadas por centenas de nucleotídeos ao longo do gene, denominadas de comboios de RNA polimerases (Tantale et al. 2016).

As etiquetas de reconhecimento destes genes longos que marcam os que devem ser desativados estão sendo reveladas em outros organismos. Em camundongos, a expressão de genes longos das células neuronais é reprimida via metilação de DNA (Boxer et al. 2020). Proteínas repressoras de ligação ao DNA metilado (MeCP2) se ligam ao corpo de genes longos densamente metilados e reprimem a taxa de iniciação transcricional (Boxer et al. 2020). Genes de serino peptidases da *H. armigera* são ricos em ilhas CG, o qual sugere que a metilação do DNA poderia ter um papel no controle traducional.

4.3.2. A arquitetura do promotor revela pistas sobre a ativação de genes serino peptidase

Motivos regulatórios poderiam estar atuando como interruptor na regulação dinâmica dos genes serino peptidase. Regiões conservadas foram identificadas no promotor de genes serino peptidase (Figura 1-2), embora, não foram associadas aos mecanismos de resposta aos IPs. Motivos regulatórios foram envolvidos na regulação de genes responsáveis pela adaptação da *H. armígera* a plantas hospedeiras, resistência a inseticidas (Xu et al. 2018), no reconhecimento de feromônios sexuais (Wang et al. 2018). Muitos outros motivos poderiam estar esperando ser caracterizados nos promotores da *H. armígera*. Em *Drosophila melanogaster* existem pelo menos 656 motivos descritos nas bases de dados MEME (Bailey et al. 2009).

Os resultados do *RepBase* indicam que existem elementos de transposição (ETs) na região regulatória em seis genes de serino peptidases (Tabela 11). No entanto, o grupo de genes que foi diferencialmente expresso na presença dos IPs não apresentou uma sequência regulatória conservada no promotor. Alguns padrões foram identificados. Por exemplo, o mesmo ET foi identificado no promotor (250 kb) dos genes LOC110379016 e LOC110380579, o que sugere que a inserção ocorreu antes da duplicação gênica. O mapeamento de ETs promotor ao longo de 1 kb revelou que todos os genes possuem pelo menos um ET na região regulatória (Figura S3-S4) e não seria surpreendente que tenham contribuído à formação de multigenes de serino peptidases. Em macacos, por exemplo, a duplicação do gene γ-globina parece ser o resultado de recombinação entre os ETs que flanqueiam o gene ancestral (Maeda e Smithies 1986). Em genes de quimotripsinas foram identificados 57 fragmentos de ETs (Figura S3), em abundância similar para as classes de transposons, retrotransposons

LTR e retrotransposons Non-LTR (19, 19 e 16, respetivamente). Em genes que codificam tripsinas foram identificados 65 fragmentos de ETs (Figura S4), foram mais predominantes as classes de transposons em relação aos retrotransposons LTR e retrotransposons Non-LTR (35, 11 e 18, respetivamente).

Tabela 1. Presença de ETs no promotor de genes de serino peptidase de *H. armigera*.

Locus	Classe	Score
LOC110379016	LTR/Copia	217
LOC110380579	LTR/Copia	249
LOC110380585	DNA/Polinton	208
LOC110380588	DNA/Helitron	442
LOC110383548	NonLTR/L1	215
LOC110384561	DNA/EnSpm/CACTA	272

O grupo de genes que foi altamente expresso na presença dos IPs não apresentou ETs na região promotora mais próxima ao início da transcrição (250 pb). A ausência de ETs poderia ser uma das características necessárias para o aumento do processo transcricional. O efeito negativo da presença de ETs sobre a taxa da transcrição é conhecido desde a descoberta de ETs por Barbara McClintock, no final da década de 1940 (McClintock 1950). Atualmente, abundante literatura mostra o papel dos ETs no controle transcricional de diferentes espécies (revisado por Fambrini *et al.* 2020; Young *et al.* 2020).

Raramente as inserções de ET trazem valores adaptativos imediatos nos hospedeiros. Alguns estudos mostram o papel dos ETs na adaptação de lepidópteros como *Biston betularia* à predação (Hof et al. 2016) e *H. armigera* aos inseticidas (Klai et al. 2020). O maior efeito dos ETs sobre a transcrição de genes é causado por alterações no estado da cromatina. ETs podem propagar marcas epigenéticas repressivas como H3K9me2 por até 20 kb nas proximidades do sítio de inserção (Lee e Karpen 2017). Por outro lado, ETs podem também reduzir ou abolir o processo transcricional pela ruptura do sítio de iniciação transcricional ou de regiões regulatórias (*cis-elements*) (Fambrini et al. 2020).

4.3.3. Os genes de serino peptidases são enriquecidos com ilhas CG predominantemente na região codante

A análise *in silico* indicou que quase todos os genes de tripsinas e quimotripsinas estudados possuem pelo menos uma ilha CG (Figura 13). Dentre as 50 sequências de genes

de serino peptidases, o gene LOC110383665 foi o único desprovido de regiões significativamente enriquecidas com dinucleotideos CG. Os outros 49 genes podem ter até 6 ilhas CG que com frequência estão espalhadas na região codante (Figura 13). O comprimento médio das ilhas CG nas regiões codantes foi também maior entre 10-24 pb, comparado com o comprimento das ilhas CG das regiões regulatórias (*upstream* e *downstream*).

A presença de ilhas CG nos genes serino peptidases revelam uma história evolutiva interessante. Existe uma diferença discrepante entre grupos de genes que possuem abundantes ilhas CG e outros que carecem deste tipo de sequências, o que poderia ser o resultado de processos evolutivos sobre a arquitetura do genoma de *H. armigera*. A ausência de ilhas CG na região codante do gene de tripsina LOC110383665 sugere que pode ser uma cópia de recente duplicação. Ao menos em mamíferos, tem sido demostrado que regiões promotoras ricas em ilhas CG possuem maior polimorfismo e evoluem mais rapidamente que pormotores pobres em ilhas CG (Carninci et al. 2007). De tal forma que, as ilhas CG são consideradas por alguns pesquisadores como sequências de cópia única no genoma, embora possam compartilhar regiões conservadas como sítios de ligação para fatores de transcrição (Antequera e Bird, 2018). Provavelmente, a pressão de seleção teve certa influência no surgimento das ilhas CG deixando uma marca evolutiva no genoma da *H. armigera*.



Figura 13. Distribuição de ilhas CG para genes de tripsinas e quimotripsinas de *H. armigera*. O mapeamento de ilhas CG foi realizado ao longo do corpo dos genes e em 5 kb das regiões regulatórias (*upstream* e *downstream*).

O arranjo dos genes em tandem e o alto conteúdo de CG, são características dos genes das serino peptidases e sugerem que a expressão poderia estar sendo regulada por modificações epigenéticas. Suficiente literatura mostra o papel das ilhas CG no controle de expressão genes através da metilação do DNA e modificações de histonas (revisado por Antequera e Bird, 2018). Existe uma relação significativa entre metilação do DNA e controle de expressão de genes (Antequera e Bird 2018; Field et al. 2004; Hsieh 2016) como tem sido demostrado em *H. armigera* analisando dados de metiloma e trascriptoma (Jones et al. 2018).

Assim, a estrutura dos genes de serino peptidases indicou à metilação do DNA como o mecanismo direto de regulação gênica de enzimas digestivas. Não obstante, os resultados do WGBS (*Whole-Genome Bisulfite Sequencing*) e BSP (*Bisulfite Sequencing PCR*) revelaram que o mecanismo de controle transcricional de genes de serino peptidases pode ser ainda mais complexo.

4.4. Conclusões

Genes de serino peptidases altamente expressas nas condições experimentais carecem ETs na região regulatória *upstream*. Nem todos os genes deficientes de ETs na região promotora foram ativados positivamente. Três motivos conservados podem estar atuando na regulação transcricional dos genes de serino peptidases, mas que não foram associados à resposta provocada pela alimentação das lagartas com IPs. O mapeamento de ilhas CG revelou que quase a totalidade de genes de serino peptidase possui pelo menos uma ilha CG, concentradas predominantemente na região codante. A estrutura dos genes serino peptidase da *H. armigera* sugere que são passíveis de modificações epigenéticas e podem estar associados à plasticidade transcricional do sistema digestivo.

Referências

- Ali, M. Z., Choubey, S., Das, D., e Brewster, R. C. (2019). Probing mechanisms of transcription elongation through cell-to-cell variability of RNA polymerase. *BioRxiv*. https://doi.org/10.1101/655712
- Antequera, F., e Bird, A. (2018). CpG Islands: A historical perspective. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1766, pp. 3–13). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7768-0
- Bailey, T. L., e Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2, 28–36. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7584402/
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., e Noble, W. S. (2009). MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), W202–W208. https://doi.org/10.1093/nar/gkp335
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (1997). Differentially regulated inhibitorsensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7), 625–638. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00043-X
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., e Gatehouse, J. A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiological Entomology*, *29*(3 SPEC. ISS.), 278–290. https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x
- Boxer, L. D., Renthal, W., Greben, A. W., Whitwam, T., Silberfeld, A., Stroud, H., Li, E., Yang, M. G., Kinde, B., Griffith, E. C., Bonev, B., e Greenberg, M. E. (2020). MeCP2 represses the rate of transcriptional initiation of highly methylated long genes. *Molecular Cell*, 77(2), 294-309.e9. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.032

- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., e Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1283–1290. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016
- Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Frith, M. C., Ponjavic, J., Semple, C. A. M., Taylor, M. S., Forrest, A. R. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-katayama, M., Kitazume, Y., ... Hume, D. A. (2007). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, *38*(6), 626–630. https://doi.org/10.1038/ng1789
- Chikate, Y. R., Tamhane, V. A., Joshi, R. S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2013). Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 22(3), 258–272. https://doi.org/10.1111/imb.12018
- Choi, J. Y., e Lee, Y. C. G. (2020). Double-edged sword: The evolutionary consequences of the epigenetic silencing of transposable elements. *PLOS Genetics*, *16*(7), e1008872. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008872
- Dennis, P. P., Ehrenberg, M., Fange, D., e Bremer, H. (2009). Varying rate of RNA chain elongation during rrn transcription in *Escherichia coli. Journal of Bacteriology*, 191(11), 3740–3746. https://doi.org/10.1128/JB.00128-09
- Fambrini, M., Usai, G., Vangelisti, A., Mascagni, F., e Pugliesi, C. (2020). The plastic genome: The impact of transposable elements on gene functionality and genomic structural variations. *Genesis*, e23399. https://doi.org/10.1002/dvg.23399
- Field, L. M., Lyko, F., Mandrioli, M., e Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology*, *13*(2), 109–115. https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00470.x
- Hegde, M. R., e Crowley, M. R. (2019). Genome and gene structure. In *Principles and Practice* of *Medical Genetics and Genomics: Foundation* (pp. 53–77). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812537-3.00004-4
- Hof, A. E. V. t., Campagne, P., Rigden, D. J., Yung, C. J., Lingley, J., Quail, M. A., Hall, N., Darby, A. C., e Saccheri, I. J. (2016). The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element. *Nature*, 534(7605), 102–105. https://doi.org/10.1038/nature17951
- Hsieh, T.-F. (2016). Epigenetics: A tug of war for DNA methylation. *Nature Plants*, 2(11), 16171. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.171
- Jones, C. M., Lim, K. S., Chapman, J. W., e Bass, C. (2018). Genome-wide characterisation of DNA methylation in an invasive lepidopteran pest, the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Genes/Genomes/Genetics*, *8*(March), 779–787. https://doi.org/10.1534/g3.117.1112
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., e Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/NMETH.4285
- Katoh, K., Rozewicki, J., e Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. https://doi.org/10.1093/BIB/BBX108

- Klai, K., Chenais, B., Zidi, M., Djebbi, S., Caruso, A., Denis, F., Confais, J., Badawi, M., Casse, N., e Mezghani, M. (2020). Screening of *Helicoverpa armigera* mobilome revealed transposable element insertions in insecticide resistance genes. *Insects*, *11*(12), 879. https://doi.org/10.3390/insects11120879
- Kohany, O., Gentles, A. J., Hankus, L., e Jurka, J. (2006). Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. BMC Bioinformatics, 7, 1–7. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-474
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., e Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *59*, 18–29. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.016
- Lee, Y. C. G., e Karpen, G. H. (2017). Pervasive epigenetic effects of *Drosophila* euchromatic transposable elements impact their evolution. *ELife*, 6. https://doi.org/10.7554/eLife.25762
- Lin, H., Xia, X., Yu, L., Vasseur, L., Gurr, G. M., Yao, F., Yang, G., e You, M. (2015). Genomewide identification and expression profiling of serine proteases and homologs in the diamondback moth, Plutella xylostella (L.). *BMC Genomics*, 16(1), 1054. https://doi.org/10.1186/s12864-015-2243-4
- Lomate, P. R., Dewangan, V., Mahajan, N. S., Kumar, Y., Kulkarni, A., Saxena, S., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2018). Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. *Molecular and Cellular Proteomics*.
- Maeda, N., e Smithies, O. (1986). The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annal Review of Genetics*, *20*, 81–108. www.annualreviews.org
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *36*(6), 344–355. https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344
- Nakajima, R. T., Costa, P. R., e Lemke, N. (2020). Cooperative and sequence-dependent model for RNAP dynamics: Application to ribosomal gene transcription. *Journal of Theoretical Biology*, 488, 110134. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110134
- Pearce, S. L., Clarke, D. F., East, P. D., Elfekih, S., Gordon, K. H. J., Jermiin, L. S., McGaughran, A., Oakeshott, J. G., Papanicolaou, A., Perera, O. P., Rane, R. V., Richards, S., Tay, W. T., Walsh, T. K., Anderson, A., Anderson, C. J., Asgari, S., Board, P. G., Bretschneider, A., ... Wu, Y. D. (2017). Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive Helicoverpa pest species. *BMC Biology*, *15*(63), 1–30. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0413-3
- Prescott, E. M., e Proudfoot, N. J. (2002). Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(13), 8796– 8801.4
- Ross, J., Jiang, H., Kanost, M. R., e Wang, Y. (2003). Serine proteases and their homologs in the Drosophila melanogaster genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. 304, 117–131.

