



UNICAMP

**DESIREÉ SOARES DA SILVA**

**“ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DO INIBIDOR DE *Adenantha pavonina* (ApTI) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA BROCA-DA-CANA (*Diatraea saccharalis*) E DA LAGARTA-DO-CARTUCHO (*Spodoptera frugiperda*): ASPECTOS BIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE PROTEOMA”**

CAMPINAS

2014




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Desireé Soares da Silva

**“ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DO INIBIDOR DE *Adenantha pavonina* (ApTI) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA BROCA-DA-CANA (*Diatraea saccharalis*) E DA LAGARTA-DO-CARTUCHO (*Spodoptera frugiperda*): ASPECTOS BIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE PROTEOMA”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica

  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DESIREÉ SOARES DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO

---

CAMPINAS – SP - BRASIL

2014

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38e Silva, Desireé Soares da, 1982-  
Estudo comparativo do efeito do inibidor de *Adenantha pavonina* (ApTI) sobre o desenvolvimento da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*): aspectos biológicos, bioquímicos e de proteoma / Desireé Soares da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Broca-da-cana-de-açúcar. 2. Lagarta-do-cartucho. 3. Controle biológico. 4. Interação planta-inseto. 5. *Adenantha pavonina*. 6. Inibidores da tripsina. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Comparative study of the effect of the inhibitor *Adenantha pavonina* (ApTI) on the development of the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): biological aspects, biochemical and proteome

**Palavras-chave em inglês:**

Sugarcane borer

Fall armyworm

Biological control

Plant-insect interaction

*Adenantha pavonina*

Trypsin inhibitors

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Lígia Rodrigues Macedo [Orientador]

Maria das Graças Machado Freire

Luciana Maria de Hollanda

Adriana Rios Lopes Rocha

José Roberto Silva

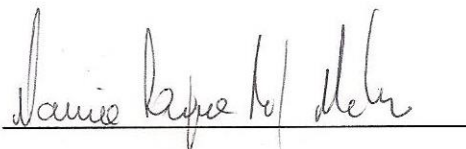
**Data de defesa:** 28-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 28 de março de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo



Assinatura

Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire



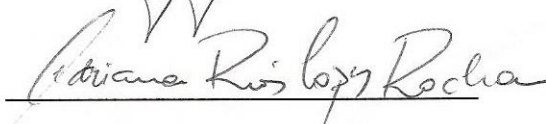
Assinatura

Dra. Luciana Maria de Hollanda



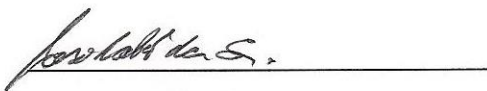
Assinatura

Dra. Adriana Rios Lopes Rocha



Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Silva



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni



Assinatura

Prof. Dra. Valdirene Moreira Gomes



Assinatura

Dra. Gláucia Coelho de Mello



Assinatura



## RESUMO

Inibidores de peptidases (IPs) são proteínas vegetais envolvidas nos mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos. São considerados agentes antimetabólicos, uma vez que sua presença na dieta de insetos compromete seu desenvolvimento normal. Este efeito se dá através da formação de complexos entre os IPs e as enzimas digestivas, comprometendo assim o processo digestivo dos insetos. Neste trabalho, investigamos efeitos do inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI) sobre o desenvolvimento de dois insetos-praga, a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Bioensaios, estudos bioquímicos e de proteômica, foram realizados a fim de determinar o efeito de ApTI sobre o desenvolvimento destes insetos. A exposição aguda de larvas de *D. saccharalis* ao ApTI diminuiu a atividade das tripsinas e quimotripsinas em 87% e 63%, respectivamente. ApTI afetou o desenvolvimento deste inseto como observado através da diminuição na viabilidade larval (55%) e pupal (20,6%). Larvas oriundas da geração F1 apresentaram efeitos similares aos observados na geração F0, como redução no peso (23%) e na taxa de sobrevivência (33%). Análises bioquímicas revelaram que o inibidor foi refratário à digestão pelas peptidases de *D. saccharalis* e que o perfil de enzimas digestivas permaneceu sensível à inibição por quantidades crescentes de ApTI. Entretanto, não foi possível realizar a identificação das proteínas do intestino desta lagarta por espectrometria de massas. Larvas de *S. frugiperda* foram criadas em dieta contendo 0,5% de ApTI. Ao final dos experimentos, uma redução no peso médio larval de 30% foi observada. Porém, diferentemente dos resultados obtidos para *D. saccharalis*, as enzimas das larvas alimentadas com ApTI mostraram-se resistentes à inibição, sugerindo que esta espécie adapta-se à dieta contendo inibidor. O sequenciamento das proteínas presentes nos fluidos intestinais de *S. frugiperda* permitiu a identificação de 41 proteínas. Dentre elas foi possível

identificar serinopeptidases do tipo tripsina e quimotripsina, proteínas estruturais, enzimas quinases e fosfatases. Nossos resultados demonstram que são necessários novos estudos para obtenção de mais informações acerca das proteínas presentes no fluido intestinal de *S. frugiperda*, para correlacionarmos sua expressão diferencial em larvas submetidas a diferentes tratamentos, conhecendo desta maneira um novo indício sobre os mecanismos adaptativos desta espécie contra os IPs.



## ABSTRACT

Peptidase inhibitors (PIs) are plant proteins involved in defense mechanisms against herbivores and pathogens. They are considered antinutritional compounds, since their presence in insect diet hinder the normal larval development. This effect is due the complexation between PIs and peptidases, affecting the insect digestive process. In this work, we investigated the effects of trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* seeds (ApTI) on the development of two pest insects: the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) and the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). Biochemical and proteomic studies were carried out in order to determine the ApTI effects on the development of these insects. The acute exposure of sugarcane borer to ApTI reduced the trypsin and chymotrypsin activities in 87% and 63%, respectively. The effect of ApTI on development of sugarcane borer was noticed by reduced larval (23%) and pupal viability (33%). Biochemical analysis revealed that the inhibitor was refractory to digestion by *D. saccharalis* peptidases and the enzymes maintained sensibility to inhibition by increasing amounts of ApTI. However, it was not possible to identify proteins from sugarcane borer gut through mass spectrometry approach. *S. frugiperda* larvae were reared in artificial diet containing 0.5% ApTI and a reduction in average larval weight of 30% was noticed. But, differently of *D. saccharalis*, *S. frugiperda* midgut enzymes became resistant to inhibition by ApTI, showing that this species adapted to ApTI-diet. From the sequencing of *S. frugiperda* gut fluid proteins we identified 41 proteins. Among them, we identified trypsin and chymotrypsin enzymes, structural proteins and kinases and phosphatases enzymes. Our results demonstrated that further researches are necessary in order to obtain more information about proteins from *S. frugiperda* gut fluid. The correlation between differential expressed proteins in larvae submitted to different treatments is crucial to reach new indicatives about the adaptive mechanisms this species evolve against PIs.



# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
1 - PRAGAS AGRÍCOLAS.....	5
1.1 - <i>A produção da cana-de-açúcar no Brasil e os danos provocados por Diatraea saccharalis</i>	6
1.2 - <i>Spodoptera frugiperda e os danos provocados no agronegócio</i> .....	9
2 - MECANISMOS DE PROTEÇÃO DAS PLANTAS CONTRA OS INSETOS.....	10
2.1 - <i>Inibidores de peptidases</i> .....	13
2.2 - <i>Peptidases de insetos</i> .....	14
3 - ADAPTAÇÕES DOS INSETOS AOS INIBIDORES DE PEPTIDASES .....	16
4 - UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES DE PEPTIDASES NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA.....	18
5 - PROTEÔMICA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	20
5.1 - <i>Proteômica no estudo de interação inseto-planta</i> .....	23
<b>III – OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>CAPITULO I: EFEITO DO INIBIDOR DE TRIPSINA APTI NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DIATRAEA SACCHARALIS E SPODOPTERA FRUGIPERDA</b> .....	<b>29</b>
<b>IV- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
1 - ESPÉCIE VEGETAL .....	29
2 - INSETOS.....	30
3 - ISOLAMENTO DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE A. PAVONINA (ApTI) .....	30
4 - BIOENSAIOS.....	32
4.1 - <i>Efeito agudo de ApTI em larvas de D. saccharalis</i> .....	33
4.2 - <i>Efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento D. saccharalis</i> .....	33
4.3 - <i>Efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento de S. frugiperda</i> .....	35
5 - PREPARAÇÃO DO INTESTINO MÉDIO.....	36
6 - PREPARAÇÃO DAS FEZES.....	36
7 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	37
8 - INIBIÇÃO DAS PEPTIDASES DO INTESTINO MÉDIO DE D. SACCHARALIS E S. FRUGIPERDA POR ApTI.....	38
9 - DIGESTIBILIDADE IN VITRO DO ApTI PELAS PEPTIDASES DIGESTIVAS DE D. SACCHARALIS .....	38
10 - ATIVIDADES DAS PEPTIDASES DO INTESTINO MÉDIO DE D. SACCHARALIS E S. FRUGIPERDA EM GÉIS DE ELETROFORESE.....	39
11 - A ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>VI – RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
1 - PURIFICAÇÃO DE ApTI.....	41
2 - EFEITO AGUDO DO ApTI SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE D. SACCHARALIS NA GERAÇÕES F0.....	42
2.1 - <i>Inibição da atividade proteolítica de larvas de D. saccharalis alimentadas em dieta contendo ApTI</i> .....	42
2.2 - <i>Análise qualitativa da atividade proteolítica do intestino médio de larvas de D. saccharalis através de gel de eletroforese</i> .....	45

2.3 - Digestibilidade <i>In vitro</i> de ApTI pelas peptidases digestivas de <i>D. saccharalis</i> .....	46
3 - EFEITO CRÔNICO DO APTI SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>D. SACCHARALIS</i> NA GERAÇÃO F0 .....	48
3.1 - Parâmetros fisiológicos do desenvolvimento da geração F0 de <i>D. saccharalis</i> .....	48
3.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento larval da geração F0 de <i>D. saccharalis</i> .....	49
3.3 - Consumo e utilização de alimento.....	51
4 - EFEITO DE APTI NO DESENVOLVIMENTO LARVAL DA GERAÇÃO F1 DE <i>D. SACCHARALIS</i> .....	52
4.1 - Consumo e utilização de alimento.....	54
4.3 - SDS-PAGE 12,5% das fezes de <i>D. saccharalis</i> .....	57
5 - EFEITO DE APTI NO DESENVOLVIMENTO DE <i>S. FRUGIPERDA</i> .....	58
5.1 - Parâmetros biológicos de <i>S. frugiperda</i> .....	58
5.2 - Parâmetros bioquímicos de <i>S. frugiperda</i> .....	60
5.3 - Análise qualitativa da atividade proteolítica do intestino médio de larvas de <i>S. frugiperda</i> através de gel de eletroforese .....	61
<b>VII - DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
1. Efeitos sobre <i>D. saccharalis</i> .....	63
2. Efeitos sobre <i>S. frugiperda</i> .....	70
<b>CAPITULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA DO FLUIDO INTESTINAL DE <i>D. SACCHARALIS</i> SUBMETIDAS À DIETA CONTENDO APTI .....</b>	<b>73</b>
<b>VIII - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
1 - ESPÉCIE VEGETAL E INSETOS .....	73
1.2 - Delineamento experimental e constituição dos grupos.....	73
1.3 - Obtenção das proteínas do fluido intestinal de <i>D. saccharalis</i> e <i>S. frugiperda</i> .....	74
1.4 - Solubilização e dessalinização .....	75
1.5 - Quantificação das proteínas.....	76
1.6 - Digestão das proteínas .....	76
1.7 - Purificação dos peptídeos provenientes da digestão trípica .....	77
1.8 - Análise por LC - MSE.....	77
1.9 - Análise estatística das proteínas.....	80
<b>IX – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
1 - PROTEÍNAS DE <i>D. SACCHARALIS</i> E <i>S. FRUGIPERDA</i> .....	81
2 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	82
2.1 - Proteínas identificadas em ambos os tratamentos.....	87
2.2 - Proteínas exclusivas identificadas no grupo controle.....	89
2.3 - Proteínas exclusivas identificadas no grupo tratado com ApTI .....	92
<b>X – CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>XI - PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>97</b>
<b>XI – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>123</b>

*A minha mãe Nílce por sua dedicação,  
orientação, amizade e amor  
incondicional.*

*Dedico*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, desde já, peço desculpas caso eu venha me esquecer de alguém.

A Deus, que reina em meu coração através das bênçãos dispensadas a mim, fonte de inspiração e sabedoria. Sustentação nos momentos de angústia e dificuldade.

A minha mãe, Nilce, por ser a minha base e meu maior exemplo de amor e doação. Obrigada por suas orações, por suas sábias palavras de incentivo e por estar sempre ao meu lado. Uma vida é pouco para agradecer, portanto, nada que eu fale, escreva ou faça em minha vida será capaz de retribuir o que você faz por mim. Te Amo.

A meu avô, Tercílio, referência de honestidade, seriedade e responsabilidade com a família. Obrigada pelo amor duplo de pai e avô.

A minha avó, Aparecida, por seus cuidados e ser minha segunda mãe. Hoje no plano espiritual me guia e me fortalece. Saudade infinita.

A minha madrinha Maria, que junto da avó Aparecida no plano espiritual me aconselha, guia, protege e acalenta minhas dores e angústias. Obrigada por nossas conversas diárias.

A meus familiares, dando-me força e alegria em todos os minutos da minha vida, obrigada por serem meus conselheiros, meus amores, minha base. Amo vocês. Em especial à Thalita, Camila, Neide, Fábio, Neuza, Luciana, Renata, Adilson, Carlos, Carlinha, Rinaldo, Maria, Suely, Bival, Alessandro e Cris.

A Marcinha, por ser tão maravilhosa e fazer da minha vida mais feliz. Concordo com Mário Quintana ao dizer que “Amizade é um amor que nunca morre”.

Ao Caio, que foi um verdadeiro amigo e co-orientador, sempre dedicado, paciente e disposto a ajudar. Que você seja recompensado por toda ajuda, dedicação e amizade. Serei eternamente grata!

Ao Eduardo (Zézis), que foi fundamental no desenvolvimento do meu projeto de doutorado e nos experimentos de proteoma, me auxiliando, ensinando e incentivando nos momentos de

dificuldades de realização deste projeto. Obrigada pelo carinho e amizade a qual é para mim muito valiosa.

Ao Paulinho, amigo querido, técnico dedicado, companheiro e um excelente profissional. Que Deus esteja sempre ao seu lado. Obrigada!

A Vanessa, que foi uma querida companheira a qual dividimos momentos de alegrias, tristezas e angustias. Esses anos de convivência nos transformaram não somente em amigas, mas principalmente em pessoas melhores. Obrigada por estar ao meu lado há anos e que essa amizade seja eterna.

A Marcela, Ivan e Sidnei, meus queridos amigos, minha família em Campinas, obrigada por serem especiais, por me aceitarem como sou e por me ajudarem em todos os momentos da minha vida, felizes ou não. Amo vocês.

A Alinne (linilds), por me provar a cada dia que é possível construir uma amizade sólida e sincera mesmo a distância, pelos conselhos, paciência, parceria e apoio infinito. Saudades!

A Katia, Tati, Beto, Nina, Betinho e Talitinha, muito obrigada por me acolherem como família, por toda amizade e carinho. Deus em sua infinita bondade sempre coloca anjos em nossas vidas.

A Michele, Ana Flávia, Ericka e Cristina, por serem tão especiais e por me fazerem acreditar que a amizade não significa ausência. Cada segundo de saudade é transformado em amor e respeito. Amo vocês.

Ao Dorival, por ser um grande amigo e estar ao meu lado em todos os momentos mesmo estando tão longe. Agradeço eternamente por toda ajuda dispensada na correção do meu artigo, nas dúvidas esclarecidas e principalmente por seu companheirismo e amizade. Muito obrigada.

Gostaria de agradecer algumas pessoas de suma importância na minha formação profissional, pelas quais possuo respeito e admiração:

A minha orientadora, Maria Lígia Rodrigues Macedo, por sua orientação exemplar, oportunidade, ensinamentos, paciência, dedicação e amizade. Muito Obrigada.



Agradeço imensamente o prof. Dr. Sérgio Marangoni pela disponibilização do Laboratório de Química de Proteínas, reagentes, materiais, confiança e ensinamentos.

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Labate, à Dra. Monica Veneziano Labate e Thaís Regiani Cataldi por me auxiliarem nas análises de proteoma, disponibilidade de equipamentos, reagentes e ensinamentos.

Aos membros da banca de qualificação, prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck, Dra. Maria das Graças M. Freire e Dra. Luciana Maria de Hollanda.

Aos membros da banca de Tese, Maria Das Graças Machado Freire, Luciana Maria de Hollanda, Adriana Rios Lopes Rocha, José Roberto Silva, Glaucia Coelho de Mello, Valdirene Moreira Gomes e Sérgio Marangoni, por aceitarem o convite e pela atenção dispensada.

Aos amigos de Laboratório, Caio F. Ramalho de Oliveira, Miriam Dantzger (Miroca) por ser uma grande amiga, César S. Bezerra, Lays Guimarães, Victor Corasolla, Fábio Marangoni, Daniela Damico e Paulo Baldasso, pela amizade, companheirismo e compartilhamento de informações.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biomembranas, especialmente à professora Eneida e ao Marcio por terem me disponibilizado a utilização de alguns equipamentos.

Ao Laboratório de Enzimologia pela disponibilização de alguns reagentes e equipamentos.

Ao Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) pela disponibilização de alguns reagentes, equipamentos e ajuda. Em especial ao Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Marcela, Brunão, Bruna, Silvia e Zezé.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, por colaborarem com meu crescimento profissional e intelectual.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, especialmente à Andréia pela ajuda e dedicação.

A Capes pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.



## ABREVIATURAS

<b>ApTI</b>	Inibidor de <i>Adenantha pavonina</i>
<b>BAPNA</b>	<i>N</i> - $\alpha$ Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar ao mRNA
<b>EB</b>	Extrato bruto
<b>ESI</b>	Ionização por eletrospray
<b>IM</b>	Intestino médio
<b>IAA</b>	Iodoacetamida
<b>IP</b>	Inibidor de peptidases
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PLGS</b>	ProteinLynx Global server
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>SKTI</b>	Inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz
<b>LC/MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
<b>LC-MSE</b>	NanoUPLC tandem nanoESI-MSE acoplado à cromatografia líquida
<b>M</b>	Mols por litro
<b><i>m/z</i></b>	Razão entre massa e carga
<b>MALDI</b>	Ionização/desorção por laser assistida por matriz
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar por litro
<b>MS</b>	Espectrometria de massas
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massas sequencial
<b>MSE</b>	NanoUPLC tandem
<b>MudPIT</b>	Tecnologia Multidimensional para a identificação de Proteína
<b>nL/min</b>	Nanolitro por minuto
<b>TLCK</b>	<i>N</i> - $\alpha$ -tosyl-L-lysine chromomethyl ketone
<b>TOF</b>	Tempo de voo (do inglês: Time of flight)
<b>TRIS</b>	Hidroximetil aminometano
<b>Uniprot</b>	Universal protein resource
<b>UPLC</b>	Cromatografia líquida de ultraperformance
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>Vmax</b>	Velocidade máxima



## I - INTRODUÇÃO

Momento em que o homem iniciou o cultivo de plantas selvagens para seus próprios fins, diversos organismos foram considerados concorrentes por apresentarem efeitos negativos à produtividade, como insetos, roedores, pássaros, microorganismos e inclusive outras plantas (ervas daninhas) (WALKER, 1983). Dentre os principais concorrentes, destacam-se os insetos por gerarem prejuízos econômicos que chegam a 20% para algumas culturas, como milho e arroz, entretanto, esses prejuízos podem variar entre 20% a 40% em outras culturas (FERRY *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2010). O impacto dos insetos na produtividade dos alimentos é agravado pelo crescimento da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, cujos índices de fome são elevados. Estudos indicam que o aumento populacional previsto para 2025 totalizará aproximadamente 8,5 bilhões de pessoas, sendo assim, torna-se necessário o aumento de 50% na produção de alimentos para sustentar o crescimento populacional (BABU *et al.*, 2003). Em função disto e por questões econômicas, diversas técnicas de combate à perda de alimentos produzidos no campo foram desenvolvidas, como o uso de inseticidas para proteção de plantas contra pragas. Porém, sabe-se que esse tipo de prática será cada vez mais oneroso aos produtores e danoso ao meio ambiente. Além disso, o uso descontrolado de agroquímicos permitiu que pragas passassem a desenvolver resistência contra inseticidas devido à falta de seletividade em suas aplicações (HAQ *et al.*, 2004; JAMAL *et al.*, 2012).

Com o intuito de desenvolver uma agricultura mais consciente em relação à preservação ambiental, os processos de controle de insetos foram dirigidos principalmente para o fortalecimento do próprio sistema de defesa das plantas contra herbívoros. Isso permitiu a substituição do uso de agroquímicos por meios do controle de pragas mais específicos e menos danosas ao meio ambiente (RAMOS, 2013). Uma alternativa para

combater patógenos é reforçar os mecanismos de defesa das plantas contra ataques de insetos.

Inibidores de peptidases (IPs) são particularmente eficazes contra uma ampla gama de insetos-pragas (HILDER e BOULTER, 1999; SENTHILKUMAR *et al.*, 2010; SAADATI e BANDANI, 2011) e microrganismos (OGUNWOLU *et al.*, 1991; MEDEIROS *et al.*, 2012). Tais inibidores são produzidos de forma constitutiva pelas plantas, em tecidos e órgãos de armazenamento, como tubérculos e sementes, cuja expressão aumenta em resposta a ataques de agentes patogênicos (RYAN, 1990). Os IPs são polipeptídios que possuem a capacidade de se ligar às peptidases dos insetos fitófagos, causando uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para seu crescimento e desenvolvimento, reduzindo conseqüentemente a população de insetos (JAMAL *et al.*, 2012).

Em função disso, ferramentas biotecnológicas foram desenvolvidas com o intuito de aumentar a produção das culturas através da expressão de genes de IPs (DE LEO e GALLERANI, 2002; FALCO e SILVA-FILHO, 2003; GATEHOUSE, 2011). Isso é motivado pela comprovação de que plantas transformadas geneticamente com diferentes inibidores têm apresentado resultados satisfatórios, fazendo deles uma interessante classe de proteínas com potencial inseticida (MARCHETTI *et al.*, 2000; ABDEEN *et al.*, 2005). No entanto, há diversos casos reportados de insetos que desenvolveram mecanismos de adaptação para superar os efeitos inseticidas dos IPs (JONGSMA e BOLTER, 1997; GRUDEN *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2004; BAYÉS *et al.*, 2005; BRIOSCHI *et al.*, 2007; ERLANDSON *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na busca de soluções para os mecanismos adaptativos das pragas, estratégias de sucesso vêm sendo adotadas. Neste contexto, destacamos as abordagens de RNAi (HUVENNE e SMAGGHE, 2010; BURAND e HUNTER, 2013), e a expressão de diferentes genes de IPs em uma mesma planta

transgênica, técnica conhecida como piramidação de plantas (SENTHILKUMAR *et al.*, 2010), as quais têm contribuído no desafio de entender e contornar os efeitos adaptativos das pragas.

O uso de técnicas voltadas ao estudo do transcriptoma, como aquelas baseadas na construção de bibliotecas de cDNA e microarranjos, apesar de revelarem enorme quantidade de informação a respeito de genes codificantes de proteínas, não permitem determinar se os genes são de fato traduzidos para proteínas, pois sua formação pode ser modulada por efeitos pós-traducionais (PAUCHET *et al.*, 2008). Em função disso, a proteômica mostra-se uma eficiente ferramenta para o estudo de expressão das proteínas de um tecido, além de permitir indicar níveis de expressão que determinem escala de atividades mais relevantes (ZOU, Z. *et al.*, 2008), gerando assim informações valiosas para um profundo entendimento, que pode ser aproveitado para pesquisas envolvendo engenharia genética.

Richardson *et al.* (1986) caracterizaram o ApTI como um inibidor de Kunitz multifuncional presente nas sementes brasileiras de Carolina (*Adenantha pavonina* L.). Além disso, ensaios *in vivo* em dieta artificial demonstraram que o ApTI é eficiente no controle de *Diatraea saccharalis*, inseto especialista também conhecido como broca-da-cana (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, estes estudos avaliaram o efeito do inibidor apenas sobre o desenvolvimento larval, não levando em conta seus efeitos sobre pupas, adultos e sobre a próxima geração de insetos. Neste contexto, procuramos investigar o efeito de ApTI sobre gerações consecutivas de *D. saccharalis*.

*Spodoptera frugiperda*, conhecida como a lagarta-do-cartucho, é um inseto praga generalista que ataca diversas culturas, destacando-se milho e arroz (LWALABA *et al.*, 2010). Na ausência de informações sobre as respostas adaptativas de *S. frugiperda* a

inibidores de peptidases do tipo Kunitz, recentemente, nosso grupo descreveu o mecanismo de adaptação de *S. frugiperda* para IPs envolve a transcrição de genes de tripsinas e quimotripsinas (OLIVEIRA *et al.*, 2013), mas até o momento não existe o estudo da correlação entre o aumento dos níveis destes transcritos e a efetiva tradução para esta espécie.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ApTI sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, sob os pontos de vista bioquímicos e de proteômica.



## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 - *Pragas agrícolas*

Consideram-se pragas os insetos fitófagos capazes de provocar danos com importância econômica. Quanto a sua biologia, estes são classificados em generalistas e especialistas (BERNAYS e CHAPMAN, 1994). Insetos generalistas alimentam-se de uma ampla variedade de espécies de plantas e seus mecanismos adaptativos são complexos, pois tendem a responder a diferentes substâncias químicas e proteínas de plantas (RAMOS *et al.*, 2008). Entretanto, insetos especialistas hospedam-se em poucas espécies de plantas e apresentam eficiente forma de adaptação, envolvendo a produção de grandes quantidades de enzimas para desintoxicação de seu alimento, ou ainda mecanismos de reservas das toxinas da planta hospedeira (PRICE, 1997; PATANKAR *et al.*, 2001).

Perdas na produtividade agrícola decorrente de insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, ocorrem mesmo com o uso extensivo de agroquímicos e, na ausência de tais medidas de proteção, as perdas seriam ainda maiores. Segundo Lawrence e Koudal *et al.* (2002) as perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e patógenos chegariam a 70% sem o uso de inseticidas.

Insetos pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera são os principais responsáveis pelos prejuízos no campo e no armazenamento de alimentos. Os coleópteros da família Bruchidae apresentam uma importância maior em relação à infestação de feijões (SINGH *et al.*, 1985). Os insetos pertencentes à ordem Lepidoptera são um dos mais importantes grupos de pragas no mundo, atacando frequentemente uma ampla variedade de culturas (DUNSE *et al.*, 2010). Esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, os quais não podem

consumir materiais sólidos. Dessa maneira os danos são ocasionados pelas larvas, as quais possuem aparato mastigador (VOLPICELLA *et al.*, 2003). Entre as espécies responsáveis por enormes prejuízos em culturas economicamente importantes, destacamos a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1994) e a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797).

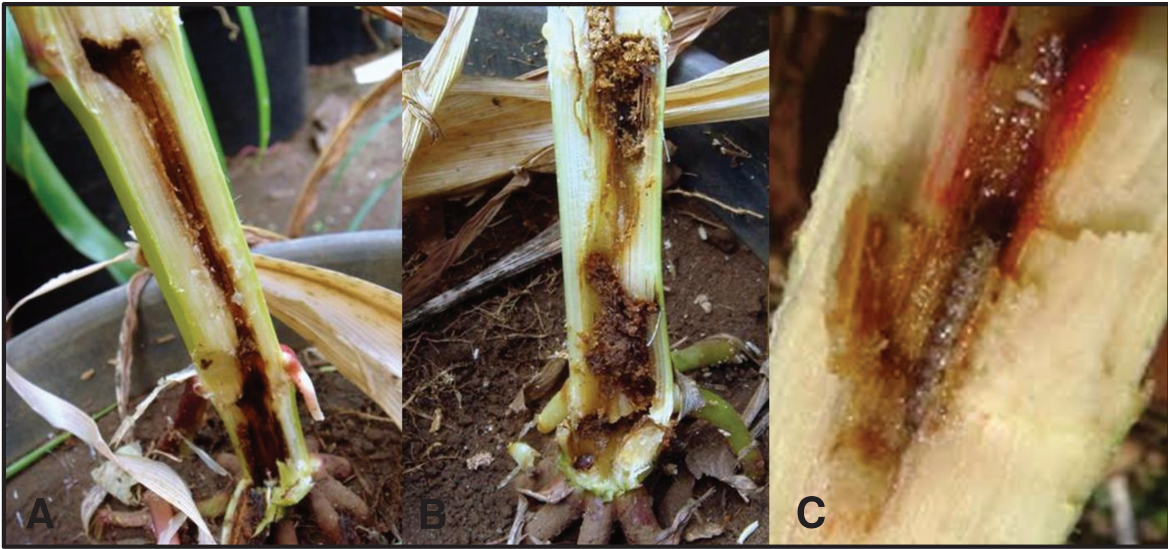
### **1.1 - A produção da cana-de-açúcar no Brasil e os danos provocados por *Diatraea saccharalis***

A cana-de-açúcar é uma planta perene que apresenta metabolismo C4, características que a torna a mais produtiva entre as plantas cultivadas no Brasil. Seu cultivo é predominante em países de clima tropical e subtropical. O Brasil é atualmente, o maior produtor mundial de alguns derivados da cana-de-açúcar, como açúcar e álcool (SIQUEIRA, 2011), e o mais competitivo produtor de bioetanol no mundo, com um mercado interno bem desenvolvido e cada vez mais estimulado pela indústria (IBETO *et al.*, 2011).

No Brasil, *D. saccharalis* é uma praga que causa danos consideráveis ao agronegócio sucroalcooleiro. O controle da broca-da-cana é difícil devido ao seu hábito críptico. As fêmeas depositam seus ovos na face abaxial das folhas. Após eclodirem, as larvas neonatas alimentam-se do parênquima, convergindo a seguir para a bainha das folhas, penetrando nas gemas laterais e abrindo galerias dentro do colmo onde completam seu desenvolvimento larval (MEDEIROS, 2008). O ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias (Figura 2) e, dependendo das condições climáticas, podem ter até cinco gerações anuais (GALLO *et al.*, 2002).

Os prejuízos ocasionados por *D. saccharalis*, são classificados como diretos e indiretos. Os danos diretos gerados pelas lagartas são decorrentes da abertura de galerias no interior dos colmos (Figura 1A, B e C). Tais galerias resultam na perda de massa da cana e, conseqüentemente, perda de seu peso. A morte das gemas é outro fator negativo, sendo o dano neste caso, uma notável redução de plantas emergidas quando os colmos são usados no plantio de uma lavoura. Quando as galerias abertas são transversais ao colmo, seccionando-o, elas favorecem o tombamento da cana pela ação dos ventos. O enraizamento aéreo assim como as brotações laterais são distúrbios oriundos do ataque da broca, e em colmos jovens, a broca provoca o secamento dos ponteiros, também denominado “coração morto” (CAPELI, 2012).

A abertura dos colmos pela lagarta permite a entrada de microrganismos prejudiciais à cultura, como os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, agentes causadores da podridão-vermelha do colmo (Figura 1C). Estes microrganismos tornam-se excepcionalmente importantes quando o cultivo da cana-de-açúcar é destinado à produção de álcool por concorrerem com as leveduras no processo de fermentação. Sua ação causa a inversão da sacarose armazenada na planta, o que diminui a pureza do caldo gerando um menor rendimento do açúcar e do álcool. Tal fenômeno também é denominado “complexo broca-podridão” (GALLO *et al.*, 2002).



**Figura 1:** (A) e (B) Galerias formadas por *D. saccharalis* no interior do colmo da cana-de-açúcar; (C) podridão-vermelha do colmo causado por micro-organismos. **Fonte:** (A e B) Ivan Cruz - Embrapa Milho e Sorgo; (C) <http://www.jallesmachado.com.br>.

Assim, os inúmeros prejuízos causados pela broca da cana-de-açúcar encorajaram os cientistas de várias partes do mundo a incorporar as características de resistência a esse inseto nos programas de melhoramento de plantas, sendo a transgenia um dos métodos mais eficientes (POMPERMAYER *et al.*, 2001). A maior parte dos estudos de transgenia em cana-de-açúcar foi realizada utilizando genes da toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*. Plantas de cana-de-açúcar resistentes à *D. saccharalis* foram produzidas usando uma versão reconstruída de Cry1(A)b, e demonstraram alta resistência sobre condições de estufa e de campo (BRAGA *et al.*, 2003). Falco e Silva-Filho (2003) expressaram em cana-de-açúcar os inibidores de tripsina Kunitz e Bowman-Birk de soja, obtendo uma redução no crescimento das brocas-da-cana que se alimentaram das plantas transgênicas, mas sem aumento na mortalidade. Recentemente, RAMOS *et al.* (2013) desenvolveram uma variedade de cana-de-açúcar capaz de expressar um inibidor de tripsina de *Inga laurina*. A planta foi testada

contra *D. saccharalis*, sendo observada uma redução no peso médio das larvas alimentadas com folhas da planta transgênica.



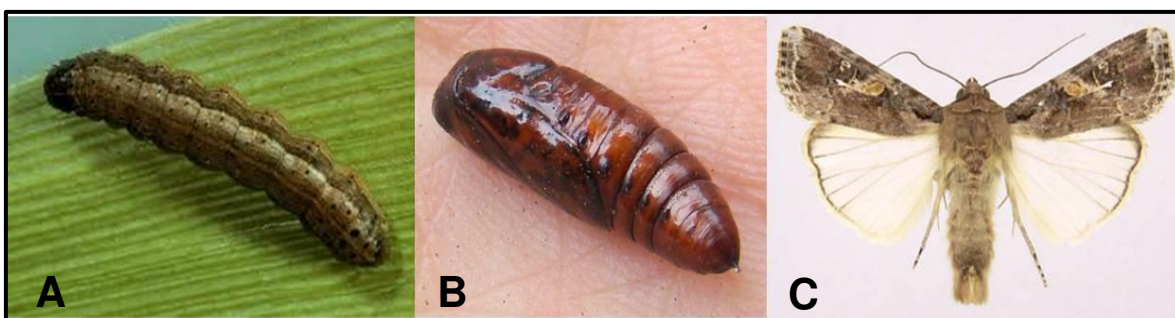
**Figura 2:** *Diatraea saccharalis*. (A) Larva (B) Pupas (C) Adultos. **Fonte:** (A) John Capinera University of Flórida - USA; (B) Lays Cordeiro Guimarães - Unicamp; (C) Ivan Cruz - Embrapa Milho e Sorgo.

### **1.2 - *Spodoptera frugiperda* e os danos provocados no agronegócio**

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto generalista que se alimenta de muitas espécies vegetais, e cujas larvas podem desfolhar culturas economicamente importantes, gerando níveis elevados de perdas agrícolas. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2007) (Figura 3). Conseqüentemente, a introgressão de resistência à pragas em culturas é uma das principais prioridades para os biotecnologistas de plantas contra esta praga em particular (FAN e GUO-JIANG, 2005).

As larvas de *S. frugiperda* possuem notável capacidade de adaptar-se à presença de diferentes IPs em suas dietas (PAULILLO *et al.*, 2000; BRIOSCHI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os primeiros estudos relatando a adaptação da lagarta-do-cartucho a inibidores de sementes de soja foram descritos por PAULILLO *et al.* (2000). Estes autores demonstraram que este mecanismo envolve a modificação do perfil enzimático das larvas alimentadas. Mais tarde, o mesmo grupo descreveu que a presença do inibidor Bowman-Birk de soja, em dieta artificial, leva a transcrição diferencial de genes de tripsinas e quimotripsinas, e estas

enzimas são responsáveis pela resposta adaptativa (BRIOSCHI *et al.*, 2007). Recentemente, nosso grupo descreveu um aumento do nível de expressão dos mesmos genes de tripsinas e quimotripsinas durante a adaptação de *S. frugiperda* contra um inibidor Kunitz, purificado a partir de sementes de *Entada acaciifolia* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Devido à similaridade no padrão das respostas adaptativas desencadeadas por inibidores de diferentes famílias, hipotetizamos que as mesmas enzimas sejam responsáveis pela adaptação contra inibidores Kunitz e Bowman-Birk. Até o momento, nenhum relato de estudo de proteômica avaliando o efeito de IPs no mecanismo de adaptação de *S. frugiperda* foi publicado.



**Figura 3:** *Spodoptera frugiperda*. (A) Larva; (B) Pupa; (C) Adulto. **Fonte:** (A) [www.sel.barc.usda.gov](http://www.sel.barc.usda.gov) (B) <http://bugguide.net/node/view/470121/bgimage> (C) [http://en.wikipedia.org/wiki/Fall\\_armyworm](http://en.wikipedia.org/wiki/Fall_armyworm).

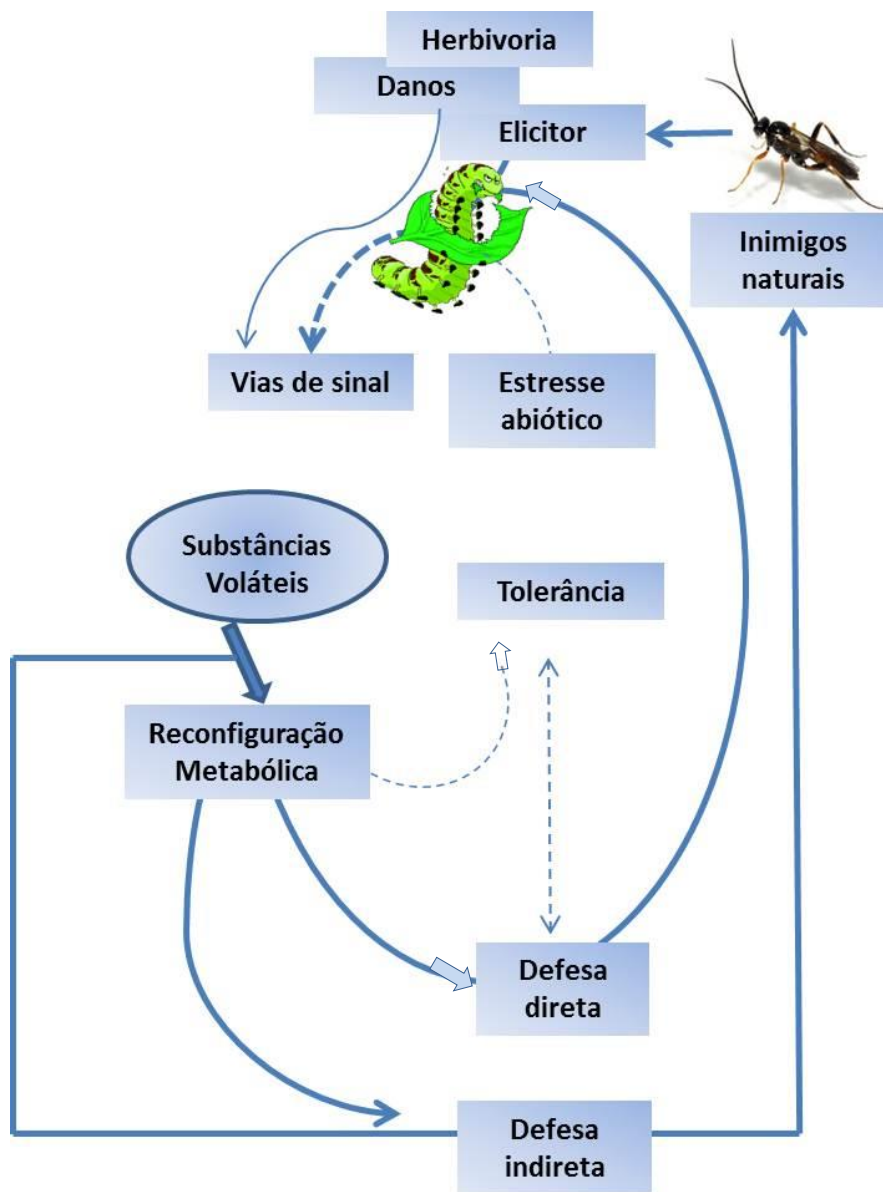
## **2 - Mecanismos de proteção das plantas contra os insetos**

Ao longo da coevolução entre insetos e plantas, estratégias defensivas foram selecionadas para detectar o ataque de patógenos e insetos nas plantas (DANGL e JONES, 2001; JAMAL *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2012).

As plantas são expostas a uma grande variedade de estresses. A herbivoria, considerada um tipo de estresse biótico, afeta negativamente a produtividade de diferentes tipos de cultura (SHARMA *et al.*, 2009). Ao longo da co-evolução entre insetos e plantas,

estas desenvolveram vários mecanismos de defesa, que incluem barreiras físicas e químicas, bem como as defesas constitutivas e induzidas em resposta aos primeiros sinais de injúrias (KESSLER e BALDWIN, 2002; WAR *et al.*, 2011).

Podem-se dividir as defesas vegetais em duas classes: diretas e indiretas (Figura 4). A defesa direta é composta por barreiras morfológicas, físicas ou químicas, tais como a lignificação da parede celular, deposição de sílica, tricomas, além da síntese de produtos químicos tóxicos, dentre eles alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos (RASMANN e AGRAWAL, 2009; SHARMA *et al.*, 2009; AGRAWAL, 2011). As defesas indiretas são compostas por mecanismos de atração de inimigos naturais (parasitoides e predadores) que facilitam o controle da herbivoria. Este tipo de defesa é mediado pela liberação de compostos voláteis sintetizados pelas plantas sobre ataque. Estes compostos servem também para eliciar em plantas próximas a síntese de compostos de defesa (KARBAN *et al.*, 2000; KESSLER e BALDWIN, 2001; ARIMURA *et al.*, 2009; RASMANN e AGRAWAL, 2009).



**Figura 4:** Esquema da resistência de plantas induzidas por artrópodes, adaptado de (KESSLER e BALDWIN, 2002). Um herbívoro ataca e fere a planta e aplica ou injeta elicitores. O ferimento e os elicitores específicos do herbívoro em combinação com estresse abiótico alteram a expressão de várias vias de sinalização. Essas cascatas de sinalização interagem (vias correlacionadas) com a produção direta de sinais voláteis que funcionam como defesas indiretas, ou levemente causam uma reconfiguração metabólica junto com a expressão de genes relacionados à defesa. Como consequência dessas mudanças, recursos são alocados para aumentar (tolerância) ou para produzir compostos que atuam diretamente sobre os herbívoros que atacam a planta (defesas diretas: compostos tóxicos, antinutritivos, e antigestivos), ou indiretamente (defesas indiretas), por meio da atração de inimigos naturais.



## **2.1 - Inibidores de peptidases**

Os inibidores de peptidases (IPs) são proteínas relacionadas à defesa que são massivamente acumuladas em tecidos susceptíveis a ataques, como sementes, tubérculos, folhas e flores (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; CHRISTELLER, 2005; JAMAL *et al.*, 2012). Tradicionalmente acreditava-se que estas proteínas eram restritas à família Fabaceae e Solanaceae. No entanto, estudos recentes apontaram a presença de IPs em outras famílias e ordens de plantas (TORRES-CASTILLO *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos IPs é um assunto de intensa investigação (GREENBLATT *et al.*, 1989). As informações disponíveis, obtidas através de experimentos *in vitro* e *in vivo* com animais, plantas, microrganismos e vírus, têm contribuído para as aplicações práticas dos IPs na medicina e agricultura (JAMAL *et al.*, 2012).

Em relação aos inibidores vegetais, o mecanismo de ação segue a descrição feita por Michael Laskowski Jr. (LASKOWSKI JR, 1986; RYAN, 1990; LASKOWSKI JR e QASIM, 2000; JAMAL *et al.*, 2012). Em sua grande maioria, são inibidores competitivos e específicos para as diferentes famílias de peptidases. Os diferentes inibidores são agrupados em famílias, sendo as famílias Kunitz e Bowman-Birk as mais estudadas e melhores caracterizadas. Essas famílias diferem principalmente na massa molecular, conteúdo de ligações dissulfetos, estruturas tridimensionais, estabilidade ao calor e aos agentes desnaturantes (TELES *et al.*, 2004).

Os inibidores da família Bowman-Birk são proteínas de 8-10 kDa, com um elevado teor de cisteína e dois sítios reativos, específicos para tripsinas e quimotripsinas. Os inibidores da família Kunitz são proteínas de 18-22 kDa, com baixo conteúdo de cisteína e apresentam um único sítio reativo para tripsina (KOIDE e IKENAKA, 1973; LEHLE *et al.*, 1994).

Os IPs possuem papel negativo no desenvolvimento de insetos, pois, atuam diretamente em aminoácidos que são essenciais nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução (MOREIRA, 2007; PÉREZ-HEDO *et al.*, 2013). Esses aminoácidos essenciais são obtidos de uma dieta proteica e, para isso, os insetos aparentemente alimentam-se de todos os compostos orgânicos, de madeira a folhas, flores, raízes, túberos, néctar e sementes das plantas (MURDOCK e SHADE, 2002; DA SILVA FORTUNATO *et al.*, 2007). Para digerir essas proteínas alimentares, os insetos utilizam peptidases as quais são secretadas para no lúmen do intestino (INANAGA *et al.*, 2001; GIRI *et al.*, 2003; BHATTACHARYYA *et al.*, 2007; LIAO *et al.*, 2007). Por esta razão, os inibidores atuam como importante mecanismo de defesa das plantas, inibindo a ação das peptidases digestivas do intestino médio de pragas lepidópteras, impossibilitando-as de digerir e absorver nutrientes para sua sobrevivência, retardando seu crescimento, desenvolvimento, reprodução e, eventualmente, morte por inanição (GIRI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Outra evidência sugere que os IPs afetam o desenvolvimento de forma indireta, por meio de um mecanismo conhecido como “feedback”, que induz a uma hiperprodução de peptidases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis (BROADWAY, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

## **2.2 - Peptidases de insetos**

Os insetos geralmente têm um amplo espectro de peptidases digestivas que são espacialmente e temporalmente expressas no intestino médio (TERRA e FERREIRA, 1994; VINOKUROV *et al.*, 2006). Peptidases digestivas catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos das proteínas da dieta e são encontrados mais abundantemente na região do

intestino médio do aparelho digestivo dos insetos. As peptidases são subdivididas em endopeptidases, responsáveis pela clivagem de proteínas em peptídeos e exopeptidases, por meio da remoção de aminoácidos da região C- ou N-terminal dos peptídeos formados (JONGSMA e BOLTER, 1997).

Dentre as famílias de peptidases, as serinopeptidases merecem uma posição de destaque, uma vez que são abundantes entre diferentes ordens e majoritariamente presentes em lepidópteros (TERRA e FERREIRA, 1994). Dentre as serinopeptidases, as enzimas do tipo tripsina clivam cadeias proteicas, preferencialmente, na região carboxi-terminal de aminoácidos básicos como lisina ou arginina. A especificidade das tripsinas de insetos contrasta em algumas características com aquelas dos vertebrados (LEMOS & TERRA, 1992; JOHNSTON *et al.*, 1995). As tripsinas dos insetos não necessitam da presença de íons cálcio para serem ativadas ou estabilizadas, ao contrário dos vertebrados. As enzimas do tipo quimotripsina, clivam cadeias proteicas, preferencialmente, em aminoácidos aromáticos, na região carboxi-terminal. Assim, para as estratégias de controle à base de agentes biológicos, tais como IPs e outras proteínas, o conhecimento da composição relativa, organização e funcionamento de todo componente de peptidases digestivas dos insetos é essencial, sendo uma maneira de disponibilizar novas estratégias de proteção a plantas cultivadas (JONGSMA *et al.*, 1996; HILDER e BOULTER, 1999; VINOKUROV *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A sequência primária do inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI) foi publicada por Richardson *et al.* (1986), caracterizando-o como um inibidor do tipo Kunitz multifuncional que inibe de forma não competitiva enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e papaína (MIGLIOLO *et al.*, 2010). O ApTI apresenta uma cadeia polipeptídica de 138 aminoácidos e massa molecular relativa de 21 kDa (RICHARDSON *et al.*, 1986;

MACEDO *et al.*, 2004). Recentemente, nosso grupo demonstrou que ApTI possui uma forte atividade inibitória contra as tripsina da broca da cana-de-açúcar (SILVA *et al.*, 2012).

### **3 - Adaptações dos insetos aos inibidores de peptidases**

Ao longo dos anos, muitos trabalhos demonstraram a utilização de IPs como estratégia eficiente no controle de pragas (BOWN *et al.*, 1997; MACEDO *et al.*, 2004; FAN e GUO-JIANG, 2005; MACEDO *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2012). Entretanto, desde o início da década de 90, vários relatos demonstraram que um mesmo IP era capaz de produzir efeitos diferentes em diferentes insetos (BROADWAY, 1995).

JONGSMA *et al.* (1995) relataram que *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), também conhecida como lagarta da beterraba, é capaz de produzir enzimas resistentes ao inibidor de peptidases de batata II (PI2), através de estudos realizados em tabaco transgênico. A atividade da tripsina sofreu uma diminuição de 76% em insetos não expostos à PI2, e de 6-22% em insetos cronicamente alimentados com PI2.

Outro estudo avaliou o desempenho de outra espécie do gênero *Spodoptera*, *S. litoralis*, em tabaco transgênico expressando inibidor de tripsina de mostarda 2 (MTI-2), em diferentes níveis (DE LEO *et al.*, 1998). Nos bioensaios, os autores criaram as larvas em plantas que expressavam altos ou baixos níveis do inibidor MTI-2. Efeitos deletérios foram relatados para o grupo alimentado com níveis mais elevados de MTI-2, incluindo uma diminuição no consumo foliar. No entanto, larvas de *S. litoralis* alimentadas em tabaco expressando menores taxas de MTI-2 apresentaram o resultado oposto: as larvas tiveram um desenvolvimento mais rápido, um peso maior e consumo foliar maior. Diferentes resultados foram relatados por JONGSMA *et al.* (1995). Estes autores concluíram que as enzimas

induzidas em resposta a MTI-2 ainda eram sensíveis. Em outras palavras, a adaptação aos baixos níveis de MTI-2 consiste em um aumento exacerbado na produção de peptidases sensíveis.

GIRARD *et al.* (1998) estudaram o mecanismo de adaptação de insetos coleópteros. A cultura de sementes oleaginosas (*Brassica napus* L.) de importância internacional, é atacada por muitas espécies de insetos. Especialmente na Europa, este cultivo é mantido, devido à alta demanda por óleo e proteína para alimentação animal. Neste estudo eles avaliaram o efeito de inibidores de duas classes distintas, um IP de cisteíno-peptidases (Orizacistatina I ou OCI) e um IP serino-peptidases (Inibidor Bowman-Birk de soja ou SBBI), sobre o desenvolvimento de *Phaedon cochleariae* (Coleoptera: Chrysomelidae), inseto modelo utilizado em estudos com plantas crucíferas. Discos foliares que continham ambos os inibidores foram oferecidas para larvas de *P. cochleariae*. Os autores concluíram que não foram observados efeitos sobre o desenvolvimento larval e a emergência dos adultos para o grupo alimentado com ambos os inibidores. Usando ensaios de digestão *in vitro* os autores demonstraram que as serinopeptidases e as leucino-aminopeptidases mediarão a clivagem de SBBI e OCI, permitindo que a *P. cochleariae* se alimentasse de tecidos vegetais contendo IPs.