- Sánchez-paz, A., Muhlia-almazán, A., e García-carreño, F. L. (2008). Invertebrate trypsins: a review. *Journal Comp Physiol B*, *178*, 655–672. https://doi.org/10.1007/s00360-008-0263-y
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., e Krishna Kumar, N. K. (2018). Double-stranded RNA-mediated suppression of trypsin-like serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 746–761. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2584-3
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhano, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S., e Silva-filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression pro fi ling of the trypsin and chymotrypsin genes from lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 196–197, 67–73. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007
- Tantale, K., Mueller, F., Kozulic-Pirher, A., Lesne, A., Victor, J.-M., Robert, M.-C., Capozi, S., Chouaib, R., Bäcker, V., Mateos-Langerak, J., Darzacq, X., Zimmer, C., Basyuk, E., e Bertrand, E. (2016). A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nature Communications*, 7(1), 12248. https://doi.org/10.1038/ncomms12248
- Terra, W. R., Barroso, I. G., Dias, R. O., e Ferreira, C. (2019). Molecular physiology of insect midgut. In Advances in Insect Physiology (Vol. 56, pp. 117–163). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2019.01.004
- Dias, A., Dias, R. O., Via, A., Brand, M. M., Silva-filho, M. C., Brandão, M. M., Dias, A., e Silvafilho, M. C. (2015). Digestive peptidase evolution in holometabolous insects led to a divergent group of enzymes in lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.009
- Wang, B., Liu, Y., e Wang, G.-R. (2018). Proceeding from in vivo functions of pheromone receptors: peripheral-coding perception of pheromones from three closely related species, *Helicoverpa armigera*, *H. assulta*, and *Heliothis virescens*. Frontiers in Physiology, 9(AUG), 1188. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01188
- Wickham, H. (2009). ggplot2. In ggplot2. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3
- Xu, L., Li, D.-Z., Luo, Y.-Y., Qin, J.-Y., e Qiu, L.-H. (2018). Identification of the 2-tridecanone cis -acting element in the promoter of cytochrome P450 CYP6B7 in *Helicoverpa armigera*. *Insect Science*, *25*(6), 959–968. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12479

Material suplementar



Figura S1. Alinhamento da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) das sequencias de tripsinas de *H. armigera*. O alinhamento de Asp189 é conservado para tripsinas. Os números foram estabelecidos com base na quimotripsina bovina *Bos taurus* (UniProt: P00766).

	(57)					(102)
$\begin{array}{c} PP \ 0.21 \ 188570 \\ PP \ 0.21 \ 189544 \\ PP \ 0.21 \ 189544 \\ PP \ 0.21 \ 189544 \\ PP \ 0.21 \ 180546 \\ PP \ 0.21 \ 181586 \\ PP \ 0.21 \ 181586 \\ PP \ 0.21 \ 181586 \\ PP \ 0.21 \ 184533 \\ PP \ 0.21 \ 184533 \\ PP \ 0.21 \ 184533 \\ PP \ 0.21 \ 18558 \\ PP \ 0.21 \ 18558 \\ PP \ 0.21 \ 19558 \\ PP \ 0.21 \ 201453 \\ PP \ 0.21 \ 201455 \\ PP \ 0.21 \ 201555 \ PP \ 0.21 \ 201555 \\ PP \ 0.21 \ 201555 \ PP \ 0.21 \ 2015555 \ PP \ 0.21 \ 201555555555555555555555555555555555555$				S S S S S S S S S S S S S S	NYNDEL TYDEKEL DYNDEL DYNDEL LAVL VO VYNDEL DYNDEL LOYNEL DYNDEL DYNDEL LAVL VO OWNSPEN SWNPPN SWNPN SWNPN SWNPN S	IM IA IA IM IA IM IM IA IM <
			(189) (195)			
XP_021188570 XP_021190221 XP_021190221 XP_021191392 XP_021191392 XP_021191406 XP_021194103 XP_0211945235 XP_0211945235 XP_021201453 XP_021201453 XP_021201454 XP_021201455 XP_021201455 XP_021201455 XP_021201458 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201465 XP_021201495 XP_021201495 XP_021201495 XP_021201515 XP_021201515 XP_021201515 XP_021201552	YY T PY QVI QVI QVI RY	K- STGD- STG	GGC CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			

Figura S2. Alinhamento da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) das sequencias de quimotripsinas de *H. armigera*. O alinhamento de Asp189 é conservado para tripsinas. Os números foram estabelecidos de acordo com a quimotripsina bovina *Bos taurus* (UniProt: P00766).

Δ	5
2	J

XP_021188570	(⊕0⊖)	XP_021201458.1	(⊕0⊖)
ERV/ERV1, DNA/ERV1,	DNA/Hat, NonLTR/Rex1, LTR/Copia	LTR/Gypsy, LTR/Gypsy,	LTR/Gypsy
XF_021103344		XF_021201433.1	
DNAMADD			
XP 021191392		LTR/Gypsy, DNA/EnSpn XP 021201460.1	
		_	
LTR/Gypsy, DNA/Helitro	n, DNA/ISL2EU	LTR/Gypsy, LTR/Gypsy,	DNA/hAT
XP_021191399	(⊕0⊖)	XP 021201465.1	
NonLTR/RTE, DNA/MuDR,	DNA/Helitron, DNA/Helitron, NonLTR/CR1, NonLTR		
XP 021194193	(#0=)	XP 021201466.1	(#00)
UNA XD 021195235		NonLIR/Daphne, LIR/G	ypsy
AP_021135235	<⊕0⊖>	XP_021201493.1	<⊕0⊖>
DNA/MuDR, LTR, DNA/k	Kolobok, DNA/Helitron	LTR/Gypsy	
XP_02119/61/.1		XP_021201494.1	(⊕0⊖)
NonLTR/Proto2, LTR/Gv	DSV	Neel TR/Neek, DNA/kAT	
XP 021200097		XP 021201495 1	
NonLTR/L1, DNA/hAT		NonLTR/Nimb	
XP_021201453.1	4⊕0⊖ ≻	XP_021201514	<⊕0⊖ ►
LTR		LTR/Copia	
XP_021201454.1	(⊕0⊖)	XP_021201515.1	(⊕0⊖)
LTR/BEL, NonLTR/CR1. D	NA. NonLTR/CR1. DNA/EnSom/CACTA	DNA, ERV/ERV1	
XP 021201455.1		XP 021201516 1	
Norl TP/PTF	_	TD/Greene Neel TD/DT	
		XP_021201518.1	
AP_021201456.1	1000	_	
		IntegratedVirus/Caulimov	virus
NOILIR/RIE		VD 004004550 4	
AF_02120143/	ישעטי	AP_021201002.1	
LTD/Commu		LTD/G	-
LIR/Gypsy		LIR/Gypsy	

Figura S3. Mapeamento de elementos de transposição em 1 kb da região promotora dos genes de quimotripsinas. A análise foi realizada usando os parâmetros padrão do programa *RepBase.*

XP_021183862.1	(⊕0⊖)	XP_021194194	4⊕0⊖ ⊁
LTR/Gypsy	-	DNA/bAT, DNA/Mariner	
XP 021184772 1		XP 021196263.1	(#0⊖)
DNA/piggyBac, DNA/He	elitron, LTR/Gypsy	DNA/Helitron, DNA/Helitron	
XP_021187221	(⊕0⊖)	XP_021196264.1	(⊕0⊖)
DNA/Halitana Naal TD/		DNA/Helitron	
DNA/Heiltron, NonLTRO	SINE/SINE2	Diverteinon	
XP_021190198.1	(⊕0⊖)	XP_021196267.1	(⊖0⊕)
DNA DNA/Helitron DN	A/Helitron	DNA/bAT_LTP/Gypsy_DNA	
XP 021190228 1		XD 021196271 1	
AF_021130220.1		AF_021130271.1	
NonLTR/RTE, DNA/Hel	itron,LTR/Gypsy, DNA/Mariner	NonLTR/SINE/SINE2, LTR/	Gypsy
XP_021193531.1	(⊕0⊖)	XP_021196272.1	(⊕0⊖)
DNA /h AT LTD/Conie		Internet Annual Parent Neel	TD/Tadd
DNA/NAT,LTR/Copia		interspersed_Repeat, NonL	IR/Tad1
XP_021193544.1	(⊕0⊖)	XP_021196273.1	(⊕0⊖)
DNA/PiggyBac,NonLTR	/Penelope, DNA/Mariner	DNA/Dada	
XP_021193552.1	(⊕0⊖)	XP_021196274.1	(⊕0⊖)
		LTR/Gypsy, DNA/Polinton	
XP_021193554.1		XP_021196275.1	(⊕0⊖)
LTR/Gypsy		DNA/Helitron, DNA/hAT, DN	IA/Helitron
XP_021193560.1	<⊕0⊖>	XP_021196277.1	(⊕0⊖)
NonLTR/CR1, DNA/Tra	nsib	DNA/Helitron, DNA/hAT, DN	IA/hAT
XP_021193562.1	<⊕o⊖>	XP_021196278.1	(⊕0⊖)
NonLTR/SINE/SINE2		DNA/Kalabak, DNA/Halitraa	
XP 021194187.1	(#00)	VD 024409654 4	(200)
		AF_V21190051.1	
NonLTR/SINE/SINE2.No	nLTR/CR1. DNA/Helitron	DNA/Helitron, LTR/Gypsy, I	NonLTR/Jockey

Figura S4. Mapeamento de elementos de transposição em 1 kb da região promotora dos genes de tripsinas. A análise foi realizada usando os parâmetros padrão do programa *RepBase.*

XP_021200016	<⊕0⊖ >
NonLTR/Daphne, LTR/BE	EL, LTR/Gypsy, NonLTR/L1
XP_021200140.1	(⊕0⊖)
NonLTR/Daphne	
XP_021200142.1	(⊕0⊖)
NonLTR/Daphne	
XP_021200143.1	(⊕0⊖)
NonLTR/Hero, DNA/EnSp	om/CACTA
XP_021201764	<⊕0⊖>
DNA, NonLTR/RTE, NonL	TR/RTE

Figura S4. Continuação. Mapeamento de elementos de transposição em 1 kb da região promotora dos genes de tripsinas. A análise foi realizada usando os parâmetros padrão do programa *RepBase*.

5. CAPÍTULO 4 – PAPEL DA METILAÇÃO DO DNA NA RESPOSTA MOLECULAR DE Helicoverpa armigera AOS INIBIDORES DE PEPTIDASE DE SOJA

Resumo

A metilação do DNA é a maior força de variação epigenética, a partir da modificação da estrutura do genoma afetando a acessibilidade da maguinaria transcricional. O objetivo do presente capítulo foi estudar um possível papel da metilação do DNA na resposta molecular do sistema digestivo da H. armigera aos inibidores de peptidase de soja (IPs). Realizamos a análise do sequenciamento do genoma completo tratado com bissulfito (WGBS, whole-genome bisulfite sequencing) do sistema digestivo de lagartas alimentadas com e sem IPs e das progênies de lagartas expostas aos IPs. Epialelos de metilação do DNA resistentes à reprogramação germinal foram identificados estudando o metiloma das progênies de larvas de H. armigera expostas aos IPs. Para comprovar a relação entre a metilação do DNA e a expressão de genes, lagartas de último instar de *H. armigera* foram injetadas com duas doses de 5-azacytidina (40 mM) a cada 24h. Os níveis de expressão de genes de tripsinas, quimotripsinas e genes metiltransferase de DNA (DNMTs) foram quantificados por RT-qPCR. Os resultados revelaram um total de 99 genes diferencialmente metilados quando as lagartas foram expostas à dieta artificial com IPs. Aproximadamente 20% dos padrões de metilação foram transmitidos por herança epigenética à descendência. Os genes de tripsinas e quimotripsinas foram quase por completo hipometilados em todos os tratamentos, inclusive no genoma dos tecidos dos adultos. Não obstante, as injeções com o inibidor de metilação do DNA inativaram os genes serino peptidase estudados, o que sugere um mecanismo indireto de regulação transcricional. No presente trabalho são apresentados potenciais genes candidatos que podem estar associados aos fenômenos epigenéticos adaptativos da H. armigera aos IPs.

Palavras-chave: epimutações, epialelos, lepidóptera, insetos generalistas.

Abstract

DNA methylation is the greatest force of epigenetic variation, affecting the genome structure to accessibility of the transcriptional machinery. The aim of this chapter was to study a role of DNA methylation in the molecular response of the H. armigera digestive system to soybean peptidase inhibitors (SPI). We performed whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) analysis of the digestive system of larvae fed with and without SPI. DNA methylation epialleles resistant to germinal reprogramming were identified by studying the methylome of progenies of H. armigera larvae exposed to SPI. To prove the relationship between DNA methylation and gene expression, last instar larvae of H. armigera were injected with two doses of 5-azacytidine (40 mM) every 24 hours. The expression levels of trypsin, chymotrypsin and DNMTs genes were quantified by RT-gPCR. The results revealed a total of 99 differentially methylated genes when the caterpillars were exposed to the artificial diet with SPI. Approximately 20% of methylation patterns were transmitted by epigenetic inheritance to offspring. Trypsin and chymotrypsin genes were almost completely hypomethylated in all treatments, including in the adult tissue genome. Nevertheless, the injections with the DNA methylation inhibitor inactivated the studied serine peptidase genes, which suggests an indirect mechanism of transcriptional regulation. In the present work, potential candidate genes that may be associated with the adaptive epigenetic phenomena of H. armigera to SPI are presented.

Keywords: epimutations, epialleles, lepidoptera, generalist insects.