Um exemplo, que apresenta, diferentes efeitos dos IPs contra um mesmo inseto foi estudado por MACHADO *et al.* (2013), com o inseto modelo *Anagasta kuehniella*. Este inseto, também é conhecido como traça farinha do Mediterrâneo. *A. kuehniella* ataca grãos armazenados, frutas, nozes e outros produtos. Vários IPs tiveram seus efeitos avaliados contra *A. kuehniella* mostrando resultados positivos (MACEDO *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2010). No entanto, resultados diferentes foram obtidos com inibidor Kunitz de *Acacia polyphylla* (AcKI), recentemente descrito (MACHADO *et al.*, 2013). O efeito

de AcKI no desenvolvimento de *A. kuehniella* foi medido em três estágios diferentes. Uma tendência observada em larvas alimentadas em dieta controle foi a redução da atividade enzimática de terceiro ao quinto instar. No entanto, esse padrão foi oposto em larvas alimentados com AcKI. Ambas as atividades de tripsina e quimotripsina apresentaram um aumento de 2 vezes, o que sugere que o aumento da atividade enzimática ocorre para compensar os efeitos inibitórios de AcKI. Além disso, as serinopeptidases no quinto instar tornou-se resistentes à inibição. Os autores sugeriram que o gasto energético relacionado com a síntese de enzimas esta relacionado à redução do peso das larvas de quinto instar, de cerca de 43 % em relação ao controle. Os autores reforçam a necessidade da triagem de IPs contra insetos, a fim de encontrar candidatos com altos efeitos inseticidas.

Considerando estas respostas, a eficácia de IPs contra um determinado inseto está relacionada ao seu nível de síntese na planta, sua atividade em relação às peptidases do inseto e a capacidade do inseto alvo em superar seus efeitos deletérios (DE LEO *et al.*, 2001). Apesar dos IPs não apresentarem a mesma eficiência para todos os insetos, BALDWIN e PRESTON (1999) propuseram que eles são eficientes e participam da defesa direta das plantas, mas a eficiência desta defesa depende de um conjunto de fatores abióticos e de outros componentes de defesa secundários (produção de metabólitos).

#### **4 - Utilização de inibidores de peptidases no controle biológico de insetos-praga**

Os estudos dos efeitos de inibidores de peptidases adicionados à dieta de insetos iniciaram na década de 50, quando LIPKE *et al.* (1954) demonstraram que inibidores de tripsina de soja inibiam o crescimento e a atividade proteolítica *in vitro* de besouros da espécie *Tribolium confusum*. Um marco na utilização de IPs foi um trabalho pioneiro publicado por GREEN *et al.* (1972), demonstrando a identificação de IPs como produtos de

resposta à injúrias relacionados com a herbivoria. Essas descobertas foram fundamentais para focar a atenção sobre IPs como compostos de defesa de plantas. RAMOS *et al.* (2009) reportaram que larvas de *Anagasta kuehniella* alimentadas em dietas artificiais contendo 0,7% (p/p) do inibidor de tripsina presente em sementes de *Plathymenia foliolosa* causavam efeito antinutricional nestes insetos. Os autores observaram a redução significativa na sobrevivência e no peso larval. MACEDO *et al.* (2010) também observaram que o efeito do inibidor de peptidases de sementes de *Adenantha pavonina* incorporados em dietas artificiais na concentração de 1,0% (p/p) causou uma redução de 50% no peso e na sobrevivência larval de *Anagasta kuehniella*. POMPERMAYER *et al.* (2001) avaliaram as propriedades antimetabólicas do inibidor de tripsina de soja (SPI) em relação às larvas de *Diatraea saccharalis*. A adição de 0,5% (p/p) deste inibidor em dieta levou a um atraso no desenvolvimento das larvas, redução na taxa de crescimento e aumento dos estágios larvais associados à diminuição da longevidade das fêmeas.

Os estudos com inibidores de peptidases não se limitaram apenas ao seu uso em experimentos com dietas artificiais. A geração de plantas geneticamente modificadas expressando IPs trouxe importantes avanços científicos, permitindo a obtenção de plantas resistentes a diversos tipos de pragas (HILDER *et al.*, 1987; FAN e GUO-JIANG, 2005; CUI *et al.*, 2011). A introdução de genes de proteínas entomotóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foi considerada uma história de sucesso para a biotecnologia de plantas (ANDREWS *et al.*, 1987; GATEHOUSE, 2011). As culturas expressando genes *bt* obtiveram um sucesso comercial com um amplo uso na agricultura global e desta maneira, contribuíram para a redução no uso de pesticidas, com benefícios concomitantes para o meio ambiente e a saúde humana (TOENNIESSEN *et al.*, 2003). Entretanto, por se tratarem de genes pertencentes às bactérias, que costumam ser frequentemente associadas com diversas

doenças humanas, parte da sociedade passou a rejeitar o consumo das plantas transgênicas (MOHAN BABU *et al.*, 2003). Desta forma, a inserção de genes de IPs em plantas é explorada por se tratar da transferência de um gene de defesa de uma espécie de planta para outra (BOULTER, 1993; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

As primeiras experiências com plantas transgênicas expressando inibidores foram realizados com um inibidor de peptidases do tipo Bowman-Birk presentes em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*; CPTI). Este inibidor foi identificado como um possível fator de resistência do feijão-caupi contra o bruquídeo, *Callosobruchus maculatus* (GATEHOUSE *et al.*, 1979). Depois de isolado, CPTI foi transferido para plantas de tabaco com a expectativa de que o inibidor fosse eficaz contra pragas que atacam a espécie, uma vez que o CPTI diferia dos inibidores expressos no tabaco (HILDER *et al.*, 1987). Após este estudo de sucesso, muitos outros IPs de diversas espécies vegetais foram estudados e empregados na transformação de plantas. Na revisão de FAN & WU (2005) são apresentados mais de 50 trabalhos de plantas transgênicas expressando genes de IPs que conferem resistência contra diversas espécies de insetos. Embora não sejam comercializáveis, foi também comprovado que plantas transgênicas expressando IPs transferem os genes para outras gerações.

## **5 - Proteômica e espectrometria de massas**

A proteômica é uma técnica baseada no conceito de que o proteoma corresponde ao conjunto completo de proteínas produzidas por uma célula ou organismo sob uma condição particular (WILKINS *et al.*, 1996). Com isso, a proteômica ganhou destaque e evoluiu rapidamente, permitindo estudar diferentes organismos e medir suas respostas perante mudanças naturais ou induzidas em um determinado ambiente (BANTSCHOFF *et al.*, 2007).



Um grande marco que revolucionou o estudo da proteômica ocorreu na década de 90, com a introdução das técnicas de ionização por eletrospray (ESI), e ionização e dessorção a laser auxiliado por matriz (MALDI) na espectrometria de massas (ANDERSEN e MANN, 2000). A espectrometria de massas é uma técnica analítica aplicável à identificação de compostos desconhecidos, em concentrações baixas e em misturas quimicamente complexas. Esta técnica desempenhou o importante papel no estudo dos processos bioquímicos relacionados à síntese de proteínas porque permite tanto a detecção e determinação de uma estrutura molecular, bem como sua quantificação (BALDWIN, 1995; HOPFGARTNER e VARESIO, 2012).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, o separador ou filtro de massas e o detector. Embora existam várias maneiras para separação e detecção, a etapa de ionização é a que apresenta o maior número de diferentes estratégias. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas contendo espécies voláteis ou não e, com interesses voltados desde, a análise elementar até a composição de proteínas requerem diferentes processos de ionização (MORAES e DO LAGO, 2003; ZUBAREV e MAKAROV, 2013).

Assim que os íons são gerados, os processos de separação e detecção são escolhidos de acordo com as características mais ou menos comuns como sensibilidade, resolução e precisão de  $m/z$  (massa/carga) e custo (SILVERSTEIN, 2000; GRAVES e HAYSTEAD, 2002; MORAES e DO LAGO, 2003).

Os métodos de quantificação que utilizam fluoróforos, corantes, ou radioatividade apresentam boa sensibilidade e linearidade, porém, possuem limitações: primeiro, requerem separação de proteínas de alta resolução normalmente fornecido pelos géis 2D, o que limita a sua aplicabilidade para proteínas abundantes e solúveis e, segundo, não permitem revelar

as proteínas que são subjacentes às identificadas. Entretanto, esses problemas são superados pelas modernas técnicas LC-MS/MS que, embora mais eficientes, possuem um custo elevado (BANTSCHIEFF *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; KALLI *et al.*, 2013).

O sucesso dos métodos de ionização MALDI e ESI e o desenvolvimento de analisadores de massa em sequência (tandem) levaram a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta obrigatória nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas (KALLI *et al.*, 2013). Os espectrômetros de massa atuais permitem selecionar uma única molécula ionizada, fragmentá-la e, através da análise das massas dos fragmentos, identificar a estrutura da molécula original. A partir disso, é possível determinar, por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração química específica em algum resíduo de aminoácidos (STEEN e MANN, 2004).

Existem diversos tipos de analisadores de massas comercialmente disponíveis tais como: time-of-flight (TOF), Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), Ion Trap e Orbitrap, cada um deles tendo seus aspectos positivos e negativos, sendo relacionados com os experimentos planejados e os resultados experimentais desejados (KALLI *et al.*, 2013). Estes analisadores são usados isoladamente ou em conjunto, acoplando-os para organizar os equipamentos classificados como híbridos, usando vantagens inerentes a cada um. Um exemplo de equipamento híbrido largamente utilizado na atualidade é o *Thermo Scientific Velos Orbitrap Pro hybrid MS (Thermo Fisher Scientific)*. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (tandem) sejam realizados para detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Uma vez fragmentados, os íons são detectados por eletro multiplicadores que constituem os detectores mais largamente usados (CANTÚ *et al.*, 2008; VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

### **5.1 - Proteômica no estudo de interação inseto-planta**

Em larvas de lepidópteros, o intestino é o órgão que executa a maior parte da digestão e absorção de nutrientes, que em geral ocorre com um pH elevado (TERRA e FERREIRA, 1994). O lúmen do intestino médio é um ambiente desfavorável para proteínas, isto resulta da função primária deste compartimento, tal como um local de digestão. No entanto, as próprias enzimas digestivas dos insetos e as moléculas de defesa, operam neste ambiente desafiador. Dessa maneira, os estudos sobre a expressão de genes e síntese de proteínas que são expressos no intestino médio dos insetos facilitam a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de estratégias de controle ambiental benignos contra as pragas (PAUCHET *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010). Para tanto, diversas técnicas foram aprimoradas ao longo dos estudos, dentre estas a proteômica recebe um lugar de destaque.

As pesquisas utilizando técnicas de proteômica no estudo de insetos-praga são recentes e algumas das primeiras estratégias foram descritas para o estudo de interações e resistência de insetos à proteínas *Bt*. MCNALL e ADANG (2003) descreveram uma actina e uma fosfatase alcalina (mALP) de membrana relacionadas a toxina Cry1Ac no proteoma do intestino médio de lagartas de *Manduca sexta*. Em lagartas de *Plodia interpunctella*, suscetíveis aos genes *Bt*, foram detectadas proteínas diferencialmente expressas que são resistentes e suscetíveis ao *Bt*, revelando que nas larvas resistentes ocorre um aumento de expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo, e ao decréscimo nos níveis de quimotripsina alcalina, reduzindo a capacidade de ativação de protoxinas (CANDAS *et al.*, 2003).

Em outro trabalho, PAUCHET *et al.* (2008) utilizaram eletroforese 2D e espectrometria de massas para identificar as proteínas do intestino médio de lagartas de *Helicoverpa*

*armigera*, uma praga conhecida por ser generalista. Foram encontradas inúmeras enzimas responsáveis por digestão de carboidratos, proteínas e lipídios, proteínas com domínios de reconhecimento de patógenos e argininas quinases, além de um grande número de proteínas sem função descrita na literatura.

O transcriptoma e o proteoma do intestino de larvas de *Tribolium castaneum*, coleóptero praga de importância agrícola, foi estudado por MORRIS *et al.* (2009). A eletroforese 2D combinada à espectrometria de massas possibilitou a identificação de 37 proteínas diferencialmente expressas relacionadas ao metabolismo, anabolismo e catabolismo de quitina, que também foram identificadas por microarranjos. A utilização dessas duas técnicas, junto a dados bioquímicos prévios, permitiu entender melhor os processos biológicos naturais que estão relacionados ao sistema digestivo de tais insetos. Além disso, o estudo permitiu correlacionar moléculas relacionadas à suscetibilidade contra agentes patogênicos, como as bactérias do tipo *B. thuringiensis*.

Em outro trabalho envolvendo proteômica, foram avaliados os efeitos causados pelo uso de diferentes dietas no crescimento e desenvolvimento do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). ZHOU *et al.* (2008) investigaram o proteoma do intestino médio, hemolinfa, corpo e glândula sericígenas do inseto e identificaram 76 proteínas diferencialmente expressas pelo método de MALDI TOF/TOF. Foram identificadas proteínas de miosina, tropomiosina, profilina, serpina e glutathione peroxidase, relacionadas à digestão, absorção de nutrientes e manutenção. As descobertas sugerem que diferenças na composição de uma dieta alimentar podem influenciar diretamente no nível de expressão de proteínas produzidas no intestino médio de insetos.

NOGUEIRA *et al.* (2012) utilizando uma abordagem nanoLC-MS/MS observaram alterações significativas no proteoma do trato intestinal de *Callosobruchus maculatus* induzidas pela ingestão de cistatina. A estratégia proteômica resultou na identificação de 752 e 550 proteínas no epitélio e no fluido do intestino médio, respectivamente, e as análises quantitativas permitiram estabelecer diferenças relativas das proteínas identificadas. Proteínas relacionadas com a degradação da parede celular vegetal foram superexpressas. Inversamente, amilases foram menos expressas indicando que um aumento na digestão de hemicelulose ajudaria as larvas a lidarem com a ingestão de cistatina.

KONUS *et al.* (2013) utilizaram ferramentas proteômicas combinadas com ensaios de atividade enzimática para avaliar possíveis adaptações moleculares causadas por inseticidas piretroides em duas populações de *Helicoverpa armigera*, sendo que uma delas já havia sido exposta ao composto e outra não. Os resultados observados indicaram que *H. armigera* reage ao estresse provocado pelos piretróide através do aumento da expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo energético e que aumentos significativos da atividade enzimática sugere um aumento do metabolismo energético no tecido do intestino médio como pré-requisito geral para compensar os custos dos processos de detoxificação.

Devido as vantagens inerentes a técnica, propomos utilizar a abordagem proteômica em nosso trabalho para complementar os resultados bioquímicos obtidos, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação do inibidor de tripsina de sementes de *A. pavanina* (ApTI) sobre o desenvolvimento dos insetos-praga *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.



### III – OBJETIVOS

#### 1 - Geral

Estudar o efeito do inibidor de tripsina de sementes de *A. pavonina* (ApTI) no desenvolvimento de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, sobre os aspectos biológicos, bioquímicos e de proteômica. Para tanto, pretendeu-se:

#### 2 - Específicos

- a) Avaliar os efeitos bioquímicos da exposição aguda das larvas de *D. saccharalis* ao ApTI;
- b) Estudar o efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento de 2 gerações consecutivas (F0 e F1) de *D. saccharalis*;
- c) Avaliar o efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento larval de *S. frugiperda*;
- d) Obter a identificação, o sequenciamento e a quantificação de proteínas diferencialmente expressas nos fluidos intestinais de larvas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.



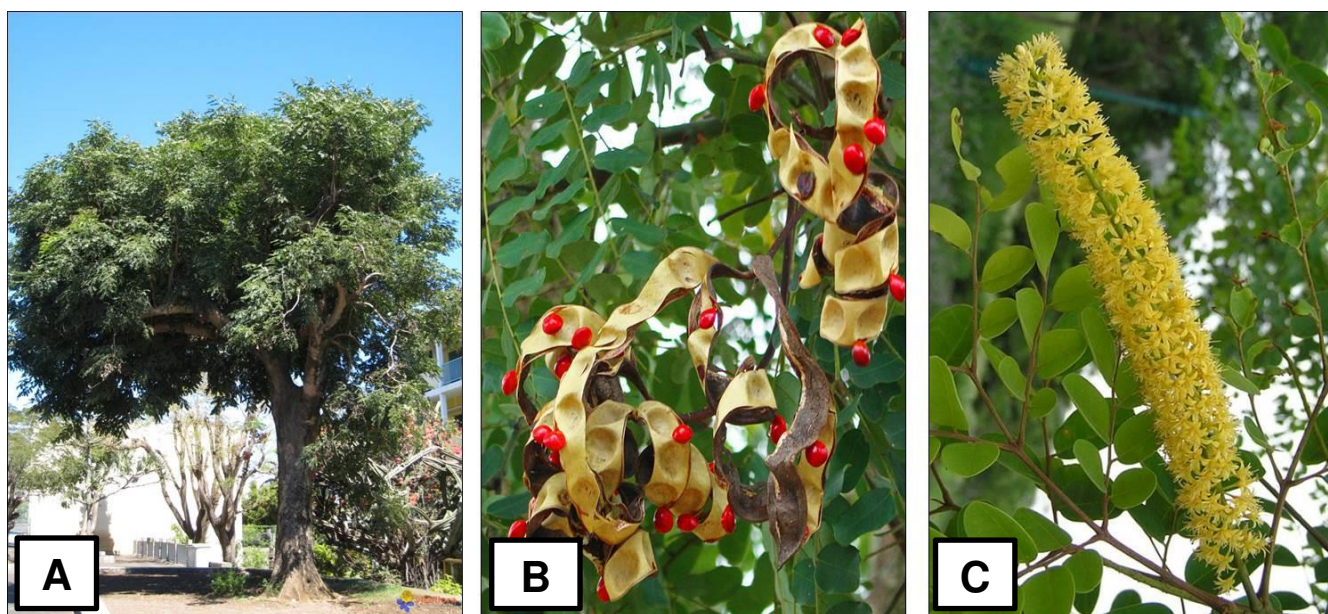


# CAPITULO I: Efeito do inibidor de tripsina ApTI no controle biológico de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*

## IV- MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 - Espécie vegetal

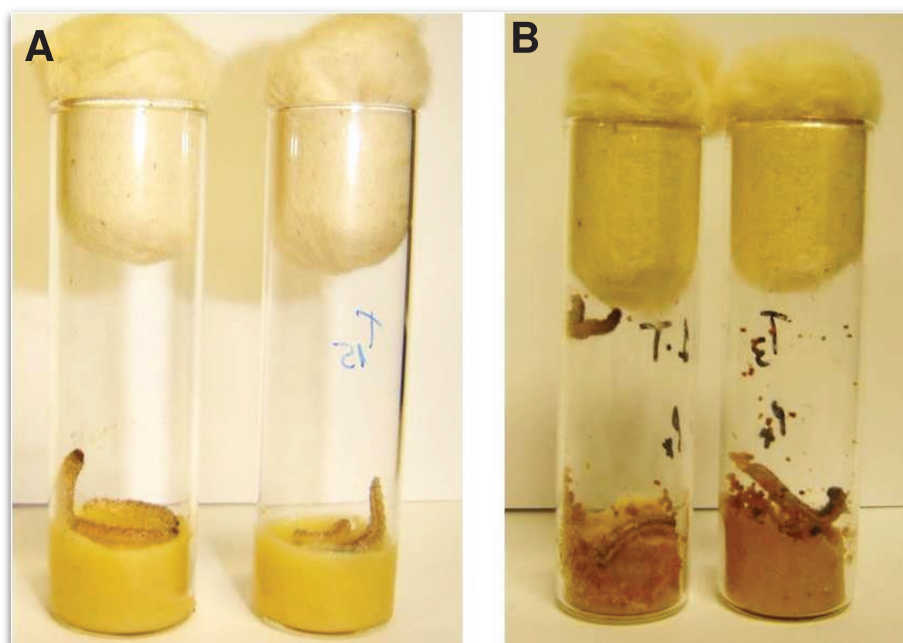
As sementes de *A. pavonina* L. (Fabaceae, Mimosoideae) (Figura 5), foram coletadas na cidade de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul (Brasil), após a coleta as sementes foram armazenadas em -20 °C e utilizada para a purificação do inibidor ApTI como descrito por RICHARDSON *et al.* (1986).



**Figura 5:** *Adenanthera pavonina*: (A) Árvore; (B) Frutos secos, sementes maduras e folhas; (C) Inflorescência, **Fonte:** (A) [www.clickmudas.com.br](http://www.clickmudas.com.br); (B) [www.jacarandamimoso.com.br](http://www.jacarandamimoso.com.br); (C) [www.rosesementes.com.br](http://www.rosesementes.com.br).

## 2 - Insetos

Os insetos *D. saccharalis* e *S. frugiperda* (Figura 6), foram cedidos pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de insetos, Departamento de Entomologia, ESALQ, Universidade de São Paulo, cidade de Piracicaba, SP. As colônias foram mantidas a  $25 \pm 1$  °C, UR de 65% e fotoperíodo de 12 h. A dieta artificial (Figura 6), foi composta por farinha de soja, sacarose, germe de trigo, ágar, complexo vitamínico, ácido ascórbico, sais de Wesson, cloreto de colina, e inibidores microbianos (PARRA e MIHSFELDT, 1992).



**Figura 6:** Tubos de incorporação contendo dieta artificial segundo (PARRA e MIHSFELDT, 1992); (A) Dieta artificial contendo larvas de *D. saccharalis* e (B) Dieta artificial contendo larvas de *S. frugiperda*.

## 3 - Isolamento do inibidor de tripsina de *A. pavanina* (ApTI)

As sementes de *A. panovina* sem tegumento foram moídas e peneiradas para obtenção de uma farinha de fina granulação, a qual foi submetida à delipidação com hexano. A farinha

delipidada foi submetida a uma extração proteica com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 01:10 (p/v), sob agitação constante “overnight” em temperatura de 4 °C. Após a extração, o material foi centrifugado a 10.000xg durante 30 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi separado e dialisado por um período de 24 h em água destilada à 4 °C e posteriormente liofilizado, o qual foi denominado de Extrato Bruto (EB).

A fração liofilizada (300 mg de EB) foi dissolvida em 2mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, contendo 0,1 M de NaCl, e aplicado a uma coluna Sephadex G-75 (2,6 x 80 cm) equilibrada previamente com o mesmo tampão, em um fluxo de 30 ml/h. A fração que apresentou atividade anti-tríptica na coluna G-75 (pico II ou PII) foi dialisada contra água destilada e liofilizada. Cinquenta miligramas (50mg) do PII obtido na G-75 foram equilibrados com tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,6, com 0,1 M de NaCl. A solução foi então aplicada em uma coluna de afinidade Sepharose-tripsina (2 x 10 cm), a qual foi equilibrada previamente com o mesmo tampão, em um fluxo de 30 ml/h. A detecção das proteínas eluídas com HCl 0,05 M foi feita em espectrofotômetro a 280 nm. A quantificação da proteína ApTI foi realizada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A fim de analisar a pureza do material proveniente da cromatografia em coluna Sepharose-tripsina, o ApTI foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18. O sistema cromatográfico empregado é o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B e um injetor automático de amostras U6K com um loop de 200 µL. A coluna utilizada é a µ-Bondapak C-18 (3,9 x 300 mm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Brevemente, 5mg de ApTI são dissolvidos em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e sonificado por 5 minutos. A solução obtida é centrifugada a 5.000 rpm durante 3 minutos para clarificação e o sobrenadante aplicado na coluna. As proteínas são eluídas utilizando-se um gradiente

descontínuo de tampão B (acetonitrila 66,5 %, TFA 0,1 %): 10 minutos com 0 % de tampão B, 6 minutos a 30 % de tampão B, 6 minutos a 40 % de tampão B, 6 minutos a 50 % de tampão e 10 minutos a 100 % de tampão B. O fluxo é mantido constante a 1 ml/min e monitorado a 280 nm. As frações obtidas foram imediatamente submetidas ao ensaio de atividade inibitória. O restante do material coletado foi imediatamente liofilizado e armazenado a -20 °C para a utilização posterior.

#### **4 - Bioensaios**

Para bioensaios com *D. saccharalis*, 3 larvas neonatas foram transferidas para tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) contendo aproximadamente 8 g de dieta artificial. Todos os experimentos foram realizados com 40 replicatas, totalizando um n= 120. Para o estudo da exposição do efeito agudo sobre atividade enzimática, foi incorporada uma concentração de 0,1% do ApTI na dieta dos insetos. O efeito crônico do ApTI foi avaliado em duas gerações consecutivas (F0 e F1), alimentando as larvas em dieta contendo 0,05% de ApTI.

Em relação a *S. frugiperda*, 2 larvas neonatas foram transferidas para tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) contendo aproximadamente 8 g da dieta artificial 0,5%. O experimento foi realizado com 20 replicatas, totalizando um n= 40. ApTI foi incorporado a 0,5% em dieta e as larvas foram alimentadas até o 4<sup>o</sup> ínstar larval.

#### 4.1 - Efeito agudo de ApTI em larvas de *D. saccharalis*

As larvas de *D. saccharalis* foram alimentadas em dieta controle até alcançarem o quarto ínstar. Em seguida, foram divididas em dois grupos: o primeiro foi mantido sob a dieta controle e o segundo grupo foi alimentado em dieta contendo 0,1% de ApTI durante 72 h. Posteriormente, metade das larvas de cada tratamento foi dissecada. O restante das larvas foi transferido mais uma vez para dieta controle por um período de 72 h, e também foram dissecadas (Figura 7).

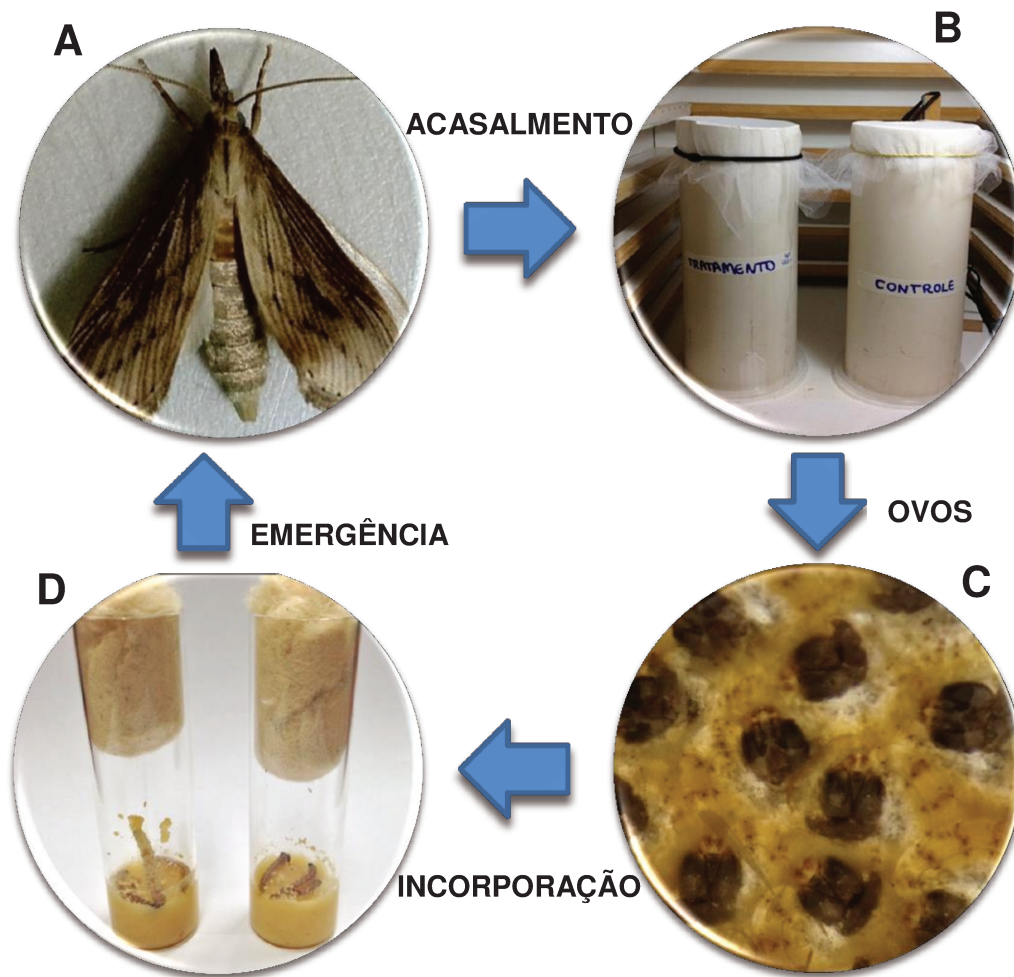


**Figura 7:** Esquema representativo da metodologia utilizada no efeito agudo de ApTI em larvas de *D. saccharalis*

#### 4.2 - Efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento *D. saccharalis*

Tubos contendo 0,05% de ApTI na dieta foram preparados e utilizados nos bioensaios. Para cada um deles foram preparadas 40 replicatas, totalizando 120 amostras para as 3 larvas neonatas consideradas (n= 120). Metade das larvas foram dissecadas no 4º instar e o

restante alimentadas até o estágio pupal. Neste momento, foram registrados o peso, viabilidade e o tempo de desenvolvimento larval. Em seguida, os insetos adultos tiveram sua taxa de emergência e fertilidade analisadas. Para tanto, 5 casais foram colocados para acasalar durante 7 dias em tubos de PVC (15 cm de diâmetro) revestidos com sulfite na presença de solução de mel 10% (Figura 8B). Os ovos depositados sobre o sulfite foram então contados manualmente usando um microscópio estereoscópico (Figura 8C). Os insetos alimentados em dieta contendo inibidor ApTI tiveram seus ovos coletados e após eclodirem, as larvas foram transferidas para dietas artificiais (Figura 8D), como descrito a seguir: Metade das larvas foi transferida para uma dieta controle e a outra metade foi transferida para dieta contendo ApTI a 0,05%. As larvas da geração F1 foram mantidas em suas respectivas dietas até alcançarem o 4º instar. O peso das larvas e as taxas de sobrevivência foram registrados, e as larvas dissecadas para realização de estudos bioquímicos.



**Figura 8:** (A) Adulto de *D. saccharalis*; (B) Tubos para a realização do acasalamento dos insetos; (C) Imagem ampliada dos ovos visualizados em microscópio estereoscópico; (D) Tubos de incorporação.

#### **4.3 - Efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda***

Para avaliar o efeito do ApTI sobre *S. frugiperda*, larvas neonatas foram transferidas para dietas contendo ApTI a 0,5%. Uma dieta controle, sem o inibidor, também foi preparada. O tratamento para *S. frugiperda* foi composto por 20 repetições contendo três larvas por tubo, totalizando (n= 60). As larvas da geração F0 foram cronicamente alimentadas até o

quarto ínstar e, após esse período, o peso e as taxas de sobrevivência foram registrados e, em seguida, as larvas foram dissecadas para estudos bioquímicos.

### **5 - Preparação do intestino médio**

As peptidases extraídas dos intestinos de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por MACEDO *et al.* (1993).

As larvas foram imobilizadas em gelo e tiveram seus intestinos removidos com auxílio de pinças. Os intestinos foram macerados em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e, subsequentemente, homogeneizadas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 *xg* durante 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes coletados foram utilizados para ensaios enzimáticos. A concentração de proteína foi determinada de acordo com BRADFORD (1976), com albumina de soro bovino (BSA) utilizado como padrão.

### **6 - Preparação das fezes**

Fezes das larvas de 4<sup>o</sup> ínstar de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram coletadas e estocadas a -20 °C. Para utilização nos ensaios enzimáticos, as fezes foram homogeneizadas em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e centrifugadas a 10.000 *xg* durante 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes foram coletados e imediatamente utilizados.



## **7 - Determinação da atividade enzimática**

Com a finalidade de analisar a resposta das peptidases de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* frente à ação de ApTI, a atividade das enzimas do tipo tripsina e quimotripsina presentes nos extratos do intestino médio e fezes das larvas, alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI, foi determinada utilizando os substratos BAPNA (ERLANGER *et al.*, 1961), e Suc-AAPF-pNA (DELMAR *et al.*, 1979), respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A atividade proteolítica total foi determinada utilizando o substrato Azocaseína (BROCK *et al.*, 1982).

Para a atividade da tripsina, os extratos intestinais (30 µg) foram incubados com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) por 10 min. Após incubação, 200 µl de BAPNA 1 mM foram adicionados, completando um volume final de 270 µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 min. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída a leitura da solução do branco foi detectada no leitor de microplacas *VersaMax Microplate Reader* (Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para a atividade da quimotripsina, os extratos intestinais (15 µg) foram incubados com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) por 10 min. Após incubação, foi adicionado 20 µL/poço de Suc - AAPF-pNA a 1 mM, completando um volume de 120µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 5 min. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída da leitura da solução do branco foi detectada no leitor de microplacas *VersaMax Microplate Reader* (Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para o ensaio sobre azocaseína, extratos intestinais (20 µg) foram misturados com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) e incubou-se durante 10 min à temperatura ambiente. Uma alíquota de 90 µL de solução de 1% de azocaseína (p/v) foi adicionada e em seguida, incubada a 37°C

durante 15min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de TCA a 10% (v/v). Após 30min de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.500 xg durante 15min. Uma alíquota de 100µL de cada amostra foi adicionado a 100 µL de NaOH a 1 M e a densidade óptica foi medida a 450 nm. Todos os dados de ensaios enzimáticos foram relatados como a média de dois ensaios independentes realizados em triplicatas.

### **8 - Inibição das peptidases do intestino médio de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* por ApTI**

O efeito de ApTI na inibição das tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foi determinado através de ensaios de inibição, adicionando quantidades crescentes de ApTI (0 - 2,5 µg). Os ensaios foram realizados como já descritos anteriormente no tópico 7 – (Determinação da atividade enzimática, página 34).

### **9 - Digestibilidade *in vitro* do ApTI pelas peptidases digestivas de *D. saccharalis***

ApTI foi dissolvido (2 mg/ml) em 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Os extratos de intestino médio das larvas foram preparados de acordo com o método descrito detalhadamente na seção 3 deste capítulo. Para determinar se as peptidases intestinais são capazes de digerir ApTI, o inibidor foi incubado com extrato de intestino médio (30 µg) na proporção de 1:5 (p/p), em diferentes intervalos de tempos (0, 1, 6, 24, 36, 48 e 60 h). Os ensaios foram realizados à temperatura de 37 °C e a digestão foi interrompida por imersão dos tubos em água fervente durante 2 min. A degradação do BSA (3 µg) foi usado como um controle positivo da atividade proteolítica e os tempos de (2, 3, 4 e 5 h) foram usados. As proteínas

foram em seguida separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

### **10 - Atividades das peptidases do intestino médio de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* em géis de eletroforese**

A zimografia foi realizada de acordo com Schmidt, *et al.*,(1988), com algumas modificações. As amostras foram separadas em 9% de SDS-PAGE a 200 V, à 4 °C. As amostras (17 µg) e o marcador de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra para eletroforese. As proteínas utilizadas como marcadores de massa molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa). Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para um segundo gel de poliacrilamida 9% contendo 0,1% (p/v) de gelatina. A transferência ocorreu em um sistema de eletrotransferência refrigerado (Amersham bioscience Transphor) sendo os cassetes de transferência montados conforme as instruções do fabricante. Os parâmetros utilizados foram: 60 V com amperagem livre durante 20 min. Após a transferência, o gel foi lavado em uma solução Triton X-100 2,5% (v/v) durante 2 h sob agitação. O gel de gelatina foi então incubado a 37 °C com 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) durante 30 min e, subsequentemente, corados com Coomassie Brilliant Blue R-250, e a visualização das bandas brancas indicaram a presença de atividade proteolítica após o processo de descoloração.

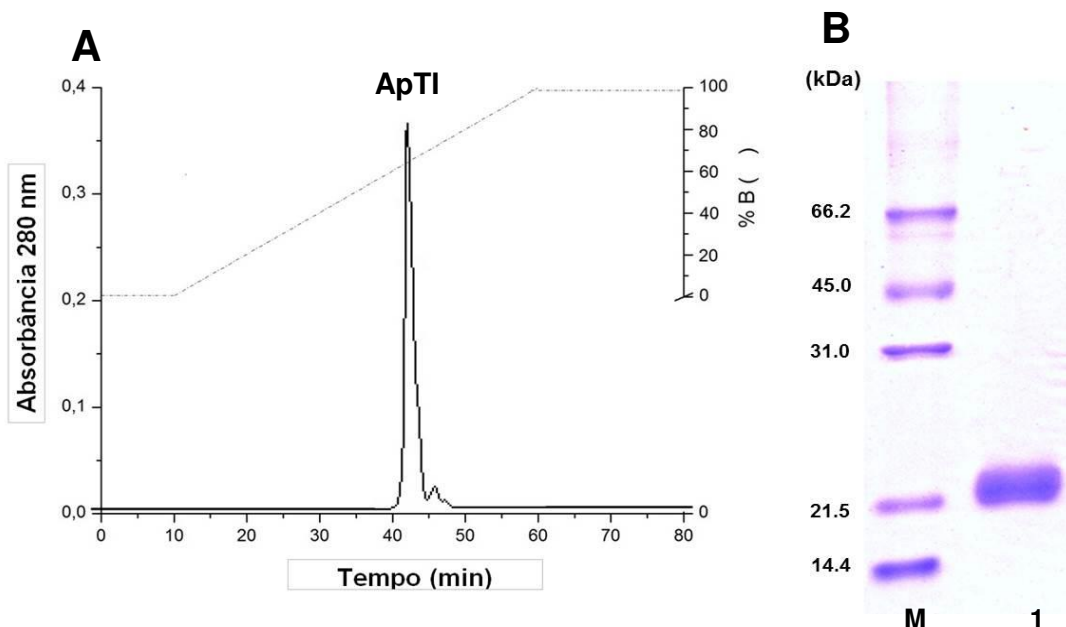
## **11 - A análise estatística**

Os dados obtidos nos ensaios bioquímicos foram submetidos à análise da variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A análise foi realizada com o software GraphPad InStat (GraphPad Software).

## VI – RESULTADOS

### 1 - purificação de ApTI

O extrato bruto obtido da farinha de sementes de *A. pavonina* apresentou atividade inibitória contra tripsina bovina, e portanto, foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-75, no qual resultou na separação de picos bem definidos (dados não mostrados). Somente o segundo pico, denominado P-2, foi capaz de inibir a tripsina. Após diálise e liofilização, a fração P-2 foi utilizada no passo de purificação subsequente, em uma cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-tripsina (dados não mostrados). O material retido na Sepharose-tripsina foi eluído com HCl 0,1 M, constituído de atividade inibitória. Este foi dialisado, liofilizado e submetido à cromatografia em coluna C-18 (3,9 x 300 mm). O perfil cromatográfico revela a presença de 1 pico eluído em diferentes concentrações de tampão B (Figura 9 A). Este pico foi coletado, liofilizado e submetido a uma eletroforese para confirmar sua pureza (Figura 9 B).

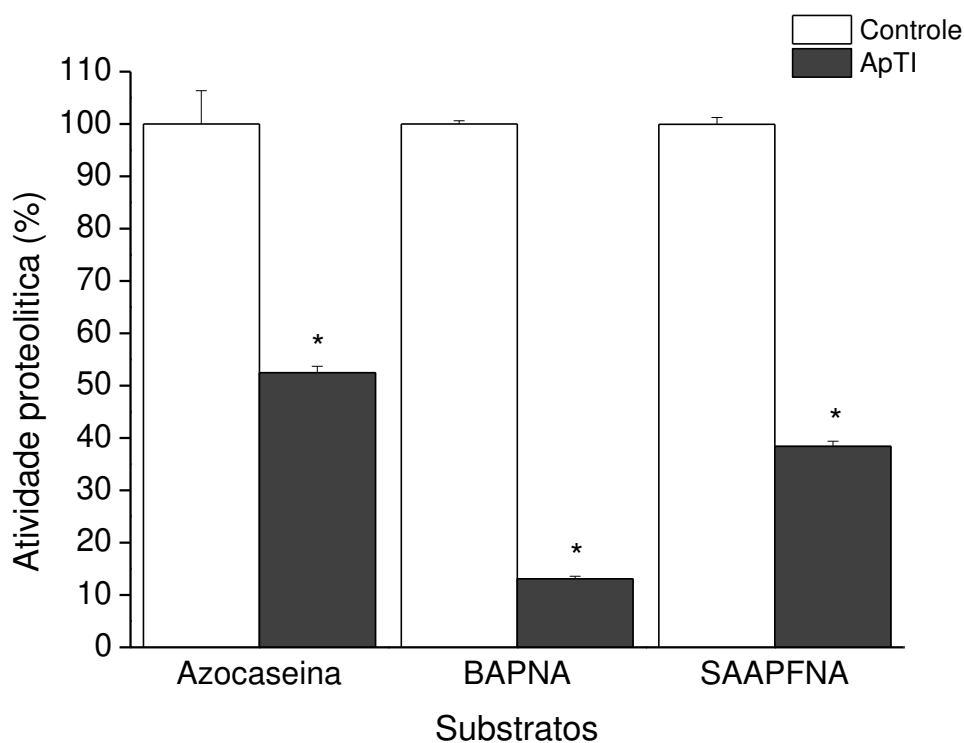


**Figura 9:** (A) Perfil cromatográfico do material eluído da Sepharose-tripsina e aplicado em coluna C-18 (3,9 x 300 mm) equilibrada com tampão TFA 0,1 %. Frações foram coletadas em fluxo de 1 ml/min. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. (B) SDS-PAGE 12,5% oriunda da fração da C-18, (M): Marcador de massa molecular; (1) 5 µg de ApTI obtido da C-18.

## 2 - Efeito agudo do ApTI sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis* na gerações F0

### 2.1 - Inibição da atividade proteolítica de larvas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta contendo ApTI

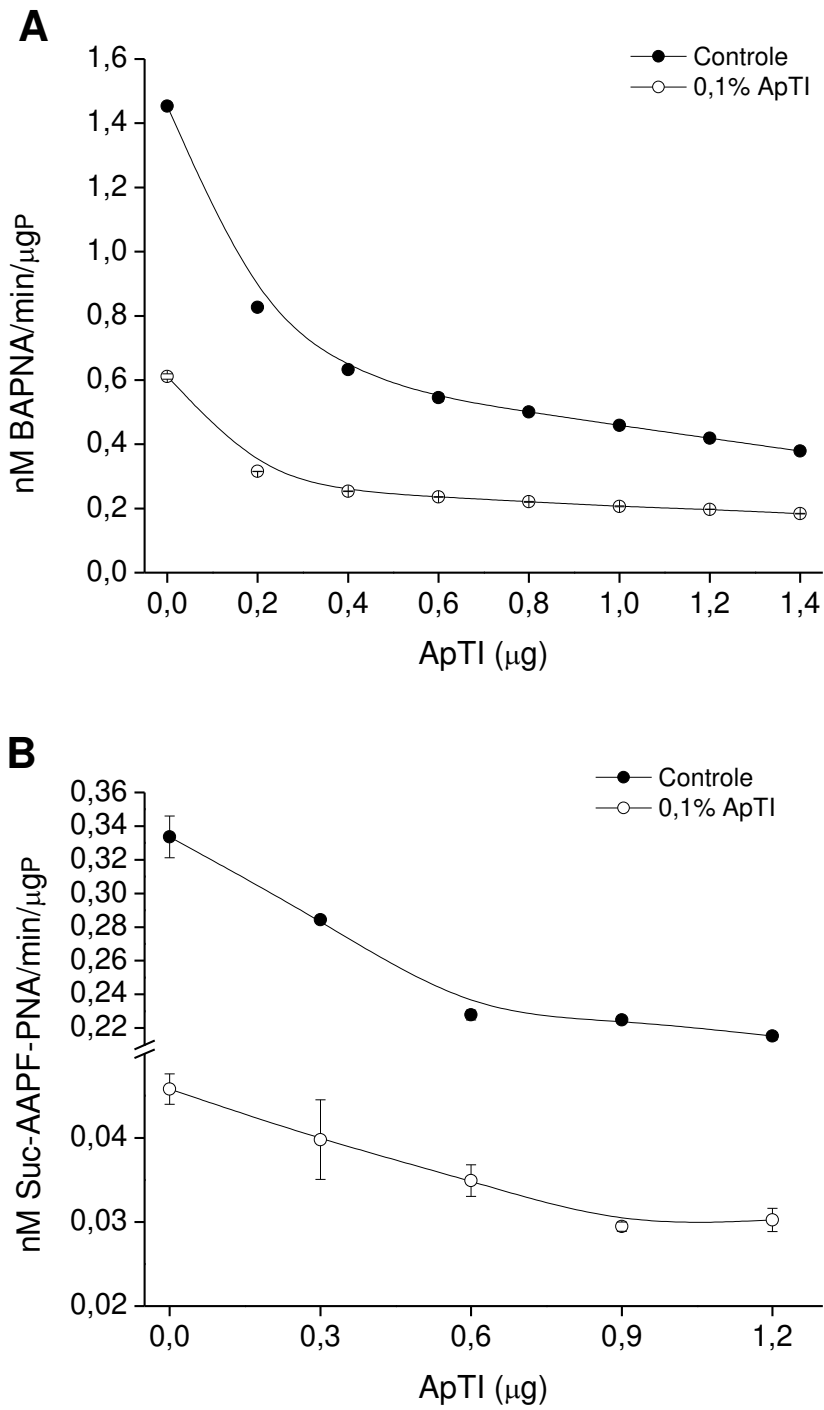
O efeito de ApTI no desenvolvimento da geração F0 de *D. saccharalis* foi avaliado através de sua incorporação em dieta artificial na concentração de 0,1% (p/p). A ingestão de ApTI durante um período de 72 h reduziu a atividade proteolítica total em 47%. Uma diminuição de 87% e 63% também foi observada nas atividades das tripsinas e quimotripsinas, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10:** Ensaio de atividade proteolítica realizada com substrato geral (azocaseína) e substratos específicos para a tripsina (BAPNA) e quimotripsina (Suc-AAPF-PNA), utilizando extrato de intestino médio de larvas de *D. saccharalis* alimentadas por um período de 72 h, com dieta controle e dieta contendo 0,1% de ApTI (p/p). O \* mostra a diferença significativa das médias (ANOVA) entre os tratamentos com  $p < 0,05$ .

Para avaliar a sensibilidade das tripsinas e quimotripsinas das larvas, ensaios *in vitro* foram realizados incubando concentrações crescentes de ApTI com o homogenato do intestino médio de larvas de *D. saccharalis*, sendo a atividade residual analisada (Figura 11A e B). A atividade das tripsinas do grupo alimentado com ApTI mostrou-se menor que a do grupo controle mesmo sem adição de inibidor, como podemos observar na Figura 11A. A adição de inibidor promoveu uma redução da atividade enzimática proporcional em ambos os grupos, sendo que a atividade residual na presença da maior concentração de ApTI analisada foi de 28,5% e 33% para o grupo controle e alimentado com 0,1% de ApTI, respectivamente.

As quimotripsinas de *D. saccharalis* foram menos inibidas por ApTI, em comparação a inibição das tripsinas. Similarmente ao observado para as tripsinas, as quimotripsinas do grupo alimentado com ApTI apresentaram uma atividade enzimática menor em comparação as quimotripsinas do grupo controle. Mesmo assim, a redução da atividade enzimática ocorreu na mesma proporção nos 2 grupos analisados. Na maior concentração de ApTI utilizada no ensaio as quimotripsinas do grupo controle apresentaram uma atividade residual de 64,7% enquanto as quimotripsinas do grupo alimentado com 0,1% de ApTI apresentaram uma atividade residual de 60% (Figura 11B).



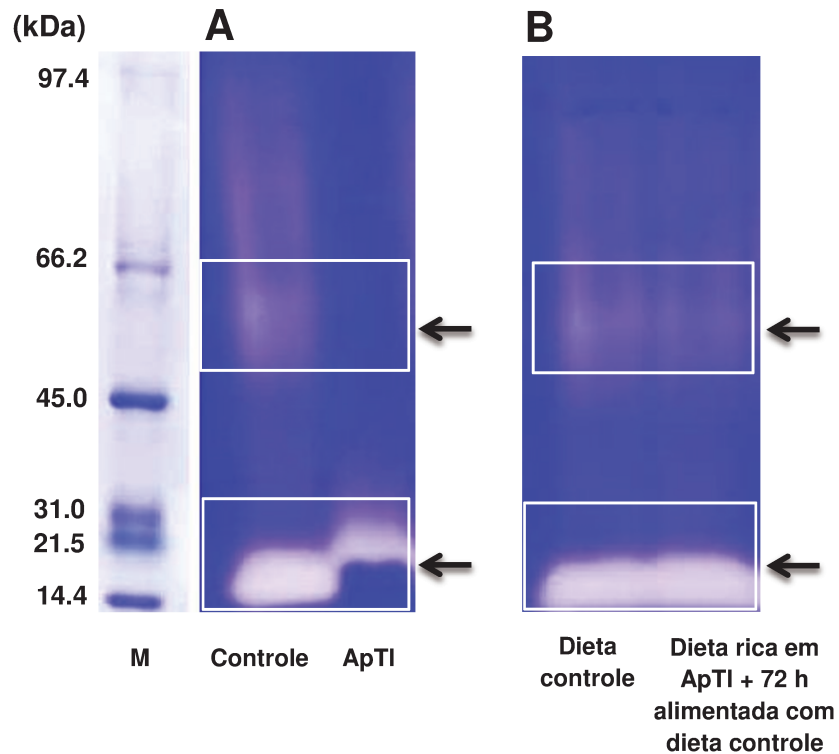
**Figura 11:** Ensaio de sensibilidade das tripsinas e quimotripsinas do extrato de intestino médio de *D. saccharalis* (A) Curva de inibição de enzima tripsina feita com concentrações crescentes de ApTI. (B) Curva de inibição de enzima quimotripsina feita com concentrações crescentes de ApTI. Os experimentos foram realizados em triplicatas.



## **2.2 - Análise qualitativa da atividade proteolítica do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* através de gel de eletroforese**

Para análise qualitativa da atividade proteolítica do fluido intestinal de *D. saccharalis* alguns critérios foram seguidos. Com o intuito de se obter uma validação experimental, os géis foram realizados em triplicatas e todos apresentaram o mesmo perfil.