5.1. Introdução

A metilação do DNA é a principal fonte de variação epigenética. A porcentagem de 5-metil-citosina em eucariotos pode variar desde 30% em plantas, 5-10% em vertebrados e até 0-3% em insetos (Zemach et al. 2010). Lagartas de *H. armigera* apresentam no máximo 0,9% das citocinas metiladas em dinucleotideos CG localizadas predominantemente da região codante (Jones et al. 2018). As funções da metilação do DNA são bastante diversas em eucariotos, embora em insetos ainda sejam pouco compreendidas. Estudos sugerem uma correlação positiva entre a metilação do DNA e a expressão de genes, principalmente associados a funções de manutenção celular (Hunt et al. 2013; Jones et al. 2018; Xu et al. 2021).

A metilação do DNA é catalisada por proteínas metiltransferase de DNA (DNMT). Estas enzimas transferem o grupo metil do doador universal S-adenosil-metionina (SAM) ao carbono cinco do resíduo de citosina do DNA. Novos padrões de metilação (*de novo*) são estabelecidos por DNMT3 em fitas de DNA não modificadas, que geralmente são mantidos em cada ciclo de replicação principalmente por DNMT1 (Goll e Bestor 2005). A DNMT2 tem especificidade e protege sequencias do RNA (Schaefer et al. 2010), não contribuindo significativamente ao metiloma (Goll et al. 2006). A *H. armigera* e outros insetos perderam o gene DNMT3 em algum ponto evolutivo e tem sido sugerido que a DNMT1 é responsável pela metilação *de novo* (Lyko 2018). Proteínas com domínios MBD (MBDs, *Methyl-CpG-binding domain*) ou metalloproteínas de zinco são outros componentes chaves no controle epigenético traducional vinculado à metilação do DNA. Em insetos, as proteínas MBD se ligam a fragmentos de DNA metilado e recrutam a acetiltransferase de histona Tip60 para promover a ativação gênica (Xu et al. 2021).

Os mecanismos epigenéticos são responsáveis por diversas características fenotípicas nos insetos. O papel das DNMTs na plasticidade comportamental tem sido estudado extensivamente em himenópteros (formigas, abelhas, vespas e moscas-serra) (Yan et al. 2015). Por exemplo, o metiloma é responsável pela divergência fenotípica das abelhas (operárias ou rainhas) que é determinado pelo estado nutricional das larvas (Kucharski et al. 2008). A dieta pode alterar os padrões de metilação do DNA e acetilação de histonas (Burdge et al. 2007; Faulk e Dolinoy 2011) e é um dos principais fatores de variação epigenética em insetos (Chittka e Chittka 2010; Mukherjee et al. 2015). Perturbações do metiloma podem afetar também processos do desenvolvimento dos insetos ou do sistema imune (Baradaran et al. 2019; Cook et al. 2019).

Algumas marcas epigenéticas são resistentes à reprogramação germinal. Caracteres fenotípicos (incluindo os moleculares) podem ser gerados por estímulos ambientais e transmitidos por herança epigenética (Mukherjee e Vilcinskas 2019). Os insetos são excelentes modelos de estudos de fenómenos epigenéticos pois possuem um curto ciclo de vida e podem ser mantidas grandes populações em um espaço reduzido no laboratório. Durken (1923a) revelou o primeiro epialelo identificado em *Pieris brassicae* induzido pela luz. A cada ano crescem de forma exponencial a evidência de características herdadas são influenciadas pelo *background* parental. Alguns exemplos de herança epigenética transgeracional de características adquiridas incluem diapausa prolongada em *Sarcophaga bullata* (Henrich e Denlinger 1982), fotoperíodo em *Acyrthosiphon pisum* (Le Trionnaire et al., 2009), resistência a inseticidas em *Aedes albopictus* (Oppold, Kreß, Bussche, et al., 2015), reprogramação transcricional em *H. armigera* (Capitulo 2, este estudo). O presente trabalho foi desenvolvido para estudar o papel da metilação do DNA na regulação de transcritos do sistema digestivo e na formação de epialelos em insetos de *H. armigera* expostos aos IPs.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Análise funcional da metilação do DNA em lihas CG de genes serino peptidase

O estudo da metilação do DNA em ilhas CG foi avaliado mediante o sequenciamento do DNA tratado com bissulfito de sódio e PCR (BSP, bisulfite sequencing PCR), usando um protocolo similar à metodologia descrita por Xu et al. (2018). A extração do DNA genômico e a análise de qualidade foi realizado como descrito no item 5.2.3. Para estudar o papel a metilação do DNA nas ilhas CG de genes de serino peptidases no desenvolvimento do inseto, usamos o tecido das pernas, cabeça e tórax de adultos de H. armigera. Os perfis de metilação foram comparados com os padrões de metilação do DNA das lagartas de H. armigera alimentadas com e sem IPs. As citosinas no metiladas de 1 µg de DNA foram convertidas em uracila usando o EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Os primers foram desenhados para amplificar ilhas CG usando o programa (https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) MethPrimer seguindo os parâmetros padrão do software Pick primers for bisulfite sequencing PCR (Li and Dahiya 2002). Três genes de serino peptidase responsivos aos IPs foram selecionados para a análise BSP usando primers degenerados. As reações de amplificação foram realizadas usando 5 ng de DNA tratado com bissulfito durante 40 ciclos (95 °C durante 30S, 72 °C durante 2 min). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2%. Finalmente, os produtos de PCR foram seguenciados para identificar as citosinas metiladas. A análise de metilação diferencial em dinucleotideos CG foi realizada usando o programa BISMA (http://services.ibc.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA/) (Rohde et al. 2010).

		pepildase
Gene		Primers usados na técnica BSP
LOC110384510	F	TTTTTAGGTTTAAAGATTAAATAATTATT
LOC110384510	R	CAAATAACTCACCAAAAATAACAAC
LOC110376134	F	TTTTTAATTTATATAATGGTGGTGGTG
LOC110376134	R	AATCATAAATAAACCTTTATCAATTCTC
LOC110378565	F	AAATTAGGGTTTTGAGTAGTTG
LOC110378565	R	TTAAAAAAAATCCAAAATATATAAC

Tabela 1. *Primers* para a análise de metilação do DNA de ilhas CG de genes de serino pertidase

5.2.2. Indução de desmetilação do DNA com 5-azacytidina

Inicialmente, foram incorporadas na dieta artificial doses crescentes de 5-azacitidina, entretanto não foi observada nenhuma resposta fenotípica (dados não apresentados). Existe a possibilidade de que o produto tenha sido degradado antes de que as larvas fossem expostas a uma dose prejudicial. As especificações do fabricante indicaram que a perda do produto pode alcançar valores de até 10% nas primeiras 2 horas a temperatura ambiente.

Resultados mais interessantes foram observados injetando a 5-azacitidina no segundo segmento dorsal com uma seringa fina tipo Hamilton, conforme proposto por (Baradaran et al. 2019). Lagartas de *H. armigera* foram alimentadas com dieta artificial até o começo do último instar. Injetamos duas vezes 5 µL de 5-azacitidina (40 mM) nas lagartas de sexto-instar de *H. armigera* com intervalos de 24h. As larvas do tratamento controle foram injetadas com água destilada. Um grupo de lagartas de cada tratamento (n = 50 para cada tratamento) foi criado para avaliar o efeito do inibidor de metilação de DNA no peso e mortalidade das pupas. Os intestinos larvais foram removidos de um segundo grupo 24h após a última injeção, e as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Foram realizadas quatro repetições biológicas para cada tratamento com cinco insetos por cada réplica biológica. A extração de RNA e a análise de expressão gênica de genes serino peptidase foram realizadas como descrito anteriormente. A expressão dos genes DNMT1 e DNMT2 foi realizada usando os *primers* reportados por Baradaran et al. (2019).

5.2.3. Caracterização do genoma completo da metilação do DNA

A caracterização completa do metiloma dos tratamentos propostos foi realizada em parceria com o Dr. Ben Hunt e o Dr. Chris Bass, do College of Life and Environmental Sciences, Biosciences, University of Exeter, Penryn Campus, Penryn, Cornwall, UK. A criação de gerações de insetos de H. armigera em dieta suplementada ou não com IPs foi realizada conforme descrito no Capítulo 3, item 3.3.1 - 3.2.3. O DNA genômico foi extraído de amostras de intestinos de lagartas da primeira geração (alimentadas ou não com dieta suplementada com inibidores) e das progênies das lagartas expostas aos IPs. Cada tratamento teve três replicatas experimentais para um total de nove unidades experimentais. Grupos de 10 intestinos de cada tratamento foram macerados em nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído usando o kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN). A preparação da biblioteca e o sequenciamento foram realizados pela empresa Novogene. Nesta empresa foi realizado também o tratamento com bissulfito. O controle de qualidade foi realizado usando o programa Trimmomatic V. 0.38, incluindo uma forte trimagem da região 5 dos reads pareados (--clip_R1 10 --clip R2 25) devido à preparação da biblioteca. Posteriormente, os reads foram alinhados de Н. referência da ao genoma armigera (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13316?genome_assembly_id=319039) usando 0 programa Bismark v0.22.1. Os arquivos de saída foram importados para o programa Methykit (1.8.1) na versão do R 3.5.2. Contextos CG diferencialmente metilados foram analisados em relação a uma distribuição binomial para identificar regiões com níveis de metilação significativos dos loci não metilados. Os loci restantes foram sujeitos a testes de pares entre grupos usando o teste de Fisher, corrigido para testes múltiplos com o método SLIM. Loci com uma diferença de metilação de pelo menos 25% e um q-ajustado por FDR 0.01, foram considerados diferencialmente metilados.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. O tratamento com a 5-azacytidina altera os padrões de expressão de genes de tripsinas e quimotripsinas do sistema digestivo de *H. armigera*

O tratamento com 5-azacitidine causou uma redução significativa (p<0.05) de 16,9% na biomassa de pupas da *H. armigera* (Figura 1). Enquanto a mortalidade aumentou em 16,7% nas lagartas tratadas com o inibidor de metilação do DNA em comparação com o controle (água destilada). Os biólogos evolutivos frequentemente usam análogos bioquímicos da citidina para estudar o papel da metilação do DNA em um amplo conjunto de características. Usualmente, os inibidores de metilação do DNA causam alterações na

expressão de genes em várias espécies de insetos, e em consequência, mudanças fenotípicas (Baradaran et al. 2019; Cook et al. 2019). Exemplos destes fenômenos estudados incluem o dimorfismo sexual e diapausa em *Nasonia vitripennis* (Cook et al. 2015, 2019; Pegoraro et al. 2016), o comportamento reprodutivo de *Bombus terrestris* (Amarasinghe, Clayton, e Mallon 2014), o sistema imune de *H. armigera* (Baradaran et al. 2019).



Figura 1. Influência do tratamento com 5-azacitidine em lagartas de *H. armigera* sobre o peso de pupas.

O inibidor de metilação do DNA silenciou parcialmente genes de tripsinas e quimotripsinas (Figura 2). Os resultados indicam uma possível relação (direta ou indireta) entre a metilação do DNA e a síntese de transcritos de genes de serino peptidases no sistema digestivo. As enzimas metiltransferase 2 foram mais afetadas pelo tratamento, provocando a ativação significativa dos genes DNMT2 quando as lagartas foram tratadas com azacitidine.



Figura 2. Log2 da expressão relativa de genes de serino peptidase usando RT-qPCR. Os valores de expressão gênica foram plotados como uma medida relativa do tratamento com 5azacytidine versus água destilada 24 h depois da última injeção. Os resultados foram normalizados usando genes RSP18 e RPL27. As barras de erro standard representam o erro padrão.

O composto 5-azacytidine foi sintetizado inicialmente por pesquisadores checoslovacos Piskala e Sorm (1964), usada posteriormente na Europa e Estados Unidos a finais da década dos 70s em estudos clínicos contra o câncer (Von, Slavnik, e Muggia 1976). Em células malignas, os genes envolvidos em importantes vias regulatórias como o reparo do DNA estão silenciadas transcricionalmente pela hipermetilação de ilhas CG de regiões regulatórias. A azacitidine é um agente hipometilante usado em terapias epigenéticas para a reativação transcricional no tratamento de doenças via apoptose. De forma similar, o efeito da 5-azacytidina poderia sugerir que existe uma relação ao menos indireta entre a metilação do DNA e a ativação de genes de serino peptidases no intestino da *H. armigera*, como foi demostrado por Baradaran et al. (2019); Jones et al. (2018). No entanto, a caracterização do metiloma completo não forneceu evidências suficientes para assegurar que genes

responsivos aos IPs possuem padrões específicos de metilação do DNA, ao menos nas regiões mais próximas.

Efeitos colaterais como a hipermetilação do DNA precisam ser considerados. Alguns estudos mostram que a exposição à azacitidine em insetos pode causar aumentos no conteúdo de citosinas metiladas em regiões, aparentemente de forma aleatória (Amarasinghe et al. 2014; Cook et al. 2019). Não podemos excluir a possibilidade de que o inibidor de metilação do DNA tenha causado mudanças diretas na maquinaria transcricional. Há evidência suficiente na literatura para pensar que as DNMTs estão envolvidas em um complexo circuito regulatório no interior do núcleo celular, devido à presença de domínios de ligação ao DNA e de interação proteína-proteína na região N terminal (Espada 2012; Schulz et al. 2018). De tal forma que a degradação das enzimas DNMTs poderiam silenciar os genes de serino peptidase ao reprimir diretamente a transcrição, independentemente do estado de metilação do DNA.

5.3.2. Genes serino peptidase são quase por completo hipometilados

A expressão diferencial de enzimas digestivas é o principal mecanismo de resposta aos IPs (Capítulo 2). Com a informação disponível, não foi possível identificar genes diferencialmente metilados de forma significativa, que tivessem funções proteolíticas. Curiosamente, genes que codificam enzimas serino peptidase são guase por completo hipometilados em qualquer tratamento (Figura 3A-C). Inclusive em tecidos do adulto, as ilhas CG parecem resistentes à metilação do DNA de tripsinas (Figura 3A-C). Por tanto, não identificamos uma relação direta entre a metilação do DNA e a expressão de genes de resistência aos IPs. Na verdade, como os genes que são altamente expressos no intestino foram desmetilados na região codante, é praticamente um enigma. Em insetos, abundante literatura mostra uma correlação positiva entre a metilação das sequencias codantes e o aumento da expressão gênica (Brevik et al. 2021; Glastad et al. 2019; Hunt et al. 2013; Jones et al. 2018) e no proceso de splicing alternativo (Flores, Wolschin, e Amdam 2013). Aparentemente, a plasticidade transcricional do sistema digestivo depende do cross-talking entre os mecanismos regulatórios. Recente literatura indica que a metilação do DNA em insetos está funcionalmente vinculada a outras marcas epigenéticas (Xu et al., 2021). Aqui identificamos pelo menos 32 genes diferencialmente metilados com funções regulatórias, muitos dos quais levantam questionamentos intrigantes.