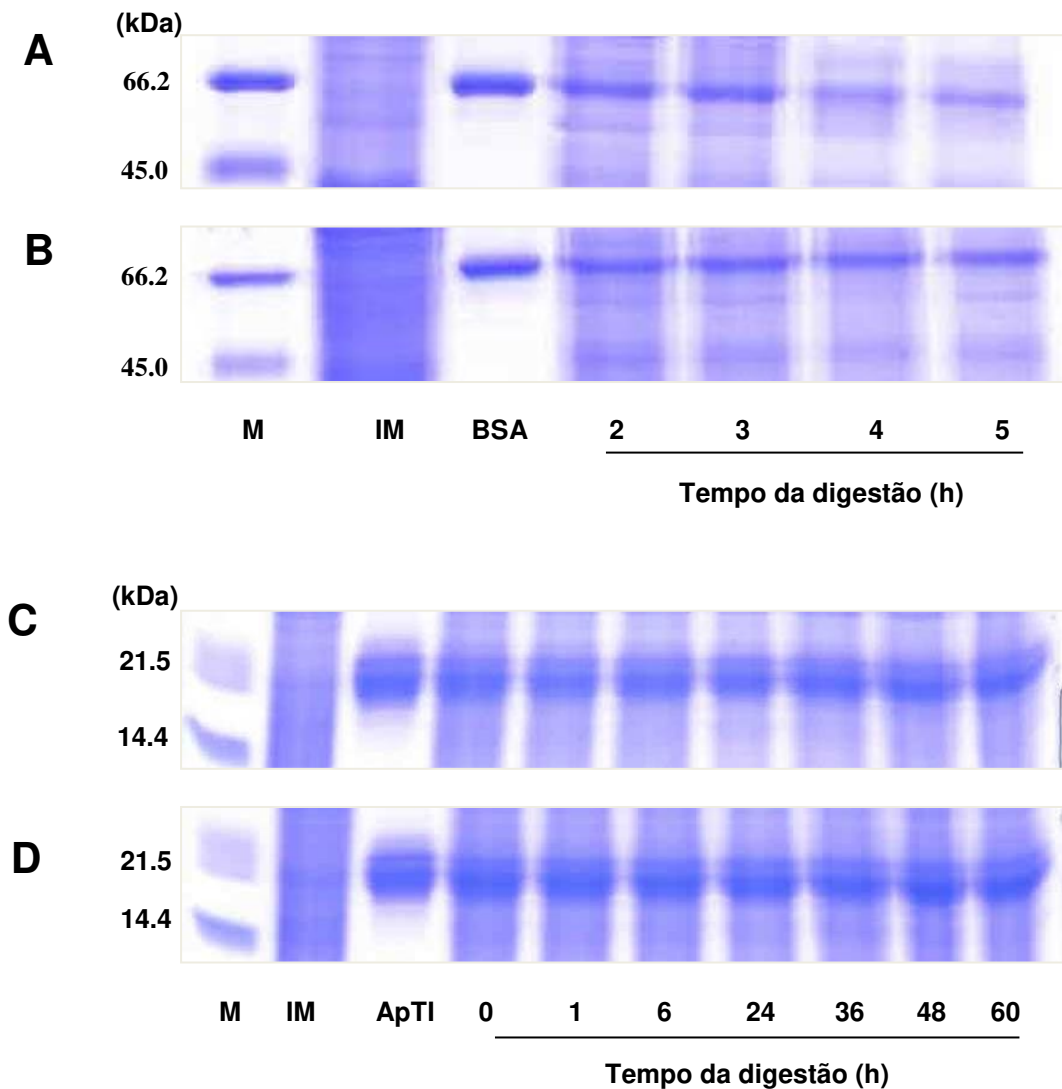
Nas amostras controle, existem duas regiões com atividade proteolítica bem definida. No entanto, nas larvas alimentadas com ApTI, o local de atividade proteolítica com massa molecular mais elevado foi totalmente inibido (indicado por uma seta na Figura 12A). Após 72 h de exposição das larvas ao inibidor, parte das larvas alimentadas com ApTI foram transferidas para uma dieta controle durante 72 h. A atividade proteolítica neste último grupo foi reestabelecida para os níveis do grupo controle (indicado por uma seta na Figura 12B).



**Figura 12:** Zimografia de larvas de *D. saccharalis* alimentadas por 72 h com uma dieta contendo 0,1% de ApTI (p/p). (A) **M:** marcador de massa molecular; **Controle:** larvas alimentadas em dieta controle; **ApTI:** larvas alimentados por 72 h em dieta contendo ApTI; (B) **Dieta controle:** larvas alimentadas em dieta controle; **Dieta rica em ApTI + alimentação de 72 h com dieta controle:** larvas alimentados com ApTI por 72 h e transferidas para uma dieta controle durante um período de 72 h.

### 2.3 - Digestibilidade *In vitro* de ApTI pelas peptidases digestivas de *D. saccharalis*

A susceptibilidade de ApTI a degradação pelas enzimas do intestino médio de larvas de *D. saccharalis* foi avaliada pela incubação do inibidor com as enzimas presentes no homogenato de intestino médio. A digestão *in vitro* de ApTI com extratos intestinais de *D. saccharalis*, mostrou que ApTI é resistente à digestão em todos os intervalos analisados, representado por bandas com intensidades semelhantes, e sem indicação de degradação (Figura 13C e D). Os géis originais encontram-se em anexo 3, pag.143.



**Figura 13:** Digestão *in vitro* de BSA; (A) digestão da BSA utilizando o extrato do intestino das larvas alimentadas em dieta controle, (B), digestão da BSA utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentadas com ApTI; Digestão *in vitro* de ApTI, (C) digestão do ApTI utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentadas em dieta controle, (D) digestão de ApTI utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentados com ApTI. (M) marcadores de massa molecular; (IM) intestino médio; (ApTI) inibidor de *Adenantha pavonina*.

### 3 - Efeito crônico do ApTI sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis* na geração F0

#### 3.1 - Parâmetros fisiológicos do desenvolvimento da geração F0 de *D. saccharalis*

O efeito de ApTI sobre o desenvolvimento da geração F0 de *D. saccharalis* foi avaliado através de sua incorporação em dieta artificial na concentração de 0,05% (p/p) até a fase pupal. A viabilidade larval mostrou que 55% das larvas do grupo alimentado com ApTI não alcançaram o estágio de pupa e conseqüentemente a viabilidade pupal foi reduzida ocorrendo baixos índices de emergência de adultos, sendo 20,6% menor no grupo alimentado com ApTI (Tabela 1). Outro parâmetro avaliado foi a taxa de oviposição de *D. saccharalis*. A dieta contendo ApTI provocou uma diminuição de 43% na taxa oviposição em comparação ao grupo controle.

**Tabela 1.** Efeito de ApTI (0,05% na dieta) sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis*\*

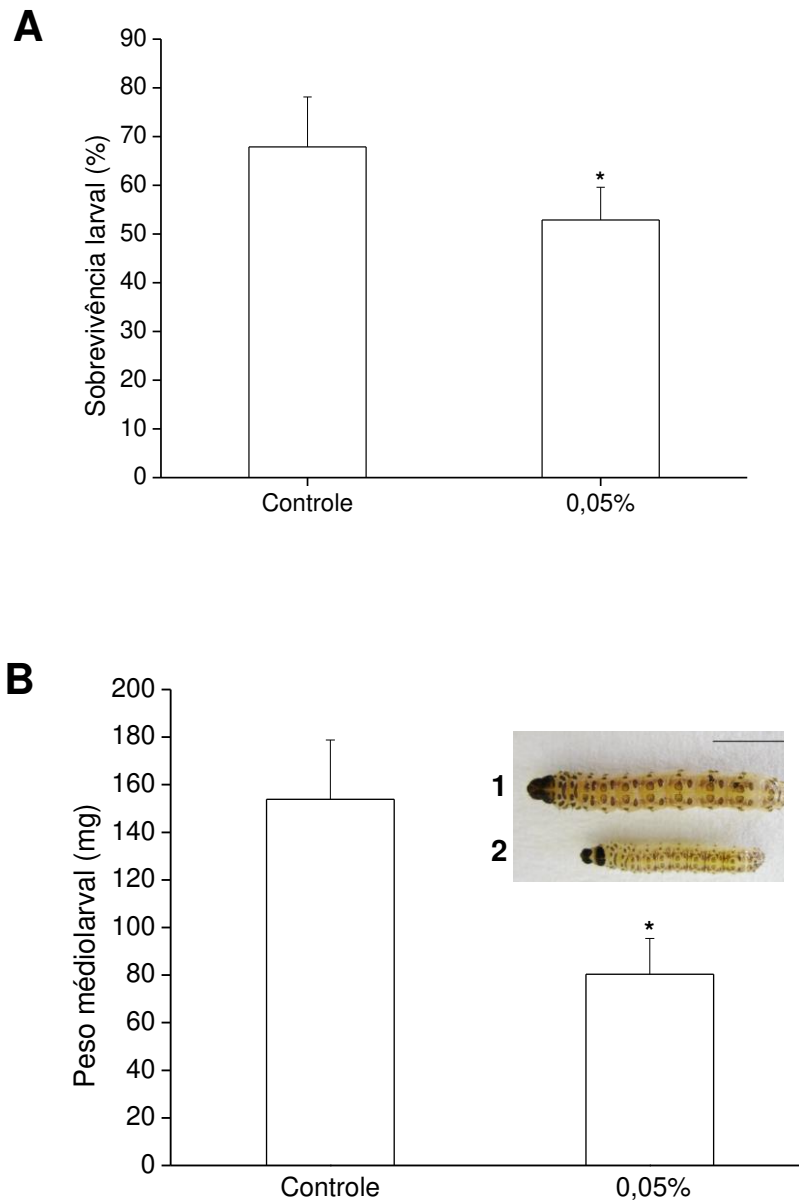
	<b>Estágio Larval (dias)</b>	<b>Viabilidade Larval (%)</b>	<b>Viabilidade pupal (%)</b>	<b>Número total de ovos<sup>a</sup></b>	<b>Ciclode vida completo (dias)</b>
<b>Controle</b>	30.62±2.88a	93.33±17.28a	90.72±2.5a	2.562	42.52±2.53a
<b>0,05% ApTI</b>	32.36±3.04a	41.66±38.9b	72.0±2.8b	1.462	43.21±2.33a

\* Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (Tukey, p<0,05)

<sup>a</sup>Baseado na oviposição de sete fêmeas durante sete dias.

### **3.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento larval da geração F0 de *D. saccharalis***

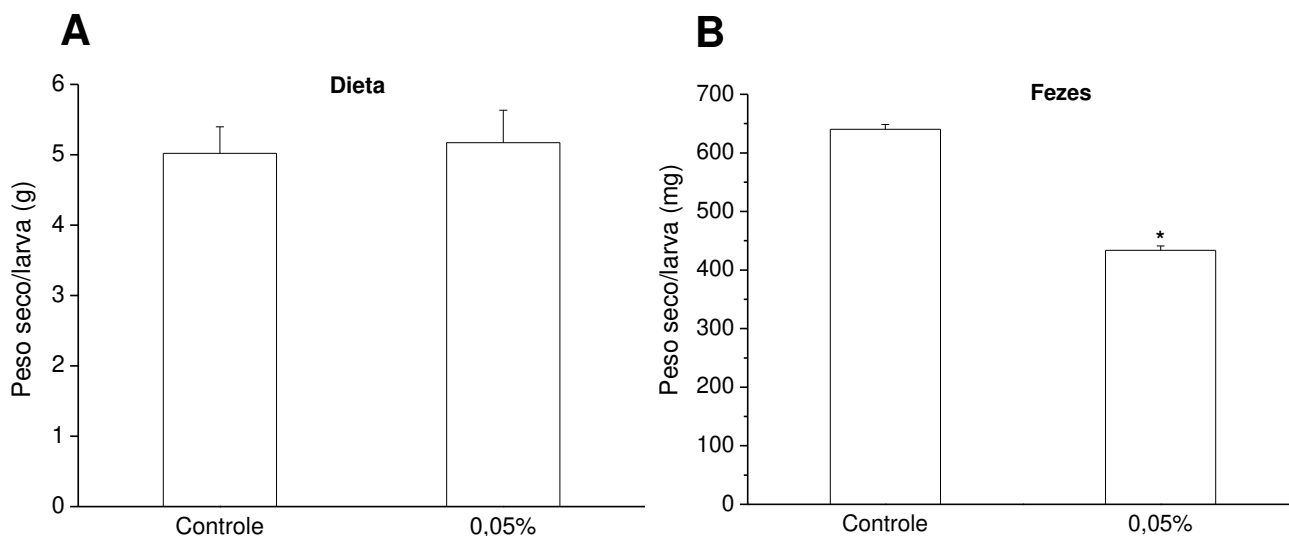
O efeito de ApTI sobre o desenvolvimento da geração F0 de *D. saccharalis* foi avaliado através de sua incorporação em dieta artificial na concentração de 0,05%. O número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4<sup>o</sup> ínstar foram determinados. O efeito antimetabólico de ApTI no crescimento das larvas de *D. saccharalis* está representada na Figura 14A e B. ApTI causou uma redução de 22% nas taxas de sobrevivência (Figura 14A) e de 47% no peso larval (Figura 14B). A Figura 14B-1 (controle) e 14B-2 (ApTI) ilustra o impacto do efeito do ApTI na redução do peso médio das larvas de *D. saccharalis*.



**Figura 14:** Efeito de ApTI sobre larvas de 4<sup>o</sup> ínstar *D. saccharalis* da geração F0 alimentadas com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,05% (p/p). (A) Número de larvas sobreviventes. (B) Peso médio larval. \* A média mostra diferenças significativas (ANOVA) entre os tratamentos, com  $p < 0,05$ . As Figuras 14B-1 (lagarta controle) e 14B-2 (lagarta tratamento) ilustram o efeito de ApTI na redução do peso médio das larvas de *D. saccharalis*. A barra é equivalente ao comprimento de 7 mm.

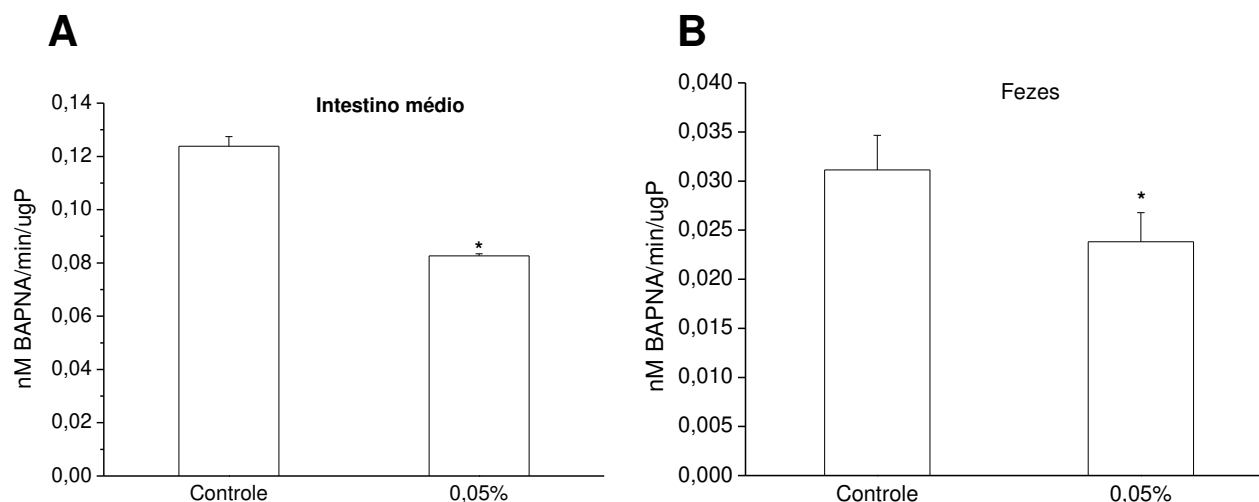
### 3.3 - Consumo e utilização de alimento

A Figura 15 mostra o efeito de ApTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *D. saccharalis*. Apesar de ApTI não ter causado efeito significativo no consumo da dieta quando incorporado a 0,05%, a produção de fezes por larva sofreu uma diminuição de 32% quando comparada à produção de fezes das larvas alimentadas com dieta controle.



**Figura 15:** Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *D. saccharalis* (A) Dieta consumida por larva e (B) Fezes produzidas por larva foram mensuradas. \* A média mostra diferenças significativas (ANOVA) entre os tratamentos, com  $p < 0,05$ .

As enzimas presentes no intestino médio e nas fezes das larvas alimentadas com dieta controle e com ApTI tiveram suas atividades avaliadas através da hidrólise do BAPNA. O consumo da dieta contendo ApTI causou uma diminuição de 33% da atividade trípica do intestino médio e uma redução de 23% da atividade trípica nas fezes (Figura 16).

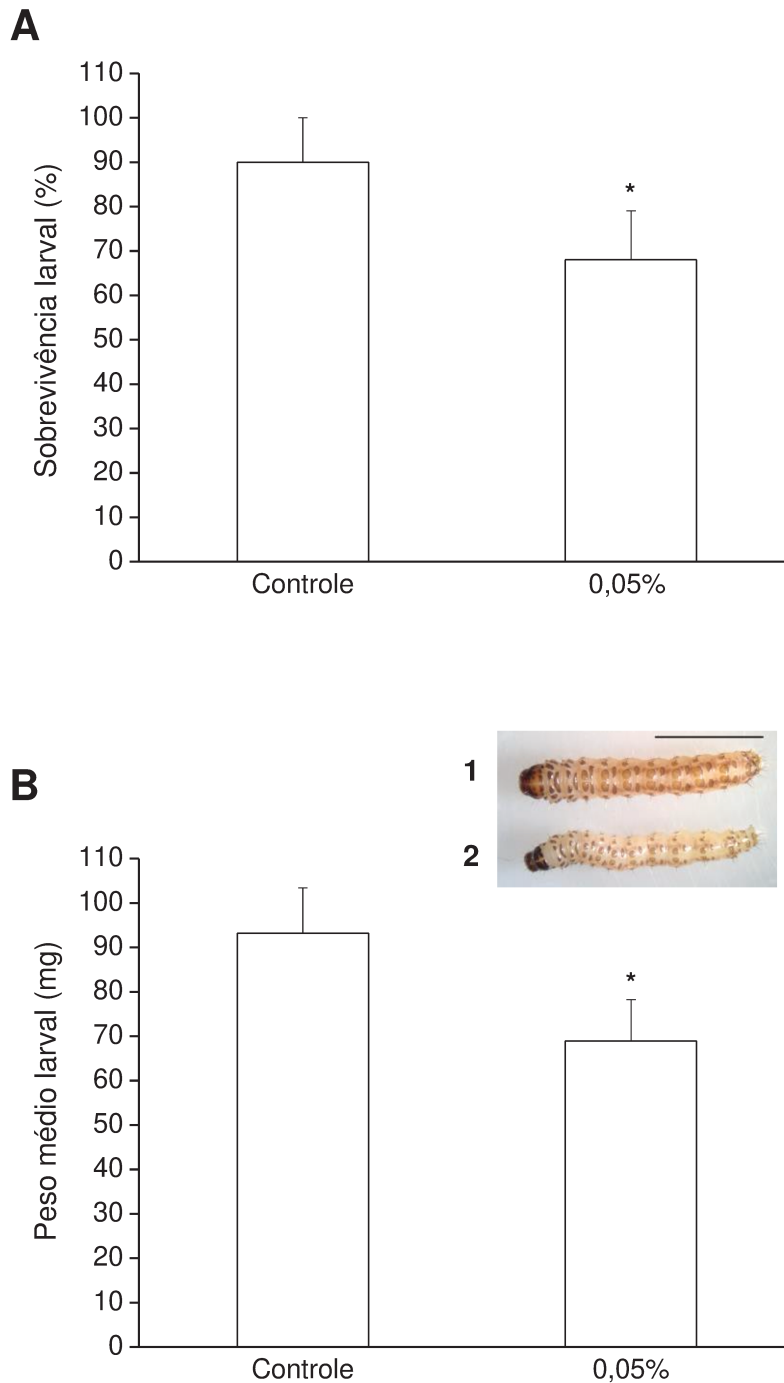


**Figura 16:** Resposta das peptidases de *D. saccharalis* à ingestão de ApTI 0,05%. (A) Atividade trípica das enzimas do intestino médio; (B) Atividade trípica das enzimas presente nas fezes. \* A média mostra diferenças significativas (ANOVA) entre os tratamentos, com  $p < 0,05$ .

#### **4 - Efeito de ApTI no desenvolvimento larval da geração F1 de *D. saccharalis***

O efeito do ApTI sobre o desenvolvimento da geração F1 de *D. saccharalis* foi avaliado através de sua incorporação em dieta artificial na concentração de 0,05%. O número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4º ínstar foram determinados. O efeito antimetabólico de ApTI no crescimento das larvas de *D. saccharalis* está representada nas Figuras 17A e 17B. ApTI provocou uma redução de 24,4% nas taxas de sobrevivência e de 26% no peso das larval. As Figuras 17B-1 (lagarta controle) e 17B-2 (lagarta tratamento) ilustram o efeito de ApTI na redução do peso médio das larvas de *D. saccharalis*.

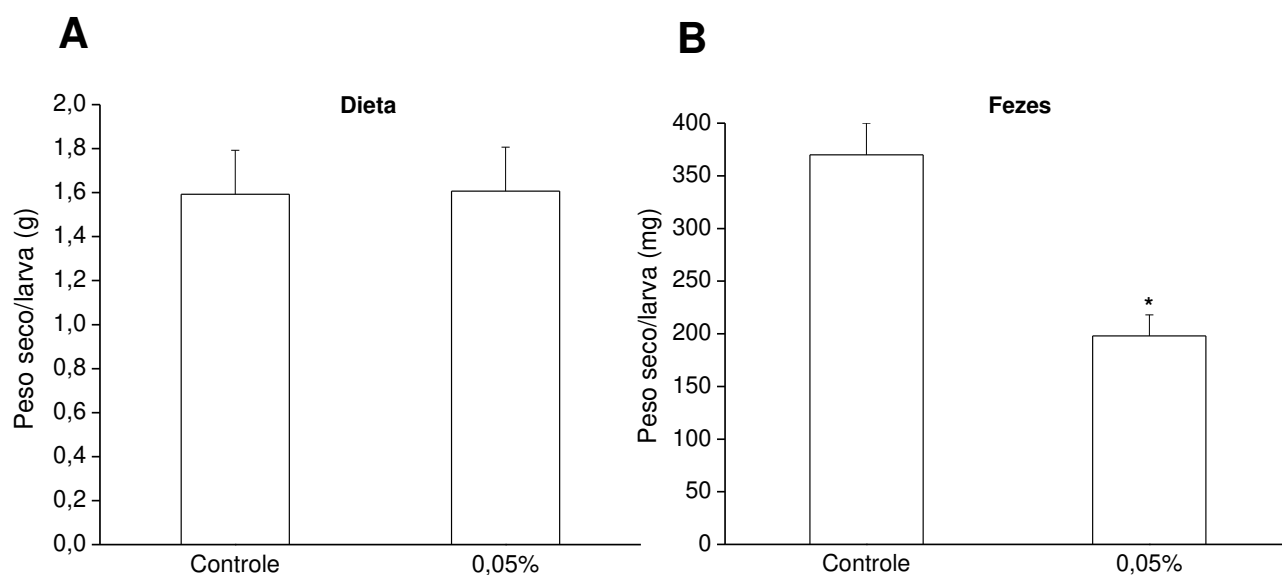




**Figura 17:** Efeito de ApTI sobre larvas de quarto ínstar da geração F1 alimentadas com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,05% (p/p). (A) Número de larvas sobreviventes. (B) Peso médio larval. \* A média mostra diferenças significativas (ANOVA) entre os tratamentos, com  $p < 0,05$ . As Figuras 17B-1 (lagarta controle) e 17B-2 (lagarta tratamento) ilustram o efeito de ApTI na redução do peso médio das larvas de *D. saccharalis*. A barra é equivalente ao comprimento de 7 mm.

#### 4.1 - Consumo e utilização de alimento

A Figura 18 mostra o efeito de ApTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas por larvas da geração F1 de *D. saccharalis*. Apesar de ApTI não ter causado efeito significativo no consumo da dieta quando incorporado a 0,05%, a produção de fezes por larva sofreu uma diminuição de 46% quando comparada à produção de fezes das larvas alimentadas com dieta controle.

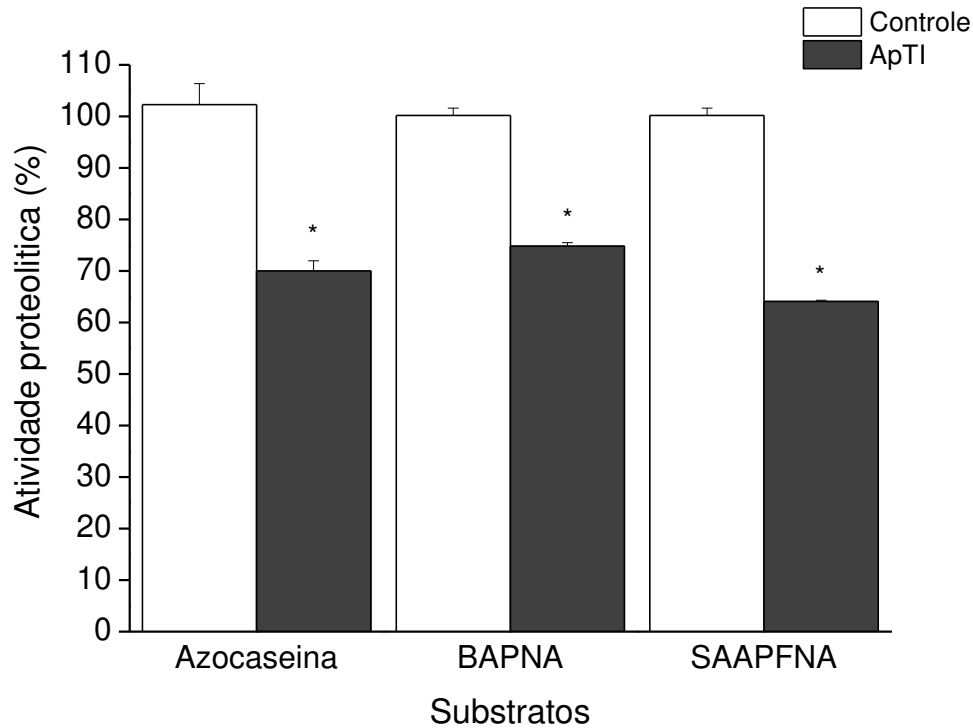


**Figura 18:** Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *D. saccharalis* (A) Dieta consumida por larva e (B) Fezes produzidas por larva foram mensuradas. O \* mostra a diferença significativa das médias (ANOVA) entre os tratamentos com  $p < 0,05$ .

#### 4.2 - Ação do ApTI sobre a atividade proteolítica de *D. saccharalis*

Ensaio enzimáticos foram realizados para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo de larvas da geração F1, já que foi observado um efeito negativo no desenvolvimento larval. As enzimas presentes no intestino médio e nas fezes das larvas alimentadas com dieta controle e com ApTI tiveram suas atividades avaliadas através da

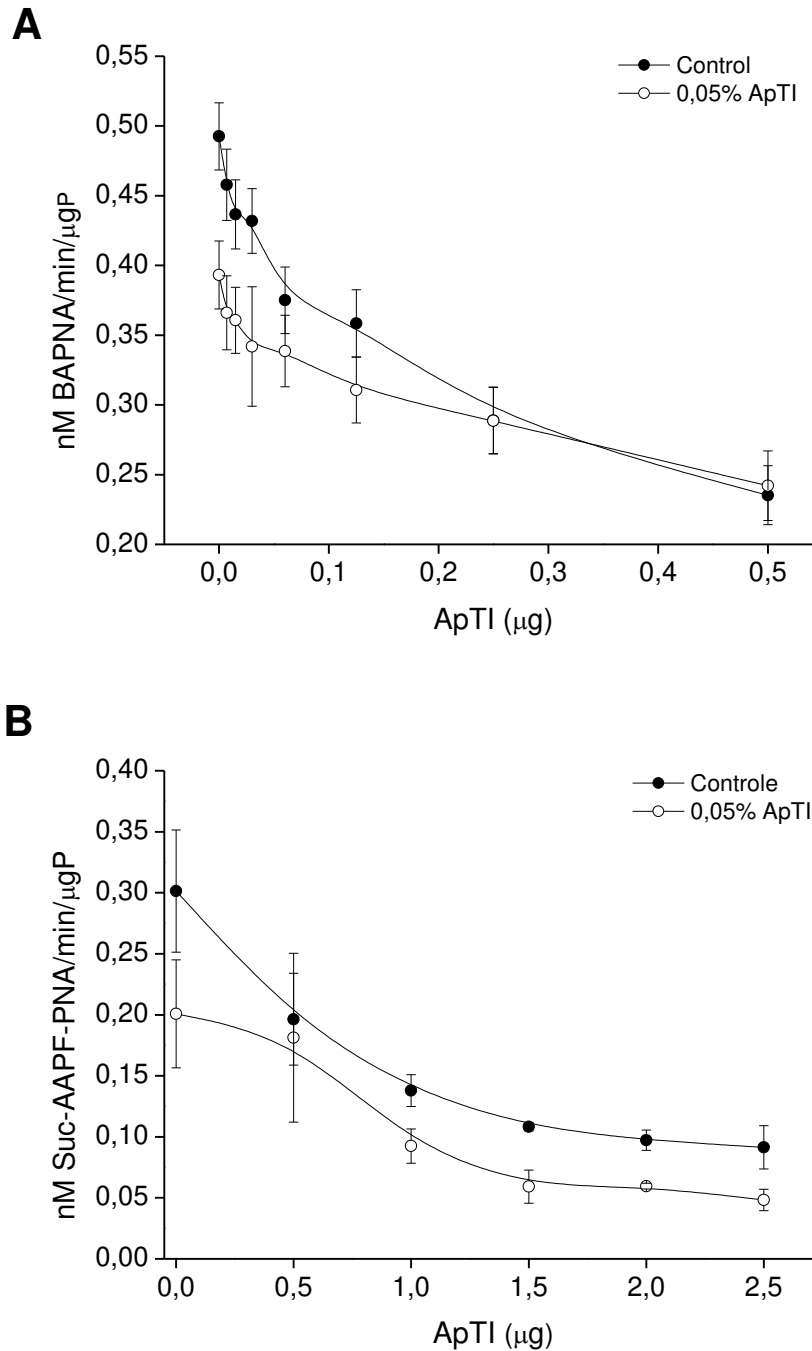
hidrólise do BAPNA, Suc-AAPF-pNA e azocaseína. O consumo da dieta contendo ApTI causou uma redução de 31,6% da atividade proteolítica total, bem como uma redução de 25,3% e de 36% na atividade da tripsina e quimotripsina, respectivamente (Figura 19).



**Figura 19:** Ensaio de atividade proteolítica realizado com substrato geral (Azocaseína) e substratos específicos para tripsina (BAPNA) e quimotripsina (Suc-AAPF-PNA) usando larvas da geração F1 de *D. saccharalis* alimentadas cronicamente com dieta contendo ApTI a 0,05% (p/p).

Para avaliar a sensibilidade das tripsinas e quimotripsinas de larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI, ensaios *in vitro* foram realizados incubando concentrações crescentes de ApTI com o homogenato de intestino médio de larvas de *D. saccharalis*. Em relação as tripsinas, a atividade enzimática residual foi 50% menor na presença de 0,5µg de ApTI em ambos os tratamentos (Figura 20A). A inibição das quimotripsinas de ambos os grupos também foi reduzida proporcionalmente a adição de

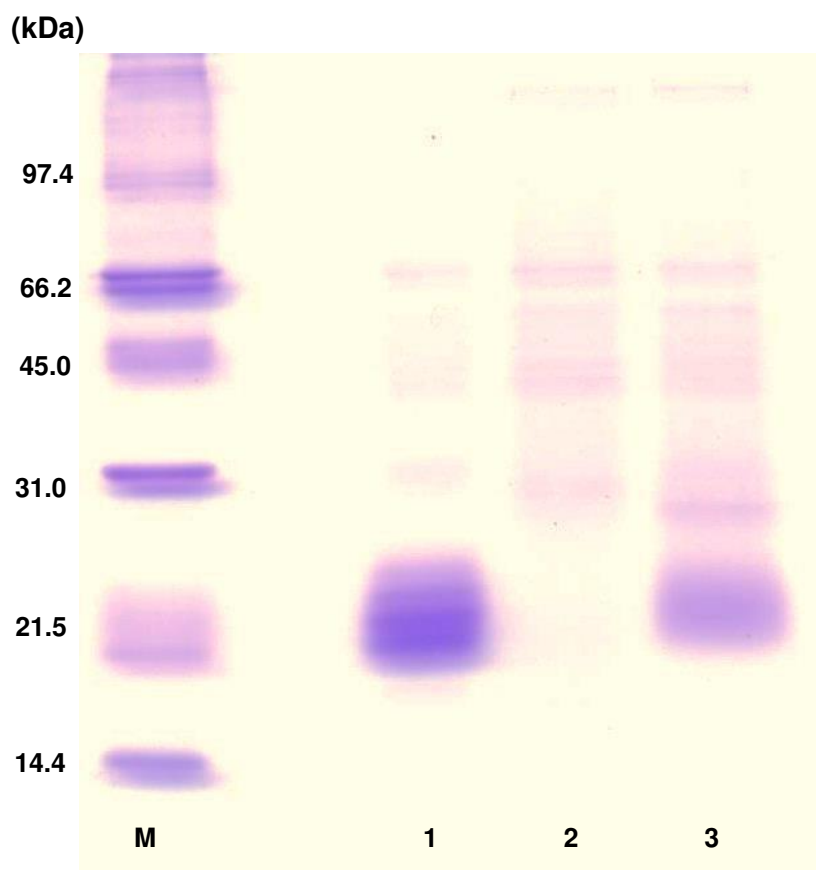
inibidor, sendo que a atividade enzimática residual foi em média 3 vezes menor nas maiores concentrações de inibidor analisadas (2,5 $\mu$ g) (Figura 20B).



**Figura 20:** Inibição por ApTI das tripsinas e quimotripsinas do IM de larvas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. (A) Curva de inibição de enzimas tripsina feita com concentrações crescentes de ApTI. (B) curva de inibição de enzimas quimotripsina feita com concentrações crescentes de ApTI.

### 4.3 - SDS-PAGE 12,5% das fezes de *D. saccharalis*

Uma vez que ApTI não foi digerido por peptidases do intestino médio de *D. saccharalis*, realizou-se um SDS-PAGE para verificar a presença de ApTI na fezes. Uma banda com massa molecular semelhante a um inibidor é evidente nas larvas alimentadas com ApTI, estando ausente no grupo de larvas alimentadas em dieta controle (Figura 21).

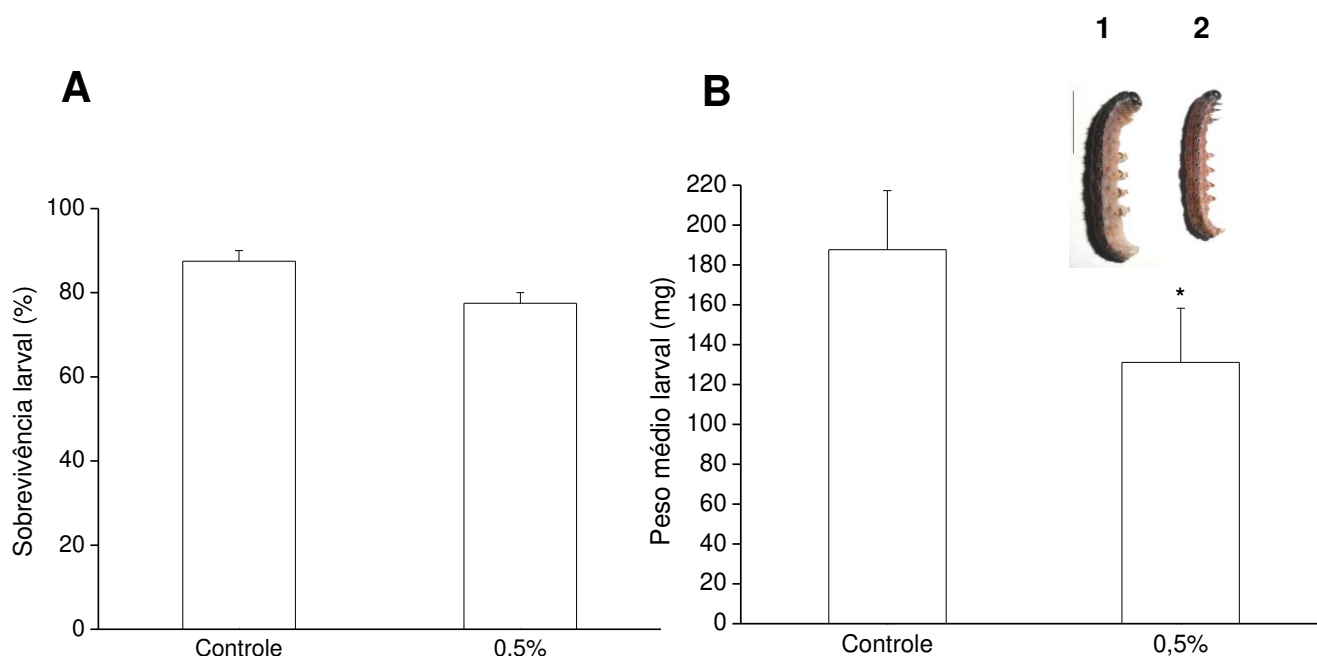


**Figura 21:** SDS-PAGE a 12,5%, mostrando a presença de ApTI em fezes do grupo alimentado com ApTI,. M: marcador de massa molecular; 1: ApTI; 2: fezes de larvas alimentadas em dieta controle; 3: fezes de larvas alimentadas em dieta com ApTI.

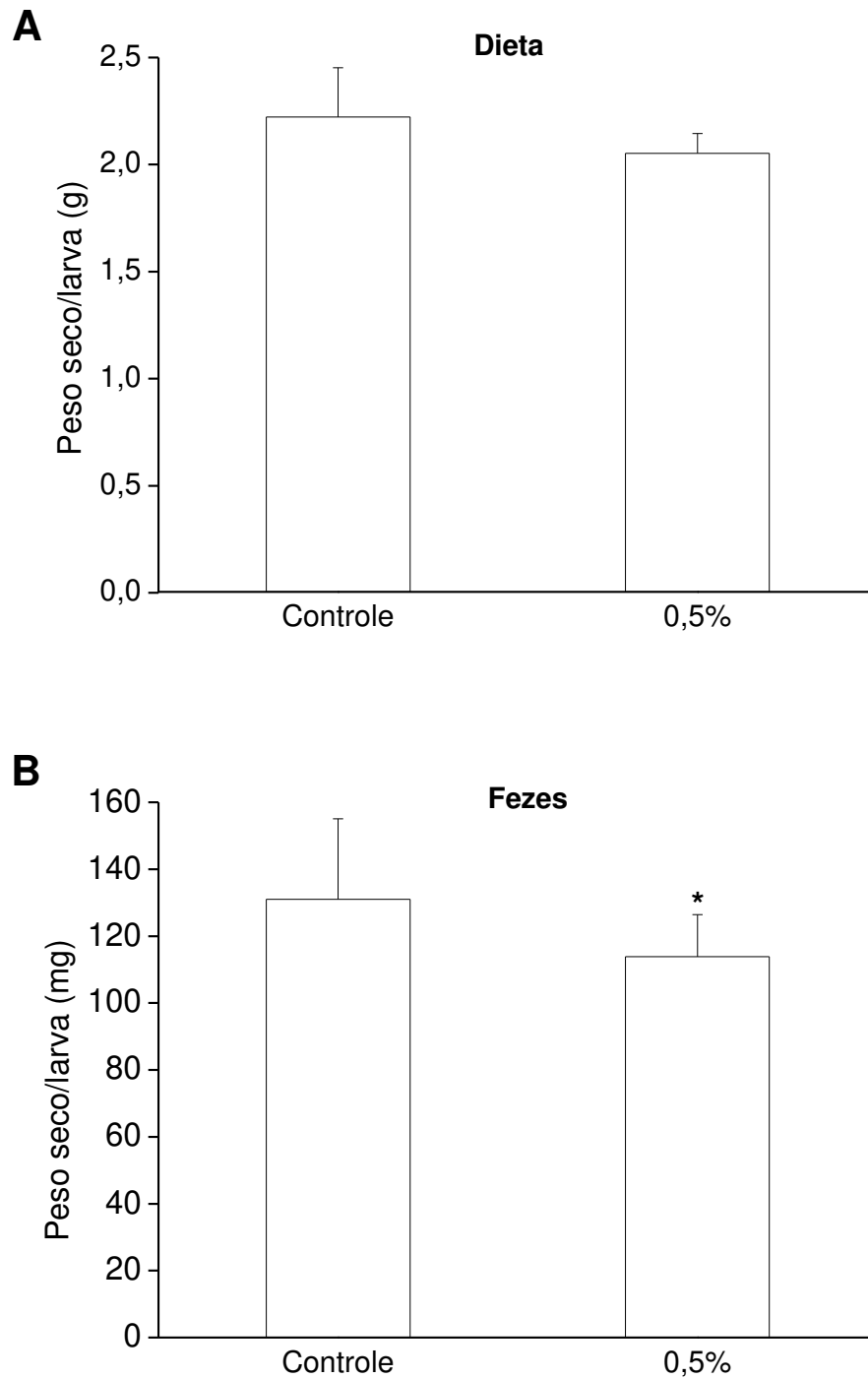
## 5 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *S. frugiperda*

### 5.1 - Parâmetros biológicos de *S. frugiperda*

A incorporação em dieta artificial de ApTI a 0,5 % causou uma redução de 30% no peso médio larval (Figura 22B). No entanto, não observamos alteração na taxa de sobrevivência larval (Figura 22A). A análise dos parâmetros nutricionais revelou que não houve alteração no consumo de dieta (Figura 23A) associada a uma ligeira redução de 13% na produção de fezes (Figura 23B).



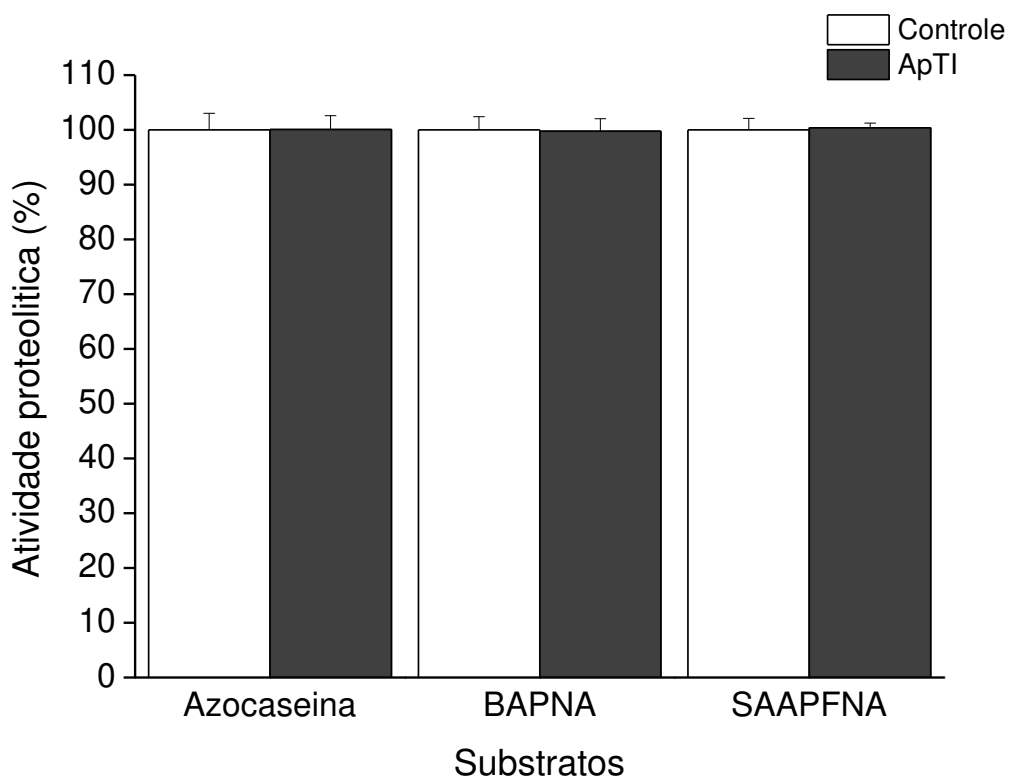
**Figura 22:** Efeito de ApTI sobre larvas de quarto ínstar da geração F0 alimentadas com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,5% (p/p). (A) Número de larvas sobreviventes. (B) Peso médio larval. \* A média mostra diferença significativa (ANOVA) entre os tratamentos, com  $p < 0,05$ . Detalhe: diferença significativa (ANOVA) entre *S. frugiperda* (1) lagarta controle e (2) lagarta tratamento. A barra é equivalente ao comprimento de 1 mm.



**Figura 23:** Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *S. frugiperda* alimentadas com ApTI. (A) Dieta consumida por larva e (B) Fezes produzidas por larva foram mensuradas. O \* mostra a diferença significativa das médias (ANOVA) entre os tratamentos com  $p < 0,05$ .

## 5.2 - Parâmetros bioquímicos de *S. frugiperda*

As análises bioquímicas mostraram que nenhuma alteração na atividade proteolítica geral foi observada. O mesmo resultado foi obtido quando utilizamos substratos específicos para a determinação da atividade das tripsinas e quimotripsinas (Figura 24).

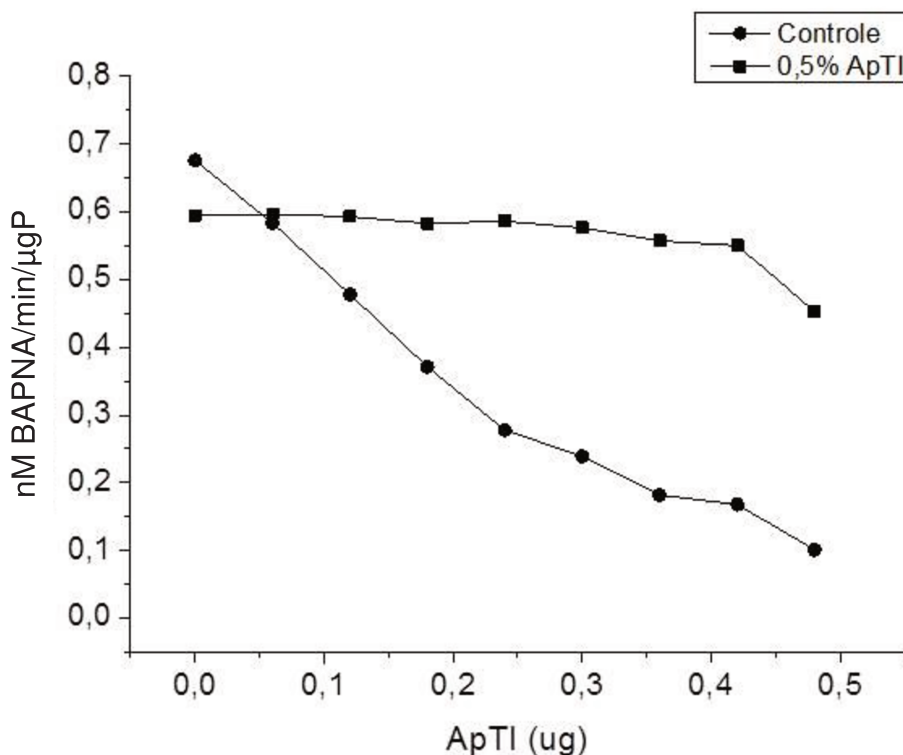


**Figura 24:** Ensaio de atividade proteolítica realizado com substrato geral (Azocaseína) e substratos específicos para tripsina (BAPNA) e quimotripsina (Suc-AAPF-PNA) usando larvas de *S. frugiperda* alimentadas cronicamente com dieta contendo ApTI a 0,5% (p/p).

Ensaio foram realizados para analisar o perfil de inibição das tripsinas com a adição de ApTI *in vitro*. A figura 25 mostra o perfil de inibição das tripsinas de *S. frugiperda*. Fica visível a partir da observação da figura que o padrão de inibição foi alterado. No grupo controle é



possível associar a diminuição da atividade enzimática com o aumento da concentração de inibidor de uma maneira dose-dependente. Na presença de 0,5  $\mu\text{g}$  de ApTI a atividade enzimática residual no grupo controle foi de 14,3%. Entretanto, o perfil de inibição mostrou-se distinto no grupo alimentado com inibidor, indicando que as enzimas tornaram-se insensíveis a inibição por ApTI. A atividade enzimática residual foi de 90% com a maior concentração de inibidor utilizada neste ensaio (0,5  $\mu\text{g}$ ).

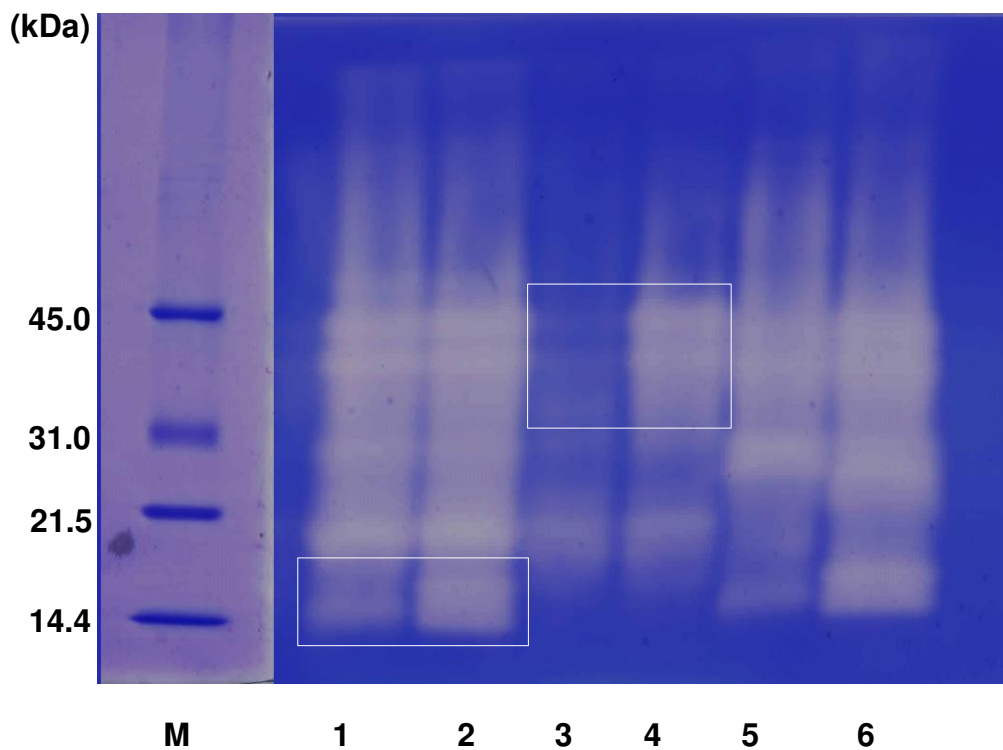


**Figura 25:** Inibição por ApTI das tripsinas do fluido do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial. A Curva de inibição de enzimas tripsina feita com concentrações crescentes de ApTI.