Identical Identical <t< th=""><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th>1</th><th></th><th></th><th>1</th></t<>								1			1
Identicide Ref. Gene LOC LID394800 0				4	6	0	1	2	1	1 6	-
Interface Adulto Cabe;	Identidade		D-6 Care LOC110304490	-	0	0	0	0	-	0	0
Aduto Aduto			TTGTCCCTCCTTTTATTTAAGT-	-TTCCCTCTATTTTT-TTATTA	GGCCGGG-TTTTTTCGTTAT	TTTCCTTAGCGATAGGGT	CTTTCCCCCCCCTTTTTCTTCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTATCCTCCTT	ATTGTTGGTTCGTCGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATAG	TTGTTTTCC
Calego J			1	A-TTTAC	GGCNGG-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	TTTTCTTAGTGGATAGGGT	GTTTGTGGTGGTTTTTTTGTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATAG	TTGTTTTC
Adulo Tora 2	1	Caheca			GGTNGG-TTTNTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	COMPACE CONCEPTION OF THE CONTRACT OF THE CONCEPTION OF THE CONCEPTION OF THE CONTRACT OF THE CONTRACT.	ATAGCA CCCTTTTTATTNTCTT	ATTOTTCOTCOTTCATCOTCAT	TTACCTTACCACTTTATA	TTGTTTTC
Adulto Adulto Adulto Adulto Tors 1		cuscya	3		GGTNGG-TTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	STTTCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTATTGTTCTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTACCTTACCACTTTATAC	TTGTTTTC
Adulo Torax 2			1	A-TTTNG	GGCNNG-TTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	STTTCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTATTGTTCTT	ATTGTTGGTTGGTTGATGGTTGTA	TTACCTTACCACTTTATAC	TTGTTTTC
a	Adulto	Torax	?	AN-NNANGG	NNNNCA - TTTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	CTTTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATANGAGGGTTTTTATTGTTGTTG	ATTGTTGGTTGGTTGATGGTTGNA	TTACCTTANCACCTTATAC	TTGTTTTC
Parts			3	A-TTTTNG	GCNTGG-TTTTTTTCTTAT	TTTNGTTAGTGGATAGGGT	GTTTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGCACCCTTTTTATTCTTCTT	ATTGTTGGTTTGATGGTTGTA		TTGTTTTTC
Paiss 2			1	ATCT	AGCTGG-CTTTTT-CTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	GTTTCTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTTGATGGTTGTA		TTGTTTTG
A control of the second		Patas	2		GGTNGG-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	TTTTCTTACTCCATACCCT	GTTTCTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTTGATGGTTGTA	TTACCTTACCACTTTATAC	TTGTTTTC
Internet 1<		, atas	3	ATTT	AGCTGG-CTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	GTTTCTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTACCTTACCACTTTATA	TTGTTTTC
Intesting 2			1 """"""""""""""""""""""""""""""""""""		JGNTCGN-NTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	GTTTCCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGNNNNTATTCTTCTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATN	TTGTTTTC
Lagarda Intesting Adulto Ref. Gene LOC110384480 Control A Control A Control A Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control Control		Intectings	2NNTTTTAGGNTTANAGAT-	-TNANTNATTTNTNN-TNNTNN	INNNGGG-TNTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	GTTTCCCCCCCCTTTTTCCTTTNATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATAG	TTGTTTTG
Lagartas 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4		Controle	3 TTTTTTTAGGTTTAAAGATTAAAT	>	IGNTCGN-NTTTTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	CTTTCTCCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGNNNNTATTCTTCTT	ATTGTTGGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATN	TTGTTTTG
1 1 TTTTTAGGTTAAAGATAAAAT-AATTAATUTTTTTTTTTT	Lagartas	controle	4		GAG-NTTNTTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	CTTTCTCCCCCCCTTTTTTCCTTTNATA	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGTTTTATAG	TTGTTTTG
Intesting 2 TITTITAGGTTTAAGATATATATTATTNTTNTCh-CNNAAGGNTGG-TITNTTOTTATTDTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Labartas		1 ጥጥጥጥጥጥລດແຕກຫາລລລແລກຫລລລກ		IGGTNNGNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	TTTTCTTACTCCATACCCT	CTTTCTCCCTCCTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATAGGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	ATTGTTGGTTGGTTGATGGTTGTA	TTAGGTTAGGAGNTTTATAG	TTGTTTTG
iPs 3 2 2 2 2 2 3 3 3 identidade 2 2 2 2 2 3 3 3 3 identidade Ref. Gene LOC110384480 0		Intestinos	2 ΨΨΨΨΨΨΑGGΨΨΨΑΑΑGΑΨΨΑΑΑΨΑ	ATTTATTNTTNTCN-CNNCAG	GNTTGG-TTNTTCTTAT	TTTTCTTACTCCATACCCT	STTTCCCCCCCTTTTTCCTTTAATA	ATAGGAGGGTTTTTATTGTTGTT	ATTGTTGGTTGATGGTTGTA	TTACCTTACCACTTTATAC	TTGTTCTTC
2 2 2 2 2 3 3 3 Identidade Ref. Gene LOC110384480 0 0 2 4 6 8 0 2 4 COTTAGTOCOTTIGTT		IPs	3		CN	TTTTCTTACTCCATACCCT	CTTTCCCTCCTTTTTTCTTTAATA	ATAGCACCCTTTTTATTCTTCTT	ATTGTTGCTTCATGCTTCTA	TTACCTTACCACNTTATA	TTCTTTTC
1 2 2 2 2 3 3 3 1 0 2 4 6 8 0 2 4 0 <th></th>											
Identidade 0 2 4 6 8 0 2 4 Identidade 0				2	2	2	2	2	3	3	3
Identidate Ref. Gene LOCI:0384480 0 <t< th=""><th></th><th></th><th></th><th>0</th><th>2</th><th>4</th><th>6</th><th>8</th><th>0</th><th>2</th><th>4</th></t<>				0	2	4	6	8	0	2	4
Adulto	Identid	ade	Ref. Gene LOC110384480	0	0	0	0	0	0	0	0
1 TGGTTTAGTGCGTTTGTT			CGGTTTAGTGCGTTTGTTT	AGCGGTGGTATTAG-ATT	GAATATCGTTAGCGTGGTTA	ATGTA <mark>CG</mark> -G-T-AGTT-GGA	AATTTTAATTTTATTCGTAACG	ATAT <mark>CG</mark> T-TATAATTAATTTGTTI	TTTAACGTTGTTATTTTTGGTA	ATAT <mark>CG</mark> TTTTTATTGTTTTG	TTTTTTG
Kabesa 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTAGTGGTGGTATTAG-ATTGAATATTGTTGGGTGGG			1 TGGTTTAGTGCGTTTGTTT	ANTGGTGGTATTACCATT	NAATATTGTTAGTGTGGTCC	CTCCACG-G-N-CGCC-CNA	ACCTCNATCTTATTTGNCATG-	ATATCCC-NCCNATTAATTTGNT	TTTNNTGTCNTTATTTCTGNNN	AAATATTTG	
Adulto 3 TGETTTAGEGEGETTTGTTAFGGEGEGTATTAG-ATTGAATATTGTTNGFOGGEGTATCGA-T-AGCT-GGAATTTTAATTTTATTTGTAATG-ATATTGT-TATNAANAANTTC	1	Cabeça	2 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT	GAATATTGTTTGCGTGGTTA						
Adulto 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTAGTGGTGATTAG-ATTNAATATTGTTAGTGTGGTTGTGTATG-G-T-AGCG-GAATCTCAATTTTATTGTNATGATTGGT-ATATTGTTTTTTTAATGTCGTTATTGGTGGTATTAG-ATTNAATATTGTTGTTGTTTTTTAATGTCGTTATTGGTGGTATTAG-ATTNAATATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTNATTAGTTGTTGTTTTTTTAAGTGCGTAATTAGGTGGTATTAG-ATTNAATATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTAGTGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGTGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTAGTGGGTATTAG-ATTNAATTGTTGTGGGTATTAGAGTAGTAGGTGGTAGGAGGGTAGGGTAGGGTAGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGAGGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGTAGGGGTAGGGTAGGGAGGGGTAGGGAGGGGTAGGGAGGGGTAGGGAGGGGTAGGGAGGGGTAGGGAGGGGGTAGGGAGGGGGG						ACGTATGCG-T-AGCTNGGA	AATCTCTACATTCTNTTTGTACCN-	G-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC	CTTA		
Adulto Torax 2 TGETTTAGEGETGTTGTTAGTGGEGETATTAG-ATTAATTGTTGTGTGGGGTATTAG-ATTACCC-CCCATCONNTTTACCCACA-ATTGC-TATACTTGTTCTTCTTGTGTGTGTGTTTTTCGGGGGTATTAG-ATTAATTGTTGTGTGTGTGTGTGTTTTTCGGGGGGTATTAG-ATTAATTGTGTGGGGGTATTAG-ATTACTGGGGGTATTAGG-G-N-ACCC-CCCAATCONNTTTTATTGGCACG-ATACTCG-TATACTGTGTTTTTGGTGTGTTTTTTGGGGGGGGGG			3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT	GAATATTGTTNGTGTGGTTA	ACGTATGCG-T-AGCTNGGA ATGTATG-G-T-AGTT-GGA	ATCTCTACATTCTNTTTGTACCN-	G-ACCNT-CNTNATCCCCCCCAACC ATATTGT-TATNAANAANTTC	CTTA		
3 TGTTTAGTGNOTTGTTAGTGGGGTATTAG-ATTNAATATTGTTAGGTGGGTATGGAC-GN-ANCC-CNAACCTNUATTTTATTCNCAATG-ATATTGT-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Adulto		3 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTC	ACGTATGCG-T-AGCTNGGA ATGTATG-G-T-AGTT-GGA CTGTATG-G-T-AGCT-GGA	AATCTCTACATTCTNTTTGTACCN- AATTTTAATTTTATTTGTAATG AATCTCAATTTTATTTGTNATG	G-A <mark>C</mark> CNT-CNTNATCCCCCCAACC ATATTGT-TATNAANAANTTC ATATTGT-TATNATTAATTTGTTT	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG	ANATATTTG	
Interime 1 TCOTTIANTGCOTTGTTACTCGGGGTATTAGCATTAATTOTTACCOTCONNCCTCGACGC-N-N-CNCC-CNAACCNCNANCTTATTAAACCTG-ANACCCN-CONNAAAAATTTTAACTTGA- Patas 2 TCGTTAATCGTTGTTACTCGGGGTATTAG-ATTGATATTCTTAGTTGTGGGTATGGAG-G-N-CNCC-CCNAACCATTTAATTTAATTTGAATTGAATTGAATTGAATT		Torax	3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAC-ATT	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTC GAATATTGTTACNGTGGCTA	ACGTATGCG-T-AGCTNGGA ATGTATG-G-T-AGTT-GGA CTGTATG-G-T-AGCT-GGA ATCCATG-G-T-ACCC-CCC	AATCTCTACATTCTNTTTGTACCN- AATTTTAATTTTATTTGTAATG AATCTCAATTTTATTTGTNATG CATTCNNTTTTACCCACA-TG	G-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC ATATTGT-TATNAANAANTTC ATATTGT-TATNATTAATTTGTTI ATATCCT-CCTAATTAATTTGTTC	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCATGTTCTTATTTCTGGTG	ANATATTTG	
Pata 2 TGGTTTAGTGTGTTGTTTAGTGGGGTATTAG-ATGAATATTGTTGGGTGGTATGAG-G-T-AGTT-GGAATTTAATTTTATTGTAATGG-ATATTGT-ATTATTGTAATTGTTAA		Torax	3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 3 TGNTTTAGTGNGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAC-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT	CAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTC GAATATTGTTACNGTGGCTA NAATATTGTTAGTGTGGNTA	ACCTATCCG-T-AGCTNGGA ATGTATG-G-T-AGTT-GGA CTGTATG-G-T-AGCT-GGA ATCCATG-G-T-ACCC-CCC ATGCATG-G-N-ANCC-CNA	AATCTCTACHTUTNTTTGTACCN- LATTTTAATTTTATTGTAATG- JATCTCAATTTTATTTGTNATG- JATTCNNTTTTATCCACA-TG- LACTTNATTTTATTTGNCATG-	G-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC ATATTGT-TATNAANAANTTC ATATTGT-TATNATTAATTTGTT ATATCGT-CCTAATTAATTGGTT ATATTGT-TATGATTAATTTGNTI	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCATGTTCTTATTTCTGGTG TTTNNTGTCGTTATTCCTGNNG	ANATATTTG AGTTA <mark>CT</mark> TGATC AAATATTTG	
Intestinos 3 TGGTTTAGTGGTGTTGTTAGTGGGGGTATTAG-ATTAATTGTTAGTGGGTTAGGATG-GT-AGTCGG-AACTCCTATTTATTAACAGC-ATAACCCACCCTAAAAAATTTTGTTTTTTTTTGTTTTG		Torax	3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 3 TGNTTAGTGNGTTGTTT 1 TGCTTTANTGCGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAC-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT ACTGGTGGTATTACCATT	GAATATTCTTNGTCTGGTTA NAATATTCTTAGTGTGGGTTC GAATATTCTTACNGTGGCTA NAATATTCTTAGTGTGGONTA NAATATTCTTACCGTGNNCC	ACGTATCCG-T-AGCTNCGA ATGTATC-G-T-AGCT-GGA CTGTATC-G-T-AGCT-GGA ATCCATG-G-T-AGCC-CCC ATGCATG-G-N-ANCC-CNA CTGCACG-N-N-CNCC-CNA	AATCTOTACATTCTNTTTGTACCA- AATTTTAATTTTATTGTAATG- AATCTCAATTTTATTGTNATG- JATCCNATTTTACCCACA-TG- AACTTTNATTTTATTTGNCATG- AACCNCNANCTTATTTAACATG-	S-ACCNT-CNTNATCCCCCCAAC ATATTGT-TATNANAANTTC ATATTGT-TATNATTAATTTGTT ATATCCT-CCTAATTAATTTGTT ATATCCT-TATCATTAATTTGNT ANACCCN-CCNAAAAAATTTNNNI ANACCCN-CCNAAAAAATTTNNNI	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCATGTTCTTATTTCTGGTG TTTNNTGTCGTTATTCCTGNG TATTTAGTCTTTAAACCTAAAA	ANATATTTG	
Lagartas 1 TGGTTAGTGTGTTGTTGTTAGTGGTGGTATTAG-ATTGATATTGTTANTGTGANTANNANN-NNG-ANNN GGANNNTAANNNANCCGA-CGTNNATATAACNTTTGCAGACCTTAACCGTGGAAAAANCGTTT		Torax Patas	3 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTT 2 TGGTTTAGTGTGTGTTGTT 3 TGNTTTAGTGTGTTGTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAC-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAGCATT AGTGGTGGTATTAG-ATT	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGGTTG GAATATTGTTAGNGTGGGTA NAATATTGTTAGTGTGGTA NAATATTGTTACGTGNCC GAATATTGTTNGTGTGGTTA	AGTATCG-T-AGTNGGA TGTATC-G-T-AGTT-GGA TGTATC-G-T-AGCT-GGA ATCCATC-G-T-ACCC-CCC ATCCATC-G-T-ACCC-CCN TGCACCG-N-N-CNCC-CNN ATGTATC-G-T-AGTT-GGA	AATOTOACATOTNITTOTACCA AATOTOAA - TITTATTTGTAATG- AATOTOAA - TITTATTTGTAATG- JATCONN TITTACCCACA - TG- AACOTONA - TITTATTTCAACATG- AACOTOAN - NOTTATTTAACATG- AATTTTAA - TITTATTTGTAACG-	G-ACONT-ONTNAROCCCCCABC ATATTGT-TATNARANANTTG RATTGT-TATNATTARTTGTT ATATGCT-CCTARTTARTTGTT ATATGCT-ATCARTARTTGTT ANACCON-CCNARARARTTTNNN RATTGT-TATNATARARTTGTA-	CTTA- TTTAATGTCCTTATTTCTGGTG TTTCATGTCTTATTTCTGGTG TTTNNTGTCCTTATTCCTGNNG TATTTAGTCTTTAAACCTAAA	ANATATTTG	
Intestino 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTAGTGGTGGTATTAG-ATTGAATATTGTTTGCGTGGTTACGTATCGG-T-AGCTNGGAATCTCTACATTCTNTTGTACCN-G-ACCNT-CNTNATCCCCCCCAACCCTTA		Torax Patas	3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGGTGTGTTT 2 TGGTTAGTGTGTGTTGTT 3 TGGTTTANTGTGTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTT GAATATTGTTACNGTGGTT NAATATTGTTACGTGGTA NAATATTGTTACCGTGNNC GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTA	AUGTATGCO-T-AGCTNGGA ATGTATG-G-T-AGCT-GGA ATGCATG-G-T-ACCC-GGA ATGCATG-G-N-ANCC-CNA DTGCATG-G-N-ANCC-CNA DTGCATG-G-T-AGCT-GGA ATGCATG-G-N-CNCC-CTA	AATOTOACATTONITTOTACCA- AATOTOAA-TTTAATTOTAATG- AATOTOAA-TTTTAATTOTAATG- SATTON-TTTTAACCACA-TG- AACOTONA-TTTTAACACATG- AACOTONA-TOTTAATTAACATG- AACTOTAA-TTTTAATTGTAATG- AACTOTAA-TTTTAATTTAACATG-	G-ACONT-CNTNARCCCCCCAAC ATATTGT-TATNAANAANTTG ATATTGT-TATNATAATTTGTT ATATCCT-CCTAATTAATTTGTT ATATCCT-TATGATTAATTTGTT ANACCCN-CCNARAAAATTTNNNT ANATCCT-CTARNARAAATTTGNTT	CTTA	ANATATTTGAATATTTG	
Lagartas Controle 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTTGTTTGTTTGTTGGTGGGTATTAG-ATTGAATATTGTTAGTGGGGTATGG-G-TGAGTT-GGAATTTTAATTTTATTGTAATG-ATA- Lagartas 4 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTAGTGGTGGTATTAG-ATTGAATATTGTTGGGTGGG		Torax Patas	3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGCTTTAGTGCTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ANTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTACNGTGTT GAATATTGTTACNGTGGTT NAATATTGTTACTGTGGTTA NAATATTGTTACCGTGNNC GAATATTGTTACTGTGTTA NAATATTGTTAGTCTGGTTA	AGTATGG-T-AGTT-GGZ ATGTATG-G-T-AGCT-GGZ ATGCATG-G-T-ACCC-CGZ ATGCATG-G-N-ANCC-CNZ ATGCATG-G-N-ANCT-CNZ ATGCATG-G-T-AGTT-GGZ ATGCATG-G-N-CNCC-CTZ ANNNANN-NNC-ANNN-GGZ	AATCTCAA-TTNITTGTARCO- AATCTCAA-TTTATTGTARTG- AATCTCAA-TTTTATTGTNATG- JATTCNN-TTTTATTGCARG- JACTTNA-TTTTATTGCARG- AACCNCNA-NCTTATTTAACATG- AACCNCNA-NCTTATTTAACATG- AACTTCAA-TNTNTATTGTAATG- AACTTCAA-NNNNATAN-	3-ACONT-CNTNATCCCCCCAACC ATATTCT-TATNAANAANTTC ATATTCT-TATNAATANTTGTT ATATCCT-CCTAATTAATTTGTT ATATTCT-TATGATTAATTTGTT ATATTCT-CTAGATAAATTTINNI ATATTCT-CATAAAAATTTGNT ATAACCCACCTAAAAAATTTGTT ATAACCCA-CCTNNAATATTAACN	CTTA	ANATATTTG- AGTTAGTGATG- AAATATTTG- AAATATTTG- AAATATTTG- AAANCTTT-	
Lagartas 4 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTAGTGGTGGTATTAG-ATTGAATATTGTTTGGGTGGG		Torax Patas	3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAG-ATT AGTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTOTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTACGTGGGTT NAATATTGTTACGGGCTN NAATATTGTTACGGGCNNC GAATATTGTTACGGGTNN NAATATTGTTACGGGTN NAATATTGTTACGGGTN NAATATTGTTACGGGTN	AGGTATGG-T-AGGTNGJ ATGTATG-G-T-AGCT-GGJ ATGCATG-G-T-ACCC-CC ATGCATG-G-N-ANCCC-CN ATGCATG-G-N-CNCCC-CN ATGTATG-G-T-AGTT-GGJ ATGCATG-G-N-CNCC-CTP ANNNANN-NNC-ANNN-GN	AATCTAAATTTNITTTTAAACA- MATCTCAATTTTATTTGTAATG- MATCTCAATTTTATTTGTNATG- JATCTCNNTTTTACCCACA-TG- MACTTNATTTTATTTGNCATG- MACTTTAANCTTATTTAACATG- MACTTCTATTTTATTTAACATG- MACTTCTA-TTTTATTTAACATG- MNNNTAA-NNNNANNN- MATCTCTACATTCTNATTTOTACCN-	G-ACONT-CNTNARCCCCCCCAACC ATATTCT-TATNARNARTTC TATTCT-TATNATTAATTTCTT ATATTCT-CCTATRATTTGTT ATATTCT-TATGATTAATTTGTT ATATTCT-TATGATTAATTTGTT ANACCCA-CCNARAARATTTGTA- ATATTCT-TATNATAAAATTTGTA- ATACCCACCTAAAAAATTTGTT- ANACCCA-CCTNNARTATAACN G-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC	CTTA	ANATATTTG	
1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTAGTGGTGGTATTAN-ATTGAATATTGTTANTGTGGNTATNNATG-G-T-ANNN-NNNAATG-ATATNNT-NNTAATTAATTTGTCTTCATGTCTTATTTCGGTGGGTAGGTA		Torax Patas Intestinos Controle	3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGGTGTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ARTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTGTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGGTT NAATATTGTTAGTGTGGTTN NAATATTGTTAGTGTGGTTA GAATATTGTTAGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTA GAATATTGTTAGTGGTGGTTA	AGTATGG-T-AGTNGA TGCATG-G-T-AGCT-GG ATCCATG-G-T-ACCC-CC ATCCATG-G-N-ANCC-CN TGCAGG-N-N-CONCC-CN ATGTATG-G-N-CNCC-CT ANNNANN-NNC-ANNN-GG AGGTATGG-G-T-AGCTNGG AGGTATGG-G-TCAGTT-GG	AATCICACATTONITTOTATCO- AATCICAATTTATTTOTATCO- AATCICAATTTATTTONATCO- SATTONNTTTATTONATCO- SATTONNTTTATTONCATCO- AACCICIATTTATTTAACATCO- AACTCIAA-TTTTATTAACATCO- NNNNTAANNNNANTNNAANN- AATCICACATTCINTTTOTACCO- AATTTTAA-TTTTATTTOTACCO-	3-ACONT-CNTNATCCCCCCAACC TATTCT-TATNAANAANTTC ATATTCT-TATNAATANTTGTT ATATTCT-TATNATTAATTTGTT ATATTCT-TATCATTAATTTCTTT ANACCCN-CCNAAAAAATTTINNI ATATCCT-TATNATAAATTTTGT- ANACCCCCTAAAAAATTTCTTT ANACCCCC-CCTNNNATATTAACN 3-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC 3-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCATGTCTTATTTCTGGTG TTTNNTGTCGTTATTCCTGNNG TATTTAGTCTTTAAACCTAAAA TTTTTTGTCTTTAAACCTAAAA TTTTCCAACCTTTAACCTCAAA CTTA	ANATATTTG	
Intestings 2 TECTTTAGTCCCTTTGTTTAGTCGTGGTATTAG-ATTGAATATTCTTNGCCTGGTTACC-G-T-AGTN-GGNATNTTACNTNNATTTCTACCNNACNTCCC-CACNCCNACNTTTC	Lagartas	Torax Patas Intestinos Controle	3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGNGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGGTGTTGTTT 2 TGGTTTANTGGGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ARTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTGTTAGTGGTGGTTA NAATATTGTTACNGTGGTC GAATATTGTTACNGTGGCTA NAATATTGTTACCGGNTA NAATATTGTTACCCTGNNC GAATATTGTTACCGTGTTA NAATATTGTTAGTGGGTTA GAATATTGTTGCGTGGTTA GAATATTGTTNGTGTGGTTA	AGTATGG-T-AGTNGA TAGTATG-G-T-AGCT-GG TGTATG-G-T-ACCC-CG TGCATG-G-T-ACCC-CC TGCACG-N-ANCCC-CN TGCATG-G-N-ANCCC-CN ATGTATG-G-T-AGTT-GG AGGTATGCG-T-AGCTNGG ATGTATG-G-TCAGTT-GG AGGTATGCG-T-AGCTNGG	AATCTACATCUTNITTGTATC- AATCTCAA-TTTATTGTATC- AATCTCAA-TTTATTGTATC- AATCTCAA-TTTATTGTATG- AACCNCNA-TTTTATTGAACA- AACCNCNA-NCTTATTTAACATG- AACCNCNA-NCTTATTTAACATG- AACTCTAA-TTTTATTTAACATG- AANNNTAA-NNNNTNNAANN- AATCCTACATTCTNTTGTAACCA- AATCTTAACATTCTNATTGTAACG- AATCTTAACATTCTNATTGTAACG-	3-АССИТ-СИТИАТССССССАЗС АТАТТСТ-ТАТИЛАЛАЛИТТС АТАТТСТ-ТАТИЛАЛАЛИТТСТТ АТАТТССТ-ССТААТТААТТТСТТ АТАТТССТ-ССТААТТААТТТСТТ АТАТТССТ-ТАТИАТТАААТТТИИИ АТАТТССТ-СИЛАЛАААТТТИИИ АТАТССССССТААЛАААТТТСЯТ АЛАСССА-ССТИИИАТАТТААСИ 3-АССИТ-СИИИАТССССССААСС АТА	CTTA	ANATATTTG- AGTTACTTGATC AAATATTTG AAATATTTG	
	Lagartas	Torax Patas Intestinos Controle	3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTAGTGTGTTTGTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTT 3 TGGTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTAGTGTGTTGTTGTT 1 TGGTTAGTGTGTTTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG	AGTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTOTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTACGTGGGTT NAATATTGTTACGGGCTN NAATATTGTTACGGGCNNC GAATATTGTTACGGGTNN NAATATTGTTACGGGTN NAATATTGTTACGGGTTA GAATATTGTTACGGGTTA GAATATTGTTACGGGTTA GAATATTGTTACGGGTTA GAATATTGTTACGGGTTA	AGTATGG-T-AGTINGJ ATGTATG-G-T-AGCT-GGJ ATGCATG-G-T-ACCC-CC ATGCATG-G-N-ANCC-CNP ATGCATG-G-N-ANCC-CNP ATGCATG-G-N-N-CNCC-CNP ATGCATG-G-T-AGTT-GGJ AGGTATGCG-T-AGCTNGGJ ATGTATG-G-TCAGTT-GGJ AGGTATGCG-T-AGCTNGGJ ATGTATG-G-T-AGCTNGGJ ATMNATG-G-T-ANNN-NNN	AATCTCAA-TTTNTTTTGAATC- AATCTCAA-TTTTATTGTAATG- AATCTCAA-TTTTATTGTAATG- AATCTCNN-TTTTATTGCAAG- AACTTNA-TTTTATTGCAATG- AACTTCNA-NOTTATTTAACATG- AACTTCTA-TTTTATTGCAATG- AACTTCTA-TTTTATTGCAATG- AACTTCTA-TTTTATTGTACATG- AATCTCTACATTCTNATTGTACCN- AATCTCTACATTCTNTTGTACCN- AATCTCTACATTCTNTTGTACCN- AATCTCTACATTCTNTTGTA	3-ACONT-CNTNARCCCCCCCAACC ATATTCT-TATNAANAANTTC ATATTCT-TATNATTAATTTCTT ATATTCCT-CCTAATTTAATTTCTT ATATTCT-TATNATAATTTGTT ATATTCT-CANAAAAATTTINNI ATATTCT-CANAAAAATTTINNI ATATTCCTCTATNATAAAATTTTCNT ANACCCA-CCTNNANATTTAACIN 3-ACCNT-CNTNATCCCCCCAACC ATA	CTTA- TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCANGTCGTTATTTCTGGTG TATTTAGTCTTTAATCCTGNG TATTTGTCTTTAAACCTAAAA TTTTTGTCTTTAATCTTGAAA CTTA- TTTCCAACCTTTAACCCTCAAA	ANATATTTG	
IPS 3 TGGTTTAGTGTGTGTTTGTTTAGTGGTGGTATTAN-ATTGAATATTGGTGGGTATGTATG-G-T-AGTT-GGAATTTTAATTTTATTTGTAATG-ATATTGT-TATNAT	Lagartas	Torax Patas Intestinos Controle Intestinos	3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTT 3 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTT 2 TGGTTTAGTGTGTTGTTTGTTTGTTC 3 TGGTTTAGTGTGTTTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTGTTTGTTT 1 TGGTTTAGTGTGTTTGTTT	AGTGGTGGTATTAG-ATT ARTGGTGGTATTAG-ATT 	GAATATTOTTNGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGGTT NAATATTGTTAGTGTGGTTN NAATATTGTTAGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTA NAATATTGTTAGTGTGGTTA GAATATTGTTAGTGTGGTTA GAATATTGTTAGCTGGTTA GAATATTGTTGCTGGTTA GAATATTGTTAGTGGGTTA	AGTATCG-T-AGTNGA TTGTATG-G-T-AGCT-GG ATCCATG-G-T-ACCC-CG ATCCATG-G-N-ANCC-CN ATGTATG-G-N-ANCC-CN ATGTATG-G-N-CNCC-CN ATGTATG-G-N-CNCC-CT ANNNANN-NNC-ANNN-GG AGGTATCG-T-AGCTNGG AGGTATCG-T-AGCTNGG ATNNATG-G-T-AGCTNGN	AATOTOACATICNITTUTACUA IATUTOAA-TTTATTUGNAUG- JATCONA-TTTATTUGNAUG- JATCONNTTTATTUGNAUG- JACOTNA-TTTATTOCACA-UG- IACOTNA-TTTATTACCACAUG- AACTOTA-TTTTATTAACAUG- JACTOTA-TTTTATTAACAUG- JACTOCA-TTTTATTAACAUG- JACTOCACATTCNNTNNAANN- AATOTCACATTCNNTNUNAANN- JATCTCACATTCNNTTUGTACCN- JATUTTAA-TTTTANNNNAAUG- JATNTAA-TTTANNNNAAG-	3-ACONT-ONTNATCCCCCCAACO TATTCCT-TATNAANAANTTC ATATTCT-TATNAANAANTTCTTT ATATTCT-TATNATTAATTTGTT ANACCCN-CCNAAAAAATTTCTTT ANACCCCN-CCNAAAAAATTTOTA- ATAACCCACCTAAAAATTTCTTT ANACCCCA-CCTNANAATTAACN G-ACCNT-ONTNATATAACN G-ACCNT-ONTNATTAATTGTC ATATNNT-NNTAATTAATTTGTTC	CTTA TTTAATGTCGTTATTTCTGGTG TTTCATGTTCTTATTCTGGTG TATTTAGTCTTTAATCCTGGTG TATTTAGTCTTTAAACCTAAAA TTTTTTTCCAACCTTAATCTTGAAA TTTCCAACCTTTAATCTTGAAA CTTA	ANATATTTG	