### **5.3 - Análise qualitativa da atividade proteolítica do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* através de gel de eletroforese**

A análise realizada através de zimografia revelou que quando as larvas são alimentadas em dieta contendo ApTI, uma modificação no perfil enzimático pode ser

observada. Nota-se que a região de atividade proteolítica com massa próxima a 16 kDa presente no grupo alimentado com ApTI apresenta-se mais intensa que a mesma região do grupo alimentado com dieta controle (Figura 26, linhas 1 e 2 destacadas com caixa branca). Quando incubamos TLCK nas amostras, nota-se que a região de atividade proteolítica de massa próxima a 45 kDa mantém-se mais intensa no grupo alimentado com ApTI (linhas 3 e 4 destacadas com caixa branca). Por fim, a incubação das amostras com ApTI deixa evidente que a inibição da atividade proteolítica no grupo controle é maior que no grupo alimentado com ApTI (linhas 5 e 6).



**Figura 26:** Zimografia de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com uma dieta contendo 0,5% de ApTI (p/p). M: marcador de massa molecular; 1: larvas alimentadas em dieta controle; 2: larvas alimentados em dieta contendo ApTI; 3: larvas alimentadas em dieta controle incubados com TLCK; 4: larvas alimentadas em dieta contendo ApTI incubados com TLCK; 5: larvas alimentadas em dieta controle incubados com ApTI; 6: larvas alimentadas em dieta contendo ApTI incubados com ApTI.

## VII - DISCUSSÃO

Inibidores de peptidases (IPs) são naturalmente produzidos pelas plantas como mecanismos de defesa natural contra herbívoros e patógenos (FAN e GUO-JIANG, 2005; STEVENS *et al.*, 2013). Tais inibidores são considerados agentes antimetabólicos, e muitos relatos mostram que espécies de lepidópteros exibem crescimento, desenvolvimento e sobrevivência reduzida após a ingestão de IPs presentes em dietas artificiais (RYAN, 1990; BOWN *et al.*, 2004). Tal evidencia motivou pesquisadores a investigar o uso de IPs no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de pragas (CHRISTELLER *et al.*, 2002; DUNSE *et al.*, 2010). Entretanto, apesar do grande sucesso dos inibidores como agentes inseticidas, alguns insetos conseguem contornar seus efeitos antimetabólicos, sendo essencial um estudo detalhado das peptidases digestivas desses insetos.

Neste estudo, foi testada a atividade antimetabólica de um inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* (ApTI) através da sua incorporação em dieta artificial para a broca-da-cana *D. saccharalis* e para a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*. Os efeitos antimetabólicos de ApTI foram investigados a fim de se propor sua utilização como ferramenta biotecnológica.

### **1. Efeitos sobre *D. saccharalis***

Em relação aos danos provocados pela broca-da-cana, é importante que seu controle seja feito durante a fase larval, antes de abrirem galerias no caule, tornando a planta suscetível a infestações secundárias por microrganismos, como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* (OGUNWOLU *et al.*, 1991; MEDEIROS *et al.*, 2012). O estudo para *D. saccharalis* foi focado em demonstrar o efeito de ApTI em gerações consecutivas de insetos. Outros estudos associados às respostas dos insetos herbívoros a compostos de

plantas foram realizados em experimentos de curto prazo (por exemplo, durante uma geração, ou em um determinado ínstar), mensurando apenas as taxas de desenvolvimento e de consumo das larvas em um único estágio de desenvolvimento larval (DU *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2008). No entanto, as experiências conduzidas ao longo de várias gerações podem revelar diferenças nas respostas entre gerações, bem como resultados que possam demonstrar alguma dependência das condições de crescimento de plantas hospedeiras (BROOKS e WHITTAKER, 1999; WU e BROWN, 2006).

Analizamos o papel de ApTI nas gerações F0 e F1 da broca-da-cana em busca de possíveis indícios de respostas adaptativas. Demonstramos que, *D. saccharalis*, é altamente sensível aos efeitos inseticidas causados por concentrações baixas de ApTI em dieta artificial. Avaliando o efeito agudo da ingestão de ApTI 0,1% (p/p) durante um período de 72 h, houve uma diminuição da atividade proteolítica total bem como nas atividades das tripsinas e quimotripsinas (Figuras 10, pg. 42). Ensaio de atividade inibitória revelaram que ApTI inibiu as enzimas tripsinas e quimotripsinas de *D. saccharalis* (Figuras 11A e B, pg.44). A atividade das enzimas foi maior no grupo controle em comparação ao grupo alimentado com ApTI. Provavelmente isso decorra da presença do inibidor na dieta artificial, que estaria inibindo as enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas. Além disso, observamos que a adição de quantidades crescentes do ApTI, realizada através de uma curva de inibição, demonstra que, o aumento da concentração de inibidor se correlaciona a diminuição da atividade enzimática. Assim sendo, podemos concluir que ApTI inibe as enzimas digestivas de *D. saccharalis*. Baseada na curva de inibição obtida para as enzimas tripsinas e quimotripsinas podemos ainda sugerir que nenhuma nova forma de enzima resistente a inibição foi sintetizada em resposta a presença de ApTI, dada a similaridade das curvas de inibição entre os grupos controle e alimentado com o inibidor.

Uma análise qualitativa da atividade proteolítica em intestino médio de *D. saccharalis* foi realizada por zimografia. Nas larvas alimentadas com ApTI a banda de atividade proteolítica com o massa molecular mais elevado foi inibida (mostrado por uma seta na figura 12A, pg.46). Após 72 h de exposição ao inibidor, parte das larvas alimentadas com ApTI foram transferidas para uma dieta controle durante 72 h. Após este período a atividade proteolítica foi reestabelecida (Figura 12B, pag.46). Estes resultados demonstram que a redução da atividade enzimática foi devido à presença de ApTI na dieta, assim, corroborando os resultados *in vitro* que foram previamente obtidos.

Este estudo demonstrou que o comprometimento do processo digestivo em *D. saccharalis* ocorreu após ingestão do inibidor. Para provar os efeitos de ApTI sobre o processo digestivo de larvas de *D. saccharalis*, nós avaliamos o desempenho dos extratos dos intestinos médios de ambos os grupos em digerir BSA. Em lepidópteros o alimento permanece no sistema digestivo das larvas em média 5 h (NAUEN *et al.*, 2001). Neste intervalo de tempo, o intestino médio extraído a partir de larvas alimentadas com ApTI não foram capazes de digerir o BSA, enquanto larvas alimentadas com dieta controle apresentaram visível degradação do BSA após 4 h (Figuras 13A e 13B, pag.47). A resistência à degradação é um pré-requisito para uma proteína exercer efeitos inseticidas. A digestão *in vitro* de ApTI com extratos de intestino médio de *D. saccharalis* mostrou que ApTI é resistente a digestão em todos os intervalos de tempo analisados, representados por bandas em gel de poliacrilamida com intensidades semelhantes e não havendo indicação de degradação (Figuras 13C e 13D, pag.47).

Neste trabalho, o efeito crônico de ApTI nas gerações F0 e F1 de *D. saccharalis* mantidas em dieta artificial contendo o inibidor foi estudado. Um estudo anterior relatou os resultados de ApTI no desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis* apenas no 4º instar

(SILVA *et al.*, 2012). No entanto, os efeitos sobre outros estágios de desenvolvimento não foram examinados.

As larvas da geração F0 foram criadas em dieta artificial contendo 0,05% de ApTI (p/p) até a fase pupal. Verificamos que ApTI causou uma redução nas taxas de sobrevivência e no peso médio larval (Figuras 14A e 14B, pag. 50). Baseado nos resultados de consumo de dieta e produção de fezes (Figuras 15A e 15B, pag. 51) demonstramos que a taxa de consumo de dieta foi similar em ambos os grupos, enquanto a taxa de produção de fezes foi 32% menor no grupo alimentado com inibidor. Esses resultados corroboram com da Silva *et al.* (2012), quando observaram que larvas de *D. saccharalis* foram alimentadas em dieta artificial contendo 0,1% de ApTI. Outros IPs vêm sendo testados para o controle da broca-da-cana. O inibidor de tripsina de sementes de *Inga laurina* (ILTI) foi incorporado em dieta artificial a 0,1% (p/p) e oferecido a larvas *D. saccharalis*. Nestas condições, uma diminuição de 51% no peso médio larval foi observada (RAMOS *et al.*, 2012). As concentrações de ApTI utilizadas neste trabalho correspondem aos níveis naturalmente presentes em plantas e aos níveis expressos em plantas geneticamente modificadas (DE LEO *et al.*, 1998; FAN e GUO-JIANG, 2005; BABU e SUBRAHMANYAM, 2010). Os efeitos biológicos esperados no controle da praga associados às concentrações ideais preconizados reafirmam o potencial biotecnológico do ApTI.

A baixa viabilidade pupal observada, acarreta os baixos índices de emergência de adultos no grupo alimentado com ApTI. Outro parâmetro avaliado foi a taxa de oviposição de *D. saccharalis*. Insetos alimentados com inibidor apresentaram uma diminuição na taxa de oviposição em comparação ao grupo controle (Tabela 1, pg.48). Sabe-se que a ingestão de IPs impede a absorção de proteínas e promove várias anormalidades na fisiologia das larvas. Uma vez que as reservas de nutrientes utilizadas na vitelogênese são formadas durante o

estágio larval e a dieta contendo ApTI comprometeu o desenvolvimento larval através do menor ganho de peso, sugerimos que ApTI tenha um efeito negativo indireto sobre a vitelogênese. A deficiência nutricional oriunda da alimentação com inibidor explicaria a menor produção de ovos. *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera litura* também tiveram a fertilidade afetada em decorrência do consumo de IPs (TELANG *et al.*, 2003; DAMLE *et al.*, 2005).

Quanto às larvas eclodidas da geração F1, seus parâmetros biológicos e bioquímicos foram analisados. ApTI provocou uma redução na taxa de sobrevivência e no peso médio larval (Figura 17A e 17B, pg.53). A redução do peso larval corrobora com os parâmetros alimentares, que revelaram uma redução na produção de fezes similar a geração anterior (Figura 18B, pag. 54). Uma menor produção de fezes poderia indicar uma redução na eficiência do processo digestivo em decorrência da alimentação rica em ApTI, levando à limitação da proteólise no intestino médio. Ensaio bioquímico demonstraram que as larvas alimentadas com ApTI apresentaram redução da atividade proteolítica total, bem como das tripsinas e quimotripsinas, que correspondem as duas principais peptidases envolvidas no processo digestivo de lepidópteros (Figura 19, pg. 55). Nos insetos da geração F1 (Figura 20A e 20B, pag.56), as enzimas digestivas foram inibidas similarmente por ApTI como na geração anterior (Figura 11A, pag. 44). Este resultado indica que nenhuma enzima resistente à inibição foi produzida nesta geração. Desta forma, demonstramos que os efeitos do inibidor sobre o desenvolvimento da broca-da-cana não foi sobrepujado mesmo quando alimentamos as larvas através de gerações consecutivas. Uma vez que as gerações F0 e F1 estiveram em contato com o inibidor durante seu desenvolvimento e ambas apresentaram redução da atividade enzimática associada à sensibilidade das enzimas tripsinas e quimotripsinas, o que pode sugerir que *D. saccharalis* não foi capaz de sobrepujar os efeitos provocados pelo

inibidor ApTI. Ou seja, podemos sugerir que os efeitos observados sobre a redução de peso e sobrevivência larval são decorrentes da exposição das larvas ao ApTI.

Como um pré-requisito necessário para uma proteína exercer atividade inseticida é ser resistente à digestão, realizamos uma digestão *in vitro* para demonstrar que ApTI apresenta esta característica. Adicionalmente, realizamos um SDS-PAGE para demonstrar a presença de ApTI na fezes, um segundo indicativo de que este inibidor não está sendo digerido no sistema digestivo do inseto. Uma banda com massa molecular semelhante a do inibidor está presente nas amostras oriundas de larvas alimentadas ApTI. Esta mesma banda está ausente nas amostras provenientes grupo controle (Figura 21, pag. 57), dando um forte indicativo de que se trata do ApTI ingerido via dieta artificial.

Alguns autores relataram que, alguns insetos após serem alimentados com IPs, mostraram aumento da excreção das enzimas nas fezes, pois a complexação de IPs com as peptidases intestinais podem impedir a reabsorção destas enzimas para o interior do espaço ectoperitrófico, resultando na perda crítica de aminoácidos essenciais contendo enxofre (BROADWAY e DUFFEY, 1986). Recentemente, Stevens *et al.* (2013) mostraram que larvas de *H. punctigera* alimentadas com NaPi (Inibidor de peptidases de *Nicotiana glauca*) apresentaram um aumento de 1,6 vezes na atividade de tripsina na fezes.

A membrana peritrófica dos insetos possui poros que permitem a passagem de enzimas e alimentos parcialmente digeridos entre os espaços endo e ectoperitrófico (FERREIRA *et al.*, 1994). Estes poros tem um tamanho variável entre diferentes espécies, mas sua grande maioria permite a passagem de moléculas de 50 kDa (TERRA e FERREIRA, 1994). A ocorrência dos poros na membrana permite aos insetos realizarem um mecanismo de reciclagem de enzimas, conhecido como fluxo “contra corrente”. Tudo que não for reciclado,



portanto, será eliminado nas fezes. De acordo com nossos resultados, demonstramos que as enzimas tripsinas e quimotripsinas foram fortemente inibidas por ApTI. Adicionalmente, mostramos a presença de uma grande quantidade de inibidor nas fezes. Desta maneira, seria possível que devido a forte interação entre as enzimas e o inibidor, que este complexo não permitiria a reciclagem das enzimas dado seu elevado massa molecular. Assim sendo, o complexo formado seria eliminado nas fezes. A fim de analisar a atividade enzimática nas fezes realizamos um ensaio enzimático e concluímos que atividade das tripsinas e quimotripsinas nas fezes de ambos os grupos não diferiu (dados não mostrados). Baseado neste resultado podemos inferir que o complexo entre o inibidor e as peptidases é desfeito no intestino posterior, onde as enzimas são recicladas e o inibidor eliminado, ou ainda o complexo estaria sendo eliminado nas fezes porém não detectamos aumento na atividade enzimática pois as enzimas ainda estariam complexadas com ApTI, corroborando nossa hipótese inicial.

As concentrações de ApTI necessárias para exercer os efeitos inseticidas sobre o desenvolvimento de *D. saccharalis* (0,05%) são menores que o previamente descritos no efeito agudo. Geralmente, utilizando bioensaios com dieta artificial as concentrações de IPs variam de 0,1 a 1% (BRIOSCHI *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2009). A concentração de ApTI utilizado em nosso estudo (0,05%) é facilmente expressa em plantas transgênicas. Além disso, nossa estratégia de controle corrobora com as demais estratégias de interferência nas taxas de crescimento das populações de pragas sem um grande impacto sobre a mortalidade dos insetos. Esta característica minimiza o aparecimento de resistência por parte dos insetos. A diminuição das taxas de crescimento da população pode ser resultado de atraso no desenvolvimento larval, na reprodução, menor fecundidade, ou uma combinação desses fatores (WOLFSON e MURDOCK, 1995; POMPERMAYER, P *et al.*, 2001).

Em resumo, a atividade inseticida de ApTI contra a broca-da-cana não induz a resistência em duas gerações consecutivas. Portanto, a expressão de ApTI na cana de açúcar é uma alternativa promissora para o controle biológico da broca da cana .

## **2. Efeitos sobre *S. frugiperda***

Muitos estudos mostram que alguns insetos desenvolvem respostas fisiológicas capazes de sobrepujar as defesas das plantas ao se alimentarem de tecidos vegetais contendo IPs (BOWN *et al.*, 1997; GRUDEN *et al.*, 2004). O lepidóptero *S. frugiperda* é um inseto generalista conhecido por provocar grandes prejuízos no agronegócio. Uma vez que estudos vêm mostrando que esta espécie adapta-se à inseticidas químicos e outras proteínas inseticidas (YU, 1991; PAULILLO *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2003; BRIOSCHI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013), investigamos o potencial de ApTI no controle deste inseto.

Em relação à resistência acerca dos IPs em dieta artificial, os primeiros trabalhos mostraram que, quando alimentadas em dieta artificial com inibidores Bowman-Birk de soja (SBBI), as larvas de *S. frugiperda* aparentemente modificavam o perfil de enzimas proteolíticas, dentre elas tripsinas e quimotripsinas (PAULILLO *et al.*, 2000). Mais tarde, Brioschi *et al.* (2007) através da construção de uma biblioteca de cDNA, estudaram o padrão de transcrição de tripsinas e quimotripsinas quando as larvas são expostas ao SBBI. Desta forma, eles demonstraram que a expressão diferencial de alguns genes estão associados à resistência da lagarta-do-cartucho ao inibidor Bowman-Birk. Recentemente, nosso grupo avaliou se a exposição das larvas a um inibidor de uma família distinta, o inibidor Kunitz de sementes de *Entada acaciifolia* (EATI), desencadearia a mesma resposta adaptativa (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Uma redução de peso larval foi observada, no entanto, nenhum

efeito negativo foi observado nos demais estágios de vida. Em relação as análises bioquímicas, a sensibilidade das enzimas também foi alterada. Um aumento da atividade proteolítica foi observada nas larvas alimentadas com inibidor. As tripsinas tornaram-se resistentes a inibição depois da exposição crônica ao EATI e estudos de RT-PCR revelaram um aumento da transcrição de genes de tripsinas e quimotripsinas. Conseqüentemente, as transcrições destes genes esta relacionada ao mecanismo de adaptação de *S. frugiperda* (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A incorporação de ApTI provocou uma diminuição significativa no ganho de peso larval sem uma relação direta com aumento da mortalidade (Figura 22A e B, pag.58). Resultados similares são relatados para outros insetos polívoros conhecidos por se adaptarem aos compostos de defesa de plantas (BROADWAY, 1996; PETEK *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Mesmo com a redução no peso larval observada, não notamos alterações significativas no consumo de dieta ou produção de fezes, indicando um aumento na taxa metabólica, explicando o menor ganho de massa em relação ao grupo controle. Diferentemente dos resultados obtidos em outros trabalhos e observado em nosso estudo com *D. saccharalis*, não observamos aumento da atividade proteolítica geral, nem das tripsinas ou quimotripsinas (Figura 24, pag. 60). Desta forma, realizamos ensaios a fim de verificar a sensibilidade das enzimas de ambos os grupos à inibição. A sensibilidade das tripsinas foi pronunciadamente alterada, indicando que as mesmas tornaram-se resistentes (Figura 25, pag. 61). Após a realização da zimografia concluímos que a modificação do perfil de enzimas proteolíticas realmente ocorreu, demonstrando que as larvas de *S. frugiperda* se adaptaram a alimentação com ApTI (Figura 26, pag. 62). A produção de enzimas resistentes elevaria a taxa metabólica larval, corroborando o menor ganho de peso. No entanto, apenas a produção de enzimas resistentes não explicaria o menor peso das larvas, uma vez que a

atividade proteolítica permaneceu similar a do grupo controle. É importante salientar que além da síntese de novas enzimas, insetos alimentados com IPs e outras proteínas inseticidas sintetizam proteínas relacionadas ao metabolismo, detoxificação e vias relacionadas ao estresse oxidativo, como observado em outros trabalhos (OPPERT *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2012; KONUS *et al.*, 2013; NELSON e ALVES, 2014). Uma vez que a resposta adaptativa foi observada sem um aumento de atividade proteolítica e dada a dificuldade de se mensurar em alterações em vias de estresse com o uso de ferramentas bioquímicas, resolvemos então investigar este efeito utilizando ferramentas proteômicas.

## **CAPITULO II: Análise Proteômica do fluido intestinal de *D. saccharalis* submetidas à dieta contendo ApTI**

### **VIII - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1 - Espécie Vegetal e Insetos**

As sementes de *A. pavonina* L. (Fabaceae, Mimosoideae) foram coletadas na cidade de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul (Brasil) e utilizada para a purificação de ApTI como descrito por Richardson *et al.* (1986).

Os insetos *D. saccharalis* e *S. frugiperda* (Figura 6), foram cedidos pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de insetos, Departamento de Entomologia, ESALq, Universidade de São Paulo, cidade de Piracicaba-SP. As colônias foram mantidas a  $25 \pm 1^\circ$  C, UR de 65% e fotoperíodo de 12 h. A dieta artificial foi composta por farinha de soja, sacarose, germe de trigo, ágar, complexo vitamínico, ácido ascórbico, sais de Wesson, cloreto de colina, e inibidores microbianos (PARRA e MIHSFELDT, 1992).

#### **1.2 - Delineamento experimental e constituição dos grupos**

Para o estudo do proteoma do fluido intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* alguns critérios foram estabelecidos. Para ambos os insetos foram realizados três experimentos independentes, a fim de se estabelecer uma validação experimental.

Para avaliar o efeito de ApTI sobre *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, larvas neonatas foram transferidas para dietas artificiais contendo 0,05% e 0,5% de ApTI, respectivamente. Dietas artificiais sem adição do inibidor também foram preparadas, constituindo o grupo controle.

Cada tratamento consistiu de 20 replicatas contendo duas larvas por tubo (n= 40). As larvas foram alimentadas até o 4º ínstar, dissecadas e as proteínas dos fluidos intestinais imediatamente extraídas e armazenadas a -80 °C para estudos do proteoma.

As análises foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, utilizando-se o equipamento “Ultra performance Liquid Chromatography” – UPLC nanoACQUITY, com tecnologia 2D de fase reversa dupla (Waters) e com o Facility de Espectrometria de Massas, localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEM, Campinas, Brasil, utilizando-se o equipamento “NanoAcquity Ultra Performance” LC acoplado a uma fonte de ionização do tipo “nanoeletrospray” em espectrômetro “Q-TOF Ultima mass” (Waters).

### **1.3 - Obtenção das proteínas do fluido intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda***

Para a obtenção das proteínas do fluido intestinal de *D. saccharalis* foram utilizados três métodos de extração distintos: baseado em fenol (HURKMAN e TANAKA, 1986), PBS (PAUCHET *et al.*, 2008) e TCA (CILIA *et al.*, 2009). Para *S. frugiperda* foi utilizada a metodologia baseada em TCA descrita por Cilia *et al.* (2009), detalhado abaixo:

Larvas de *S. frugiperda* foram imobilizadas em gelo e tiveram seus intestinos removidos com o auxílio de pinças. Após a dissecação os intestinos íntegros e sem perfurações, foram lavados individualmente em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0. Após a higienização, os intestinos foram transferidos para uma placa de petri esterilizada contendo 1 mL de tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0. Em seguida, foram perfurados com a ajuda de agulhas estéreis para o extravasamento do conteúdo do espaço endo e

ectoperitrófico. O fluido obtido foi coletado com auxílio de pipetas Pasteur e centrifugado a 10.000  $\times g$  durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi então separado em alíquotas de 500  $\mu L$ . Em cada uma das alíquotas foram adicionados 1,5 mL de TCA 10%, preparado em acetona gelada para a precipitação das proteínas.

Após precipitação durante 2 h a -20 °C a solução foi centrifugada a 10.000 $\times g$  por 30 min a 4 °C e os pellets resultantes submetidos à liofilização “overnight” e armazenado a -80 °C.

#### **1.4 - Solubilização e dessalinização**

Os precipitados obtidos através da precipitação com TCA 10% foram solubilizados em tampão de solubilização (7 M ureia, 2 M tiourea, 50 mM DTT, 4% CHAPS) de acordo com a metodologia proposta por HURKMAN E TANAKA (1986). Após a solubilização, as amostras foram submetidas à dessalinização com auxílio de colunas Amicon<sup>®</sup>Ultra (Millipore), com membrana de intervalo de exclusão de 3.000 a 10.000 Da.

Após a dessalinização, a qualidade das proteínas extraídas (1  $\mu g$ ) foi avaliada em gel SDS-PAGE 12,5% (LAEMMLI, 1970), juntamente com uma amostra padrão de BSA (1  $\mu g$ ) e as proteínas quantificadas pelo método de BRADFORD (1976), tendo então uma análise visual e comparativa do gel.

### **1.5 - Quantificação das proteínas**

A concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada em triplicata, através do kit *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad, California, USA). Após a quantificação, um “pool” representativo de cada grupo foi preparado.

### **1.6 - Digestão das proteínas**

Para cada grupo de proteínas quantificadas, foram preparadas três replicatas técnicas separadamente. Inicialmente, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de cada *pool* foram desnaturados com 0,2% de RapiGest SF em água (RapiGest SF, Waters, Illinois, EUA) e incubadas por 15 min a 80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (pulso), e 2,5  $\mu\text{L}$  de DTT 100mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK) foram adicionados. As amostras foram aquecidas a 60 °C por 30 min, resfriadas à temperatura ambiente e novamente centrifugadas (pulso). Em seguida, adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de IAA 300 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK). As amostras foram incubadas por 30 min, à temperatura ambiente, no escuro. A digestão foi realizada por meio da adição de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de tripsina (Promega, Wisconsin, EUA) preparada em 50 mM de bicarbonato de amônio, a uma razão de 1:100 enzima:proteína (v/v) e a amostra foi então incubada a 37 °C durante 16 h. Após a digestão, realizou-se a hidrólise do RapiGest SF, por meio da adição de 10  $\mu\text{L}$  de TCA 5%. As amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos, e na sequência, foram centrifugadas a 14.000xg, por 30 min a 6 °C. O sobrenadante foi transferido para frascos de vidro (*total recovery vial*, Waters, Millford, MA, EUA) ao qual foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amônio 1 N e 5  $\mu\text{L}$  do padrão interno de enolase 100  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  (Promega, SwissProt número de acesso - P00924). A digestão foi realizada de acordo com protocolo desenvolvido pelo



Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Departamento de Genética - Esalq/Uspp  
(ANEXO 1).