Figura 3A. Resultados da análise BSP (*Bissulfite Sequence PCR*) para o gene de tripsina LOC110384480. As amostras do tecido foram obtidas do sistema digestivo de lagartas de *H. armigera* alimentadas com dieta suplementada com e sem IPs (A) e tecidos da cabeça, patas e o tórax (A, B, C). As ilhas CG são quase por completo hipometiladas na região codante tanto no sistema digestivo como em tecidos do adulto.
				1	2	2	2	2	2	3
Identic	lade			8	0	2	4	6	8	0
		Ref. Gene LOC110376134		0	0	0	0	0	0	0
		ATTTTTAGAG <mark>CG</mark> GCGGTGC	GATTTTTTTAGTAGTI	IGTAGTA <mark>CG</mark> TTG	ATATTAATTTTATTAATTAGG	AGTTTTGTGTTGAG <mark>CG</mark> TTA <mark>CG</mark>	TTTTTTTGAAGATTTAGTTT	GGTTATTAGAATTGGTT <mark>CG</mark> A	TATTATCGATAATATGTTG	TG <mark>CG</mark> TTGGTAT
		1 ATCTG-AGTATGATGGATT	FAGTATTTAATTAGTT	ITATGTA <mark>TG</mark> TTG	ATATTAATGTTATTAATTAAN.	AATTGTGTGTTGAG <mark>TG</mark> TTA <mark>TG</mark>	TTTNTTTGAAGATGTAGTTA	AGGTNTGAAAATTGGTT <mark>TG</mark> A	TATTATTGATGATATATGATG	TG <mark>TG</mark> TTGGTAT
	Cabaaa	2 GTATTTANNATGATGGANT	TAATATTTAATTATT	INATGAN <mark>TG</mark> TTG	ATATTATTGTTATTATTTAAT	AATTGNGNGNTGANGGGTN <mark>TG</mark>	NTGATTTGATGATGTNGTTA	TGGNNTNAAAATAGGTNNGA	TGTTAT <mark>TG</mark> ATNATATGATG	AGNGGTGGTGT
	Cabeça	3 CACGAGTATGATGGAT	TAGTATTTAATTAGTT	TTATGTA <mark>TG</mark> TTG	ATATTAATGTTATTAATTAAN	AATTGTGTGTTGAG <mark>TG</mark> TTA <mark>TG</mark>	TTTATTTGAAGATGTAGTTA	AGGTATGAAAATTGGTT <mark>TG</mark> A	TATTATTGATGATAANATGATG	TG <mark>TG</mark> TTGGTAT
Adulto		4 ATTTTTAGTATGATGGAT	TAGTATTTAATTAGTT	TATGTA <mark>TG</mark> TTG	ATATTAATGTTATTAATTAAT	AATTGTGTGTTGAG <mark>TG</mark> TTA <mark>TG</mark>	TTTATTTGAAGATGTAGTTA	TGGTATGAAAATTGGTT <mark>TG</mark> A	TATTATTGATGATATATGATG	TG <mark>TG</mark> TTGGTAT
Addito		1 ATTTTTNGTNTGATGGATT	FAGTATTTAATTAGTT	TATGTANGNGG	ATATTAANGTTATTAATTAAT	AATTG <mark>C</mark> GTGNTGAG <mark>CG</mark> TTA <mark>TG</mark>	TTTATTTGAAGANGTAG C TA	TGGTATGAAAANTGGTTTG	NNTTAT TG ATAATANGANGI	NGNGTTGGTAT
	_	2 ATTTTTAGTATGATGGATT	TAGTATTTAATTAGTT	TANGTANGNNG	ATATTAANGTTATTAATTAAT	AATTGNGTGTTGAGTGTTATG	TTTATTGAAGANGTAGTTA	NGGTATGAAAANTGGTTT	TNTTATTGATAATANGANG	NGNGTTGGTAT
	Torax	3 ATTTTTCGTNTGACGGCT1	CGTATTTAATTAGTT	TATGTATGTAG	ΑΤΑΤΤΑΑΤGTTΑΤΤΑΑΤΤΑΑΤ	AATTGTGTGTTGAGTGTTATG	TTTTTTTGAAGACGTAGTTT	TGGTATGAAAATTGGTTTG	TATTATTGATATATGATG	TGTGTTGGTAT
		4 ATTTTTNGTNTGATGGAT	TNGTATTTATTAGTT	TTATGTANGTTG	ΔΤΑΤΤΑΑΝΩΤΤΑΤΤΑΑΤΑΑ	AANTGNGNGNTGAGTGTTATG	TTTTTTTGAAGACGTAGTTA	AGGTTTGAAAANTGGTTTG	TATTATTGATGATATGANG	NGNGNTGGTNT
			2	2		2	2	1	1	
Identic	lade		2	1		5	0	- -	2	
		D -6 Come LOC110276124	2	-		0	0	ŏ	2	
		Ref. Gene LOC110376134								
			AGGACGITIGITAGGG	MCAUTIC	GCGGI		AAIAIIAICGIIGGIGIIGI			CCENTRACC
			AGGAIGITIGITIGGG		GG16G1		CNC2TC CTCCC22	TTTTTNGNGANTIGAGIGIG	CARATITITITICATION	SGINACIGGAG
	Cabeça	2 TTTTGAANGTTGGNGGGNA	AGGAGGNTNGTTTGTT	TIGATITI	Gerren		GNGATGGTGGGAATTAT	TTTTTGGGGTTTTGGGGGGGG	GAAATTTTTTTTTTTTTT	LUL-GUUNGGG
		3 TITTGAATGTTGGTGGTAA	AGGATGTTTGTTTGGG	SNGATTTT	Generation of the second secon		AATGTGATTGTAGGAATTA-		TTTTAGANTG	
Adulto		4 TTTTGAATGTTGGTGGTAA	AGGATGTTTGTTTGGG	STGATTTT	GGTGGT	Г———ТТТТТТТТТТТАNAA———N.	AANGNGNTTGNNGGAATTNT	TTTTTGGGGGATTTGNGGGGG	NCCATTTTTTTTTATTTT	GG-GTTNGGG
		1 TTTTGAANGTTGGNGGNAA	AGGA <mark>CG</mark> TTTGTTTGGG	GCGATTTC	AATTGAA	AAAATTTGG C GGNTTTTT	TTTGGTTTTTATAATAATGT	GATGTAGGAATTATTTTTT	TTGANAANGGTTTATTT2	AGATAAANG
	Torax	2 TTTTGAACGTTGGNGGTAA	AGGANGTTTGTTTGGG	GATTTC	AATTGAAAAAA	rttgg <mark>Cg</mark> gnttttttt-t	GGTTTTTTATAATAATGTGAT	GTAGGAATATTTTTGGGANA	ANGGTTTATTATGATA/	AAA-GGTGA C T
		3 TTTTGAATGT <mark>TG</mark> GNGGTAA	AGGANGTTTNTTTGGG	GNGNTTT C AATT	GAAAAATT TG GCGGNTT	TTTTT TG GTTTTTATAAT.	AATGTGAT TG TAGGAATTAT	TTTTTGGGGGATTTGAGTGTG	TAGATTTTTTTTTTATTTT(GGT-GTTAG <mark>TG</mark>

Figura 3B. Resultados da análise BSP (*Bissulfite Sequence PCR*) para o gene de tripsina LOC110376134. As amostras do tecido foram obtidas do sistema digestivo de lagartas de *H. armigera* alimentadas com dieta suplementada com e sem IPs (A) e tecidos da cabeça, patas e o tórax (A, B, C). As ilhas CG são quase por completo hipometiladas na região codante tanto no sistema digestivo como em tecidos do adulto.

							1	1	1
Identid	ada		2	4	6	8	0	2	4
racina	uue	Ref. Gene LOC110378559	0	0	0	0	0	0	0
		TTAAATTAGGGTTTTGAG	TAGTTG <mark>CG</mark> TTA <mark>C</mark>	GTTTAGTTGGTTATTATAAAT'	TAGAATATTTGTAGAAAT	AATTATGTTATTCGTTTTATTG-	-T-GATTAACG-AGAATATG	ATTTGTGT <mark>CG</mark> GTTGGTTTTTI	'GGTGGT <mark>CG</mark> TGA
		1		GNCTAGGATGATTGTAT	TAGAATATTTGTAGAAAT	AATTATGTTATTTGTNNTGTTA-	-TTGGTTAATG-AGNATATG	ATTTGTGT <mark>TG</mark> GTTGGTTTTN1	GGTGGT <mark>TG</mark> TGA
1	Cabeca	2	GGC	GTGCCCCTCAGNATGATGTAT	TAGAATATTTGTAGAAAT	AATTATGTTATTTGTGNTGTTT-	-T-GGTTAATG-AGAATATG	ATTTGTGTTGGTTGGTTTTN1	GGTGGT
		3	G	NTCNGNATGATTANTATTAG	ΑΤΑΤΤΤΓΩΤΑΘΑΑΑΤ	ΑΑΤΤΑΤGTTΑΤΤΤGTNNTNTTΑ-	-TTGGTTAATG-ANAATATG	ATTTGTGTTGGTTGGTTTTNT	GGTGGTTGA
Adulto		1				ΔΔΨΤΔΨΩΨΤΔΨΤ <mark>Τ</mark> ΩΤΩΩΤΩΤ	-T-GGTTAATG-AGAATATG	ΔͲͲͲϾͲϾͲͲϾϾͲͲͲͲͲͳ	GGTGGTTGTGA
		2	C	NTCCAGGTATTGATTNTAT	TAGA - TATTTGTAGAAAT	AATTAIOITAITIOOTOOTOITI	-TTGGTTARIO AGARIAIO	ATTICICITIC CONTROL TO TAR	COTOCTOTO
I	Torax	2	G.		TAGA TATTIGIAGAAAI	AATTAIGITATIIGINNINITA	TIGGITAATGCANAATATG		GGIGGIIGIGA
		5			TAGATATTTGTAGAAAT	AATTATGTTATTTGTGNTNTTA-	-TTGGTTAATG-ANAATATG	ATTTGTGTTGGTTGGTTTTNI	GGTGGTTGNGA
		4		-GNCAGGNATTGATNGTAT	TAGAATATTTGTAGAAAT	AATTATGTTATTTGTGNTAGTTA	IT-GGTTAATG-ANAATATG.	ATTTGTGTTGGTTGGTTTTNI	GGTGGTTGTNA
			1	1	2	2	2	2	2
			6	8	0	2	4	6	8
Identid	ade	Ref. Gene LOC110378559	0	0	0	0	0	0	0
		ATTAGTGTTAGGGAGATT	r <mark>CG</mark> GTGGTTTTT'	TTTATTATAA <mark>CG</mark> GTAT <mark>CG</mark> TTG:	I <mark>CG</mark> GTGTTAGTTTTT <mark>CG</mark>	GTATTGGATG <mark>CG</mark> GTAA <mark>CG</mark> TTTTT'	ITTTTTGG <mark>CG</mark> TTAGTGTT <mark>CG</mark>	IGTTTTT <mark>CG</mark> TTATATATTTTG	GATTTTTTTAACG
		1 ATTAGTGTTAGGGAGATT	r <mark>tg</mark> gtggttttt	TTTATTATAA <mark>TG</mark> GTAT <mark>TG</mark> TTG	T TG GTGTTNGTTTTTT TG	GTANNNANTG <mark>TG</mark> GTGA <mark>TG</mark> TTTTT'	ITTTTNGGNGTNAGNGTTNG	NGTTTTTNGTNANNNNTTTNG	NNTTTTTTTTNAA
	Cabeça	2 NTTAGTGTTAGGGAGATT	TTGGTGGTTTTT	TTTATTATAA <mark>TG</mark> GTAT <mark>TG</mark> TTG	r <mark>tg</mark> gtgtttgtttttt t G	GNNNNAATTG <mark>TG</mark> GTGA <mark>TG</mark> TTTTT'	TTTTTNGGNGTNAGNGTTNG	NGTTTTTNGTNNNNNTTTNG	NNTTTTTTTNAAA-
		3 ATTAGTGTTAGGGAGATT	TTGGTGGTTTTT	TTTATTATAA <mark>TG</mark> GTAT <mark>TG</mark> TTG	TTGGTGTTNGTTTTTTG	GTATTAANTGNGGTGA <mark>TG</mark> TTTTT'	TTTTNGGNGTNAGNNTTNG	NNTTTTTNNTNNNNNTTTNG	NNTTTTTTTNAAA-
Adulto	Torax	1 ATTAGTGTTAGGGAGATT	T TG GTGGTTTTTT	TTTATTATAA <mark>TG</mark> GTAT <mark>TG</mark> TTG	r <mark>tg</mark> gtgtttgtttttt t	GTATTAATTG <mark>TG</mark> GTGA <mark>TG</mark> TTTTT'	TTTTTNGGNGTTAGNNTTNG	NNTTTTTNGTNNNNNTTTNG	NNTTTTTTTTNAAA-
		2 ATTAGTGTTAGGGAGATT	TTGGTGGTTTTT'	TTTATTATAATGGTATTGTTG	TTGGTGTTNGTTTTTTTG	GTATTAANTG <mark>TG</mark> GTGA <mark>TG</mark> TTTTT'	TTTTTGGNGTNAGGGTT TG	NGTTTTTT TG TTANANNTTTNG	NATTTTTTTAA
		3 ATTAGTGTTAGGGAGATT	TTGGTGGTTTTT	TTTATTATAATGGTATTGTTG	TTGGTGTTTGTTTTTT	GTNTTAANTGTGGTGATGTTTTT	PTTTTTGGNGTTAGNGTT <mark>TG</mark>	NGTTTTTNGTTANANNTTTNG	NNTTTTTTNAAC-
		4 A A A A A	PEGECGETE	ͲͲͲϪͲͲϪͲϪϪͲʹϾʹϚͲϪͲͲʹϾͲͲʹϚ·	PEGGEGEGENGEDEDEDE	NCNNNAANTGNGGTGATGTTTTT	₽ͲͲͲͲͲϚĠŇĠͲͲϪĠŇĠͲͲ ͲĠ Ĭ	NGTTTTTNGNNANANNTTTNG	ΝΝΤΤΤΤΤΤΤΤΤΔΔ

Figura 3C Resultados da análise BSP (*Bissulfite Sequence PCR*) para o gene de tripsina LOC110378559. As amostras do tecido foram obtidas do sistema digestivo de lagartas de *H. armigera* alimentadas com dieta suplementada com e sem IPs (A) e tecidos da cabeça, patas e o tórax (A, B, C). As ilhas CG são quase por completo hipometiladas na região codante tanto no sistema digestivo como em tecidos do adulto.

5.3.3. Papel da metilação do DNA na resposta molecular de *H. armigera* aos IPs

A caraterização do metiloma das células intestinais revelou uma lista de 99 genes diferencialmente metilados (Tabela S1) que podem estar envolvidos em mecanismos moleculares de resposta aos IPs. Um grupo de 19 genes conservou a marca epigenética na segunda geração, mesmo quando as lagartas não foram expostas aos IPs (Figura 4). A herança transgeracional destes fenótipos moleculares é uma prova direta de que algumas marcas de metilação do DNA podem resistir ao processo de reprogramação germinal.



Figura 4. Epialelos potenciais de metilação do DNA.

Ctl Locus vs. qvalue IPs		qvalue	Produto de proteína	Ctl vs. SG	qvalue
LOC110384175	-28,2	0,01	uncharacterized LOC110384175	-29,0	0,00
LOC110369926	-30,5	0,00	pre-rRNA processing protein FTSJ3	-40,7	0,00
LOC110369936	-29,8	0,01	A-kinase anchor protein 10, mitochondrial	-29,6	0,00
LOC110370916	-34,3	0,00	cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like	-26,5	0,01
LOC110371715	-32,4	0,00	microprocessor complex subunit DGCR8, transcript variant X1	-28,6	0,00
LOC110372825	-39,1	0,00	THO complex subunit 4	-35,0	0,00
LOC110372886	-31,5	0,01	beta-arrestin-1, transcript variant X1	-28,3	0,00
LOC110374361	-33,5	0,00	regulator of nonsense transcripts 1 homolog	-31,4	0,00
LOC110374662	-36,2	0,00	nudC domain-containing protein 1	-30,2	0,00
LOC110374778	-35,9	0,01	acetyl-coenzyme A transporter 1	32,9	0,00
LOC110375095	34,5	0,00	uncharacterized LOC110375095	31,5	0,00
LOC110375190	38,0	0,00	uncharacterized LOC110375190	28,6	0,01
LOC110375794	37,3	0,00	voltage-dependent anion-selective channel-like	32,3	0,00
LOC110377217	-25,2	0,01	uncharacterized LOC110377217	-32,9	0,00
LOC110380153	-25,6	0,00	uncharacterized LOC110380153	-25,6	0,00
LOC110381188	-29,3	0,00	uncharacterized LOC110381188	25,4	0,00
LOC110382008	30,0	0,01	zinc finger protein 2-like	30,7	0,00
LOC110383013	34,6	0,01	thioredoxin-related transmembrane protein 2 homolog, transcript variant X1	27,9	0,00
LOC110383900	-27,7	0,00	thiamine transporter 2-like	-30,8	0,00

Tabela 2. Epialelos potenciais de metilação do DNA induzidos pelos IPs no genoma do sistema digestivo da *H. armigera*

Epialelos potenciais de metilação do DNA estão associados predominantemente ao controle transcricional. Pode parecer contraintuitivo, mas tanto a metilação/desmetilação pode ser responsável pela resposta molecular aos IPs, em um ajuste estreito com múltiplas marcas epigenéticas. Em *Galleria mellonella,* por exemplo, estudos revelaram que modificações epigenéticas associadas à resistência a *Bacillus thuringiensis* operam tanto no nível pre-transcricional como também pós-transcricional (Mukherjee et al. 2017).

Genes envolvidos no processamento de RNA (LOC110372825, LOC110374361, LOC110369926) e na biossíntese de microRNAs (LOC110371715) foram hipometilados no genoma das lagartas expostas aos IPs e no genoma das progênies (Tabela 1). Há estudos que mostram o papel dos microRNAs na regulação dinâmica de genes de serino peptidases do sistema digestivo da *H. armigera* (Jayachandran et al. 2013; Lomate et al. 2014; Chandra et al. 2018). Mais estudos serão necessários para determinar a relação entre perda da metilação do genoma associado ao processamento de RNA e a plasticidade transcricional do sistema digestivo dos insetos polífagos. Recentemente foi revelado um dos mecanismos

epigenéticos que mostra um vínculo entre proteínas com domínios de ligação ao DNA metilado (MBD2/3) e acetiltransferase de histona (Tip60) promovendo a atividade transcricional em *Bombyx mori* (Xu et al. 2021). O gene LOC110382008 homólogo ao fator de transcrição com domínios de zinco (Zn) do genoma humano, foi hipermetilado no intestino das lagartas expostas aos IPs e na prole. Proteínas com domínios Zn podem recrutar remodeladores da cromatina, como tem sido demostrado em *Drosophila* (Walther et al. 2020) e *Bombyx mori* (Li et al. 2012). A *H. armigera* têm pelo menos de 398 *Loci* que codificam proteínas com domínios Zn, mas as funções de quase a totalidade destas proteínas são por completo desconhecidas na maioria dos insetos (Wu et al. 2019). Por outro lado, em humanos, muitas proteínas estão envolvidas no *cross-talking* com a marcas epigenéticas como a metilação do DNA e modificações de histonas (Hudson e Buck-Koehntop 2018; Yusuf et al. 2021). Mais estudos serão necessários para determinar o papel destes genes nos mecanismos de controle transcricional do sistema digestivo da *H. armigera*.

5.4. Conclusões

A metilação do DNA faz parte da resposta molecular da *H. armigera* aos IPs. Os inibidores causam mudanças nos padrões de metilação do genoma em regiões regulatórias. Aproximadamente 20% das marcas de metilação induzidas pelos IPs resistiram à reprogramação germinal. Estes epialelos potencias de metilação do DNA são fortes candidatos ao controle dos processos de regulação de transcritos no intestino da *H. armigera*. As enzimas DNMTs poderiam estar vinculadas à ativação de genes serino peptidase. Os genes candidatos descritos neste trabalho fornecem pistas sobre estudos futuros para o entendimento das bases moleculares dos processos de regulação transcricional e os fenômenos epigenéticos na *H. armigera*.

Referências

- Amarasinghe, H. E., Clayton, C. I., e Mallon, E. B. (2014). Methylation and worker reproduction in the bumble-bee (*Bombus terrestris*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1780), 20132502. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2502
- Baradaran, E., Moharramipour, S., Asgari, S., e Mehrabadi, M. (2019). Induction of DNA methyltransferase genes in *Helicoverpa armigera* following injection of pathogenic bacteria modulates expression of antimicrobial peptides and affects bacterial proliferation. *Journal of Insect Physiology, 118,* 103939. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103939

Brevik, K., Bueno, E. M., McKay, S., Schoville, S. D., e Chen, Y. H. (2021). Insecticide

exposure affects intergenerational patterns of DNA methylation in the colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. Evolutionary Applications, 14(3), 746–757. https://doi.org/10.1111/eva.13153

- Burdge, G. C., Hanson, M. A., Slater-Jefferies, J. L., e Lillycrop, K. A. (2007). Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *British Journal of Nutrition*, 97(6), 1036–1046. https://doi.org/10.1017/S0007114507682920
- Chittka, A., e Chittka, L. (2010). Epigenetics of royalty. *PLOS Biology*, *8*(11), e1000532. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000532
- Cook, N., DJ, P., Tauber, E., BA, P., e Shuker, D. M. (2019). Validating the demethylating effects of 5-aza-2'-deoxycytidine in insects requires a whole-genome approach (A reply to Ellers et al.). *The American Naturalist*, 4815. https://doi.org/10.1086/704248
- Cook, N., Pannebakker, B. A., Tauber, E., e Shuker, D. M. (2015). DNA Methylation and sex allocation in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *The American Naturalist*, *186*(4), 513–518. https://doi.org/10.1086/682950
- Durken, B. (1923). The effect of coloured light on the pupae of the cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*) and the conduct of the offspring. *Archiv Fur Mikroskopische Anatomie Und Entwicklungsmechanik*, 99(99), 222–389.
- Espada, J. (2012). Non-catalytic functions of DNMT1. *Epigenetics*, 7(2), 115–118. https://doi.org/10.4161/epi.7.2.18756
- Faulk, C., e Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything. *Epigenetics*, *6*(7), 791–797. https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209
- Flores, K. B., Wolschin, F., e Amdam, G. V. (2013). The role of methylation of dna in environmental adaptation. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2), 359–372. https://doi.org/10.1093/icb/ict019
- Glastad, K. M., Hunt, B. G., e Goodisman, M. A. D. (2019). Epigenetics in insects: genome regulation and the generation of phenotypic diversity. *Annual Review of Entomology*, *64*(1), 185–203. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111914
- Goll, M. G., e Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 481–514. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E., e Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA Asp by the DNA methyltransferase homolog DNMT2. *Science*, 311(5759), 395–398. https://doi.org/10.1126/science.1120976
- Henrich, V. C., e Denlinger, D. L. (1982). A maternal effect that eliminates pupal diapause in progeny of the flesh fly, Sarcophaga bullata. Journal of Insect Physiology, 28(10), 881– 884. https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90102-0
- Hudson, N. O., e Buck-Koehntop, B. A. (2018). Zinc finger readers of methylated DNA. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2555, 23(10), 2555. https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102555
- Hunt, B. G., Glastad, K. M., Yi, S. V., e Goodisman, M. A. D. (2013). The function of intragenic

DNA methylation: Insights from insect epigenomes. *Integrative and Comparative Biology*, *53*(2), 319–328. https://doi.org/10.1093/icb/ict003

- Jayachandran, B., Hussain, M., e Asgari, S. (2013). An insect trypsin-like serine protease as a target of microRNA: utilization of microRNA mimics and inhibitors by oral feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(4), 398–406. https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2012.10.004
- Jones, C. M., Lim, K. S., Chapman, J. W., e Bass, C. (2018). Genome-wide characterisation of dna methylation in an invasive lepidopteran pest, the cotton bollworm *Helicoverpa armigera. Genes/Genomes/Genetics*, *8*(March), 779–787. https://doi.org/10.1534/g3.117.1112
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., e Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, *319*(5871), 1827–1830. https://doi.org/10.1126/science.1153069
- Li, L., e Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, *18*(11), 1427–1431.
- Li, Z., Cheng, D., Mon, H., Tatsuke, T., Zhu, L., Xu, J., Lee, J. M., Xia, Q., e Kusakabe, T. (2012). Genome-wide identification of polycomb target genes reveals a functional association of pho with scm in *Bombyx mori. PLOS ONE*, *7*(4), e34330. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034330
- Lomate, P. R., Mahajan, N. S., Kale, S. M., Gupta, V. S., e Giri, A. P. (2014). Identification and expression profiling of *Helicoverpa armigera* microRNAs and their possible role in the regulation of digestive protease genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *54*, 129–137.
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, *19*(2), 81–92. https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80
- Mukherjee, K., Grizanova, E., Chertkova, E., Lehmann, R., Dubovskiy, I., e Vilcinskas, A. (2017). Experimental evolution of resistance against *Bacillus thuringiensis* in the insect model host *Galleria mellonella* results in epigenetic modifications. *Virulence*, 8(8), 1618– 1630. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1325975
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., e Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *118*(1–2), 69–78. https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2015.02.009
- Mukherjee, K., e Vilcinskas, A. (2019). Transgenerational epigenetic inheritance in insects. *Transgenerational Epigenetics*, 315–329. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816363-4.00014-6
- Pegoraro, M., Bafna, A., Davies, N. J., Shuker, D. M., e Tauber, E. (2016). DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in Nasonia. *Genome*, *26*(2), 203–210. https://doi.org/10.1101/gr.196204.115
- Piskala, A., e Sorm, F. (1964). Nucleic acids components and their analogues. LI. synthesis of 1-glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, *29*(9), 2060–2076.

Rohde, C., Zhang, Y., Reinhardt, R., e Jeltsch, A. (2010). BISMA - Fast and accurate bisulfite

sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. BMC Bioinformatics, 11(1), 230. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-230

- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., e Lyko, F. (2010). RNA methylation by DNMT2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes e Development*, 24(15), 1590–1595. https://doi.org/10.1101/GAD.586710
- Schulz, N. K. E., Wagner, C. I., Ebeling, J., Raddatz, G., Diddens-de Buhr, M. F., Lyko, F., e Kurtz, J. (2018). DNMT1 has an essential function despite the absence of CpG DNA methylation in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34701-3
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M., Ellango, R., Sharma, H. C., Akbar, S. M. D., e Krishna Kumar, N. K. (2018). Double-stranded rna-mediated suppression of trypsinlike serine protease (t-SP) triggers over-expression of another t-SP isoform in *Helicoverpa armigera. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 746–761. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2584-3
- Von, H. D. D., Slavnik, M., e Muggia, F. M. (1976). 5-Azacytidine: a new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 85(2), 237– 245.
- Walther, M., Schrahn, S., Krauss, V., Lein, S., Kessler, J., Jenuwein, T., e Reuter, G. (2020). Heterochromatin formation in *Drosophila* requires genome-wide histone deacetylation in cleavage chromatin before mid-blastula transition in early embryogenesis. *Chromosoma* 2020 129:1, 129(1), 83–98. https://doi.org/10.1007/S00412-020-00732-X
- Wu, S., Tong, X., Li, C., Lu, K., Tan, D., Hu, H., Liu, H., e Dai, F. (2019). Genome-wide identification and expression profiling of the C2H2-type zinc finger protein genes in the silkworm Bombyx mori. *PeerJ*, 7(7), e7222. https://doi.org/10.7717/PEERJ.7222
- Xu, G., Lyu, H., Yi, Y., Peng, Y., Feng, Q., Song, Q., Gong, C., Peng, X., Palli, S. R., e Zheng, S. (2021). Intragenic DNA methylation regulates insect gene expression and reproduction through the MBD/Tip60 complex. *IScience*, 24(2), 102040. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102040
- Xu, G., Zhang, J., Lyu, H., Song, Q., Feng, Q., Xiang, H., e Zheng, S. (2018). DNA methylation mediates BmDeaf1-regulated tissue- and stage-specific expression of BmCHSA-2b in the silkworm, Bombyx mori. *Epigenetics e Chromatin*, 11(1), 32. https://doi.org/10.1186/s13072-018-0202-4
- Yan, H., Bonasio, R., Simola, D. F., Liebig, J., Berger, S. L., e Reinberg, D. (2015). DNA methylation in social insects: how epigenetics can control behavior and longevity. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 435–452. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020803
- Yusuf, A. P., Abubakar, M. B., Malami, I., Ibrahim, K. G., Abubakar, B., Bello, M. B., Qusty, N., Elazab, S. T., Imam, M. U., Alexiou, A., e Batiha, G. E.-S. (2021). Zinc metalloproteins in epigenetics and their crosstalk. *Life 2021, Vol. 11, Page 186*, *11*(3), 186. https://doi.org/10.3390/LIFE11030186
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., e Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, *328*(5980), 916–919. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1186366

Material suplementar

		No. de
Gene	Proteína	sítio
LOC110378315	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	3
LOC110384175	uncharacterized LOC110384175	3
	probable bifunctional methylenetetrahydrofolate	
LOC110370397	dehydrogenase/cyclohydrolase 2, transcript variant X1	2
LOC110375315	ER membrane protein complex subunit 1, transcript variant X1	2
LOC110379868	RNA-binding protein lark, transcript variant X1	2
LOC110382346	acylglycerol kinase, mitochondrial	2
LOC110369599	zinc finger Y-chromosomal protein 2-like	1
LOC110369894	kinesin heavy chain	1
LOC110369910	serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit 3-like	e 1
LOC110369926	pre-rRNA processing protein FTSJ3	1
LOC110369936	A-kinase anchor protein 10, mitochondrial	1
LOC110370106	acyl-protein thioesterase 1	1
LOC110370345	maternal protein pumilio, transcript variant X1	1
LOC110370365	46 kDa FK506-binding nuclear protein	1
LOC110370373	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3-like	1
LOC110370633	lipoma-preferred partner homolog	1
	serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit,	
LOC110370777	transcript variant X1	1
LOC110370916	cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like	1
LOC110370979	tumor suppressor candidate 3	1
LOC110371225	tumor susceptibility gene 101 protein	1
LOC110371715	microprocessor complex subunit DGCR8, transcript variant X1	1
LOC110371742	PHD finger protein 12, transcript variant X1	1
LOC110372656	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	1
LOC110372825	THO complex subunit 4	1
LOC110372886	beta-arrestin-1, transcript variant X1	1
LOC110372934	elongation factor 1-alpha, transcript variant X1	1
LOC110373071	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	1
LOC110373091	elongation factor 1s, mitochondrial, transcript variant X1	1
LOC1103/35/2	coatomer subunit alpha	1
LOC110373693	mucolipin-3-like	1
LOC1103/4162	zinc finger SWIM domain-containing protein 8-like	1
LOC110374222	ras-related protein Rab-21	1
LOC110374361	regulator of nonsense transcripts 1 homolog	1
1 0 0 4 4 0 0 7 4 5 0 0	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 35A, transcript	
LOC110374522	variant X1	1
LOC110374523	nuclear pore complex protein Nup153-like	1
LOC110374600	serine/threonine-protein kinase tricorner, transcript variant X1	1
100110274600		1
LOC110374608	Al	1
	nuce domain-containing protein 1	1
LUG1103/4/02	interferen-inducible double-stranded PNA dependent protein	I
	kipase activator A homolog, transcript variant V1	1
	π	1
LOC1103/4//0	acelyi-coenzyine A italisponer i 20S ribosomal protoin 1.1 mitosbandrial	1
LOC1103/5090	sas nuosomai protein LT, mitochondhai	1

Tabela S1. Genes diferencialmente metilados na presença dos IPs.

LOC110375095	uncharacterized LOC110375095	1
LOC110375190	uncharacterized LOC110375190	1
LOC110375331	uncharacterized LOC110375331, transcript variant X1	1
LOC110375512	transmembrane protein 64	1
LOC110375794	voltage-dependent anion-selective channel-like	1
LOC110375967	spermatogenesis-associated protein 5	1
LOC110376098	lipoma-preferred partner homolog	1
	cysteine and histidine-rich protein 1 homolog, transcript variant	
LOC110376292	X1	1
LOC110376416	serine/threonine-protein phosphatase 5	1
LOC110376630	uncharacterized LOC110376630, transcript variant X1	1
LOC110377207	hsp90 co-chaperone Cdc37	1
LOC110377217	uncharacterized LOC110377217	1
LOC110377968	folliculin	1
LOC110377970	protein LSM14 homolog B-like, transcript variant X1	1
LOC110377971	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like	1
LOC110378337	polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9, transcript variant X1	1
	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 7,	
LOC110378675	mitochondrial	1
LOC110378917	proteasomal ubiquitin receptor ADRM1, transcript variant X1	1
LOC110379071	BTB/POZ domain-containing protein 2-like	1
LOC110379128	ephrin type-B receptor 2	1
LOC110379255	treacle protein-like, transcript variant X1	1
LOC110379285	ornithine carbamoyltransterase-like	1
LOC110379390	rhythmically expressed gene 2 protein-like	1
LOC110379455	lymphokine-activated killer 1-cell-originated protein kinase-like	1
LOC110380153	uncharacterized LOC110380153	1
LOC110380382	apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial-like	1
LOC110380385	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33	1
LOC110380387	prolyl 3-hydroxylase sudestada1	1
LOC110380458	transcription elongation factor B polypeptide 3-like	1
LOC110380558	G I P-binding protein Rheb nomolog	1
LOC110380563	ran-binding protein 3	1
100110290616	swi/SinF-related matrix-associated actin-dependent regulator of	1
	LIDE0553 protoin Coorf64 homolog	1
	nucleolysin TIAP, transcript variant X1	1
	uncharacterized LOC110381117	1
LOC110381188	uncharacterized LOC110381188	1
LOC110381189	m7GnnnX dinhosnhatase	1
LOC110381195	nre-mRNA-splicing factor CW/C22 homolog	1
LOC110381293	LIMP-CMP kinase	1
LOC110381308	protoporphyripogen oxidase	1
LOC110381400	transcriptional repressor CTCF-like transcript variant X1	1
LOC110381584	DNA repair protein XRCC1	1
LOC110382008	zinc finger protein 2-like	1
LOC110382341	transcriptional protein SWT1-like transcript variant X1	1
LOC110382796	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1. mitochondrial	1
	thioredoxin-related transmembrane protein 2 homolog, transcript	•
LOC110383013	variant X1	1
LOC110383163	26S protease regulatory subunit 8	1
LOC110383207	inorganic pyrophosphatase	1
LOC110383246	baculoviral IAP repeat-containing protein 3-like	1

LOC110383296	protein IWS1 homolog	1
LOC110383539	zinc finger protein on ecdysone puffs-like, transcript variant X1	1
LOC110383900	thiamine transporter 2-like	1
LOC110384069	ruvB-like helicase 1	1
LOC110384234	mucin-5AC-like	1
LOC110384235	nuclear cap-binding protein subunit 1	1
LOC110384601	DNA repair protein REV1	1

6. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, ampliamos o conhecimento sobre a adaptação do inseto polífago H. armigera aos IPs. Estes inibidores não causaram efeitos evidentes nos parâmetros avaliados do inseto. H. armigera possui um amplo repertório de enzimas digestivas e oxidoreductases que podem ser regulados de forma dinâmica em funções das necessidades alimentares do inseto. As lagartas expostas aos efeitos antinutricionais dos IPs ativam um conjunto de enzimas proteolíticas, predominantemente do tipo tripsinas. A análise comparativa das sequencias de tripsinas e quimotripsinas revela eventos recentes de duplicação, que foram transmitidos em bloco. Curiosamente, o perfil transcricional sugere que em algum ponto evolutivo ocorreu a divergência funcional, embora a maioria de genes de serino peptidases estudadas tende a ser responsivos aos IPs. O mais surpreendente foi que os fenótipos moleculares de expressão gênica foram transmitidos por herança epigenética. Grande parte dos padrões de expressão de genes induzidos pelos IPs são herdados à geração seguinte, mesmo na ausência dos inibidores na dieta das progênies. Estes fenômenos sugerem que mecanismos epigenéticos estão envolvidos no controle transcricional de expressão de genes e na formação de epialelos moleculares. A presença de ilhas CG e ETs em genes de tripsinas e quimotripsinas apontaram à metilação do DNA como o mecanismo subjacente da regulação gênica. Não obstante, não foi possível identificar uma relação direta entre os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos. Inclusive, as ilhas CG parecem ser regiões resistentes à metilação do DNA, mesmo em processos do desenvolvimento. Contudo, a complexidade transcricional das serino peptidases pode estar sujeita ao cross-talking entre marcas epigenéticas. Neste trabalho não é descartada a participação das DNMTs nos processos não catalíticos associados à regulação gênica. Os resultados mostram que a inibição das enzimas DNMTs provoca o silenciamento parcial dos genes de tripsinas e quimotripsinas. Além disso, é apresentado um conjunto de genes responsivos à metilação que podem estar envolvidos na resposta molecular aos IPs e serão alvos importantes de estudos futuros.