### **1.7 - Purificação dos peptídeos provenientes da digestão trípica**

Os peptídios obtidos da digestão trípica foram secos em “speed vac” e a partir desse ponto, as amostras foram passadas por uma coluna C18 de purificação (Zip Tip Reversed-Phase C18, P10, da *Millipore*) (ANEXO 2). Depois de purificadas, as amostras foram secas em “speed vac”, e mantidas a -80 °C até o momento das análises.

### **1.8 - Análise por LC - MSE**

As análises por LC-MSE do fluido intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, foram realizadas injetando-se 15 µL de cada amostra digerida (correspondente a 5 µg do total de proteínas digeridas,) no sistema de cromatografia líquida de ultra performance (“Ultra performance Liquid Chromatography – UPLC”) *nano*ACQUITY, com tecnologia 2D de fase reversa dupla (Waters). Essa técnica combina a separação das proteínas usando-se um pH 10, na separação da primeira dimensão e pH 2 na segunda dimensão, com auxílio de colunas de fase reversa (GILAR *et al.*, 2005). A primeira dimensão foi realizada em uma coluna XBridge BEH C18 (5 µm, 300 µm x 50 mm) (Waters). A eluição foi realizada usando-se 10 gradientes binários diferentes de 20 mM de formiato de amônio pH 10 e acetonitrila, a um fluxo de 2 µL/min. A proporção de acetonitrila da primeira até a décima fração variou de 7,4 a 65%. Os peptídeos eluídos da coluna da primeira dimensão foram diluídos em linha com 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila a um fluxo de 20 µL/min e capturados por uma

coluna C18 Symmetry (5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) (Waters). A separação, na segunda dimensão, foi realizada em uma coluna HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 100 mm) (Waters), usando-se um gradiente binário de 7 a 40% de acetonitrila, em 0,1% (v/v) de ácido fórmico durante 54 min., a um fluxo de 400 nL/min.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) Synapt MS, equipado com uma fonte *nanolockspray* operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK). Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo "V", com resolução mínima de 12500. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana a 200  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  e a mesma solução foi empregada para o "*lockmass*" utilizando-se íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo MSE (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trapdo* 'T-wave' CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de 50 e 2000  $m/z$ .

Todavia, o *offset* RF do analisador quadrupolar foi ajustado para que permitisse a transmissão apenas de massas acima de 300  $m/z$ , de forma a assegurar que todas as massas inferiores a esse intervalo fossem oriundas, exclusivamente, de dissociações na câmara de colisão.

O processamento dos espectros e a busca em bancos de dados disponíveis foram realizados com auxílio do ProteinLynx Global Server v.2.5 (PLGS). O banco de dados utilizado foram *Insecta* e *Spodbbase*. O banco de dados foi anexado ao banco de dados original para avaliação da taxa de falsos positivos, definida a uma margem de até 10%.

Nessas análises, os parâmetros de tolerância utilizados foram: mínimo de íons fragmentos consecutivos ( $y+$ ,  $b+$ ), por peptídeo, igual a 2; mínimo de fragmentos consecutivos, por proteína, igual a 5; mínimo peptídeos (identificados pelos critérios anteriores), por proteína, igual a 1 e apenas uma clivagem perdida foi permitida. A carbamidometil-C e a oxidação de Metionina foram padronizadas como modificações fixa e variável, respectivamente.

A indicação do padrão interno foi realizada a partir do número de acesso no banco de dados UniProtKB como P00924 e a concentração proteica desse, indicada no método de busca como sendo 100  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ . A linha de base aplicada em alta e baixa energia foi ajustada para processamento acima de 250 e 100 contagens, respectivamente. A janela de tempo de retenção foi automaticamente ajustada considerando-se uma largura por pico cromatográfico de 10% e 1500 contagens aplicadas para o processamento, acima da linha de base, após a deconvolução (SILVA *et al.*, 2006).

O processamento dos espectros, as medidas de intensidade tipicamente ajustadas, (de-isotopização e deconvolução multi-cargas, com tempos de retenção e massas exatas - EMRTs) foram realizadas em consideração às replicatas, através de experimentos com múltiplas injeções. Os EMRTs foram agrupados por seletividade e especificidade suficiente para uma precisão de massas de 10  $\text{ppm}$  (fragmentos) e 5  $\text{ppm}$  (precursores), com 0,25 min de tolerância de tempo (valor suficiente para encontrar no mínimo 15 pontos por pico cromatográfico acima de 10% da linha de base). O alinhamento de íons correspondentes aos de alta energia com os precursores de baixa energia, foi conduzida com aproximada precisão de 0,05 min. Para a identificação e quantificação proteica, as intensidades dos espectros obtidos foram calculadas por método estequiométrico, em detrimento ao padrão interno de concentração conhecida conforme a linearidade do método (SILVA *et al.*, 2006). E para que

uma proteína tenha sido quantificada é necessário a identificação de pelo menos 3 peptídeos prototípicos.

### **1.9 - Análise estatística das proteínas**

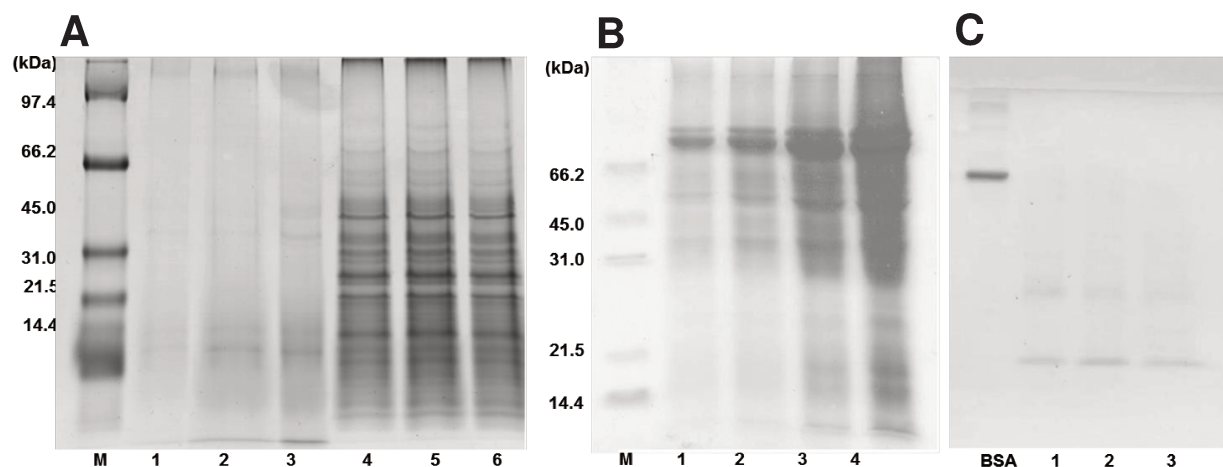
Somente as proteínas presentes, em duas ou mais replicatas, foram incluídas neste estudo. A análise estatística dos dados quantitativos foi feita por meio do *software* SPSS (PASW) 18.0. Inicialmente, uma análise descritiva calculou a média das replicadas e o *fold-change* (razão das médias de cada grupo). Os dados foram submetidos a uma análise de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como não foi encontrada uma distribuição normal dos dados, as análises foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e aplicado aos três grupos de estudo. As proteínas com um valor de  $p < 0,05$  foram analisadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

## IX – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **1 - Proteínas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda***

A qualidade das proteínas extraídas do fluido intestinal de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5%. As proteínas de *D. saccharalis* foram extraídas através de 3 diferentes protocolos. Já as proteínas do fluido intestinal de *S. frugiperda* foram extraídas apenas com o protocolo baseado em TCA. Em relação a *D. saccharalis*, a extração baseada em fenol foi mais eficiente no isolamento de proteínas com o massa molecular abaixo de 45 kDa (Figura 27 A). A extração baseada em PBS por sua vez foi mais eficiente no isolamento de proteínas com massa molecular superior a 45 kDa (Figura 27 B). Para a extração com TCA não foram analisadas concentrações maiores que 1 µg devido a falta de material. No entanto, nota-se que o isolamento de proteínas foi similar ao observado para a extração com fenol. Para *S. frugiperda*, a extração com TCA apresentou um padrão de proteínas similar ao encontrado para *D. saccharalis*.

Por fim, amostras provenientes dos diferentes métodos de extração foram submetidas ao sequenciamento e identificação de peptídeos.

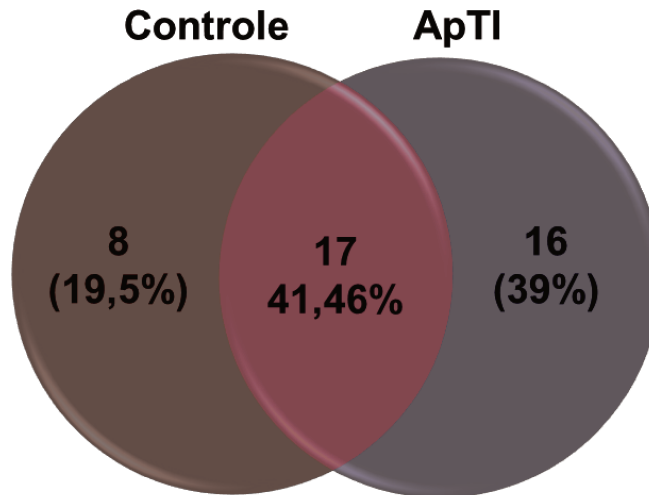


**Figura 27:** SDS-PAGE a 12,5% mostrando a qualidade das proteínas extraídas: (A) proteínas de intestino total de *D. saccharalis* extraídas com fenol; M: marcador de massa molecular, poços 1-6 mostram as diferentes concentrações de proteínas utilizadas (1, 2, 3, 10, 20, 30  $\mu\text{g}$ ); (B) proteínas de intestino total de *D. saccharalis* extraídas com PBS; M: marcador de massa molecular, poços de 1-4 mostram as diferentes concentrações de proteínas utilizadas (2, 5, 15, 30  $\mu\text{g}$ ); (C) proteínas de intestino total de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* extraídas com TCA. BSA: amostra padrão (1  $\mu\text{g}$ ), poço 1 e 2: proteínas do fluido intestinal de *D. saccharalis* (1  $\mu\text{g}$ ) e 3: proteínas do fluido intestinal de *S. frugiperda* (1  $\mu\text{g}$ ).

## 2 - Identificação de proteínas

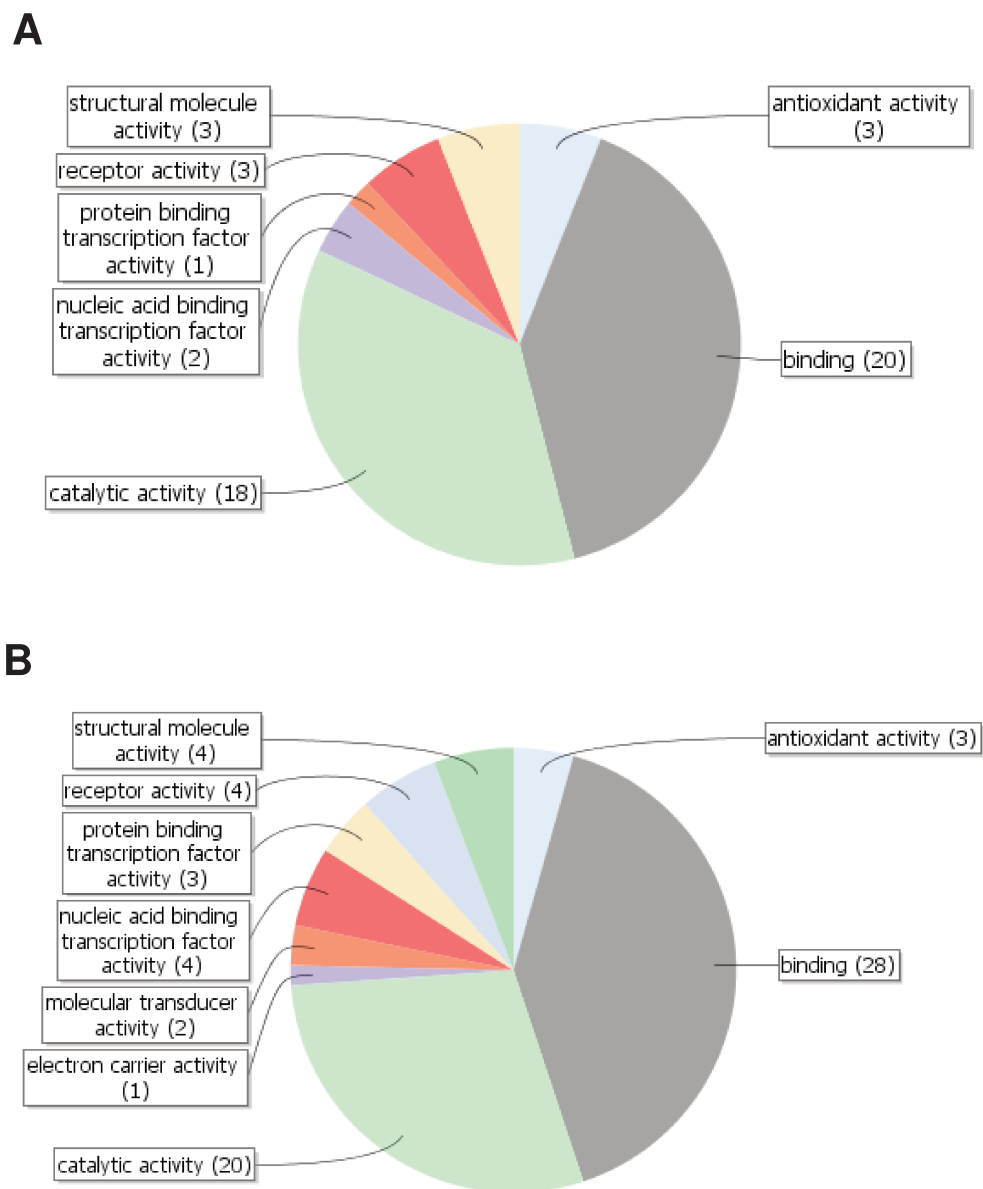
Para *D. saccharalis* realizou-se experimentos combinando três metodologias de extração distintas e dois equipamentos de sequenciamento diferentes. Entretanto, não foi possível a identificação de proteínas em níveis satisfatórios e com confiabilidade para este inseto.

Para *S. frugiperda*, foram identificadas 41 proteínas (Tabelas 2 e 3). Dentre elas, 8 foram identificadas exclusivamente no grupo controle (19,5%), 16 exclusivamente no grupo tratado com ApTI (39%) e 17 estavam presentes em ambos os tratamentos (41,46%). Esse resultado foi utilizado na construção de um Diagrama de Venn (Figura 28).



**Figura 28:** Diagrama de Venn demonstrando a distribuição das proteínas identificadas pela análise por MSE entre os grupos de estudo: proteínas do fluido intestinal de *S.frugiperda* alimentadas em dieta controle e proteínas do fluido intestinal de *S.frugiperda* alimentadas em dieta contendo 0,5% (p/p) de ApTI.

Um estudo funcional das proteínas identificadas foi realizado utilizando-se o programa Blast2GO. O grupo controle apresentou suas proteínas anotadas em grupos de funções moleculares: 18 proteínas com atividade catalítica, 20 proteínas de ligação, 3 com atividade antioxidante, 3 com atividade molecular estrutural, 3 proteínas com atividade receptora, 1 proteína ligante a fatores de transcrição, 2 proteínas de ligação a ácido nucleico e fatores de transcrição. O grupo alimentado com ApTI apresentou proteínas anotadas em grupos de funções moleculares: 20 proteínas com atividade catalítica, 28 com função de ligação, 3 com atividade antioxidante, 4 com atividade molecular estrutural, 4 com atividade receptora, 3 proteínas ligantes a fatores de transcrição, 4 proteínas de ligação a ácido nucleico e fatores de transcrição, 2 com atividade de transdução molecular e 1 com atividade carreadora de elétrons



**Figura 29:** Classificação das funções moleculares das proteínas anotadas do fluido intestinal de *S. frugiperda* alimentadas até o 4º ínstar; (A) Larvas de *S. frugiperda* alimentadas em dieta controle e (B) em dieta contendo 0,5% de ApTI.



**Tabela 2:** Proteínas identificadas no fluido do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* do grupo controle: todas as proteínas com valor de *score* de identificação e o valor de *p* (<0,05). As proteínas estão listadas por valores decrescentes de *score*. Acesso da proteína em vermelho (exclusivas ao tratamento controle).

<b>Protein Acess</b>	<b>Protein names</b>	<b>Function</b>	<b>Score</b>
Q86M89	Chymotrypsin	Serine-type endopeptidase activity	13179,37
C4PFX2	Trypsin	Serine-type endopeptidase activity	11666,26
M4Q0P2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase	3128,344
B0LUE1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase	2808,969
F8URE4	Fatty acid binding protein	Lipid binding/transporter activity	2287,296
B3F884	Trypsin-like serine peptidases	Serine-type endopeptidase activity	1987,653
I7FV58	Ubiquitin	Regulatory proteins	1761,525
Q71MT9	Ubiquitin	Regulatory proteins	1761,525
<b>I1SR90</b>	<b>Neutral digestive lipase</b>	<b>Hydrolase</b>	<b>1092,718</b>
<b>Q9IK79</b>	<b>GP37 protein</b>	<b>Chitin binding domain</b>	<b>1072,752</b>
<b>I0B5X1</b>	<b>REPAT32</b>	<b>Response to pathogens</b>	<b>644,3422</b>
<b>E0XN32</b>	<b>70 kDa heat shock protein</b>	<b>ATP binding/response to stress</b>	<b>633,0648</b>
R4V6T6	Heat shock protein 70	ATP binding/response to stress	633,0648
<b>I0B5V2</b>	<b>REPAT32</b>	<b>Resposta a patógenos</b>	<b>608,2378</b>
<b>A6YQV6</b>	<b>Beta-1,3-glucanase</b>	<b>Hydrolase activity</b>	<b>607,7974</b>
<b>C6KHW1</b>	<b>Heat shock cognate 70</b>	<b>ATP binding/response to stress</b>	<b>560,0862</b>
H8YI03	Nucleoside diphosphate kinase	Kinase/Transferase	503,2632
B3TEH3	Enolase	Lyase	468,6223
H9U5T8	Catalase	Oxidoreductase/Peroxidase	379,6555
E9NZS5	Arginine kinase	ATP binding	376,6315
M4PZR4	Arginine kinase	ATP binding	376,6315
<b>E9KH08</b>	<b>Triosephosphate isomerase</b>	<b>Triose-phosphate isomerase activity</b>	<b>350,1956</b>
Q8I866	Heat shock cognate 70 protein	ATP binding/response to stress	314,0258
C3RSN1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Oxidoreductase	275,0495
C8XTB1	Catalase	catalase activity/heme binding	256,9203

**Tabela 3:** Proteínas identificadas no fluido do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* do grupo tratado com ApTI: todas as proteínas com valor de *score* de identificação e o valor de *p* (<0,05). As proteínas estão listadas por valores de *score*. Acesso da proteína em vermelho (exclusivas ao tratamento com ApTI).

<b>Protein Access</b>	<b>Protein names</b>	<b>Function</b>	<b>Score</b>
C4PFX2	Trypsin	Serine-type endopeptidase activity	8592,262
Q86M89	Chymotrypsin	Serine-type endopeptidase activity	6868,187
I7FV58	Ubiquitin	Regulatory proteins	3424,466
Q71MT9	Ubiquitin Fragment	Regulatory proteins	3424,466
<b>M1JNQ9</b>	<b>Ubiquitin GP37 fusion protein</b>	<b>Regulatory proteins</b>	<b>2288,789</b>
M4Q0P2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase activity	2083,239
<b>E7D2J4</b>	<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	<b>Oxidoreductase activity</b>	<b>2059,577</b>
B0LUE1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Fragment	Oxidoreductase activity	1474,336
F8URE4	Fatty acid binding protein	Lipid binding/transporter activity	1379,586
B3F884	Trypsin like serine peptidases	Serine-type endopeptidase activity	1135,469
<b>E2F395</b>	<b>Heat shock protein 70 cognate</b>	<b>ATP binding/response to stress</b>	<b>1133,311</b>
R4V6T6	70 kDa heat shock protein	ATP binding/response to stress	1133,311
<b>I6T7S5</b>	<b>SP1</b>	<b>serine-type endopeptidase activity</b>	<b>833,2964</b>
<b>P58375</b>	<b>60S ribosomal protein L30</b>	<b>Ribosomal protein</b>	<b>751,2169</b>
E9NZZ5	Arginine kinase	ATP binding	629,4393
M4PZR4	Arginine kinase	ATP binding	629,4393
<b>I7G0X7</b>	<b>Profilin Fragment</b>	<b>Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton</b>	<b>562,9239</b>
B3TEH3	Enolase Fragment	Lyase	546,8003
C3RSN1	Superoxide dismutase Cu Zn	Oxidoreductase	409,5437
<b>J9XNY4</b>	<b>Cytochrome c</b>	<b>Electron carrier activity</b>	<b>404,4449</b>
H9U5T8	Catalase	Catalase activity/heme binding	388,8339
C8XTB1	Catalase Fragment	catalase activity/heme binding	384,9955
Q8I866	Heat shock cognate 70 protein	ATP binding/response to stress	325,2009
<b>O77248</b>	<b>Apolipoprotein 3</b>	<b>Lipid binding</b>	<b>309,1348</b>
H8YI03	Nucleoside diphosphate kinase	Kinase/Transferase	300,1822
<b>B9VUW0</b>	<b>Apolipoprotein III Fragment</b>	<b>Lipid binding</b>	<b>289,206</b>
Q963B7	60S ribosomal protein L9	rRNA binding	277,3967
I3V9Q0	IMD like protein	Defense response	232,9502
Q6US81	Acyl CoA Delta 11 desaturase	Pheromone biosynthetic process	195,4161
B1PHV7	Ecdysone receptor	Receptor	189,4421
Q0E500	16 8 kDa Rad50 like protein		189,1474
Q8MZV6	Acyl CoA desaturase SlitLPSQ	Oxidoreductase	128,2684
<b>B1PVV1</b>	<b>Ecdysone receptor Fragment</b>	<b>Receptor</b>	<b>106,9758</b>

## **2.1 - Proteínas identificadas em ambos os tratamentos**

Dentre as proteínas encontradas em ambos os tratamentos destacam-se serinopeptidases do tipo tripsina e quimotripsina. Esse resultado era esperado uma vez que são consideradas as principais enzimas digestivas presentes no intestino médio de lepidópteros e representam cerca de 95% da proteólise total (TERRA e FERREIRA, 1994; HERRERO *et al.*, 2005). Lepidópteros produzem e liberam serinopeptidases para o lúmen intestinal para digerir as proteínas alimentares que serão absorvidas. Além da digestão de proteínas, as serinopeptidases podem estar envolvidas em outros processos fisiológicos no intestino (TERRA e FERREIRA, 1994). Broehan *et al.* (2007) relataram uma quimotripsina de *Manduca sexta* envolvida na ativação da síntese de quitina, que é necessária para a formação da matriz peritrófica. Tripsinas e quimotripsinas foram identificadas em abundância no intestino de *M. sexta* neste trabalho. Estas mesmas enzimas também foram identificadas em análises proteômicas no lepidópteros *S. litura* e *Bombyx mori* (LIU *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2012) e do bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Em relação ao metabolismo de carboidratos, foram identificadas duas enzimas fundamentais envolvidas na via glicolítica: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enolase. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é responsável por converter o substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato tratando-se de uma reação de oxido-redução/fosforilação complexa. A enolase também chamada de 2-fosfo-D-glicerato hidrolase é uma enzima chave da via glicolítica responsável por catalisar a interconversão de 2-fosfo-D-glicerato (2-PG) e fosfoenolpiruvato (FEP) entre os caminhos da glicólise e gliconeogênese. Resultados semelhantes foram observados por Liu *et al.* (2010) onde estas enzimas chaves da via glicolítica foram identificadas abundantemente junto a outras proteínas participantes da via. Os autores sugerem que os níveis elevados de expressão

destas enzimas indicam que a via das pentoses fosfato pode ser essencial para utilização de carboidratos no intestino médio de larvas de *S. litura*. A existência destas enzimas glicolíticas essenciais identificadas no intestino das larvas de *S. frugiperda* sugerem que a via da glicose é muito ativa na conversão de carboidratos durante a etapa de alimentação destes insetos.

Em relação ao metabolismo de proteínas e aminoácidos, foram identificadas proteínas ubiquitinas, as quais são relacionadas ao proteassoma. Proteassomas são grandes complexos de proteínas e sua função principal é degradar proteínas em pequenos polipeptídios. Proteínas a serem degradadas são marcadas pela ubiquitina através de ligases de ubiquitina, este sistema ubiquitina-proteassoma é essencial para muitos processos celulares, incluindo o ciclo celular, a regulação da expressão gênica e respostas ao estresse oxidativo (MYKLES, 1998). A presença destas enzimas do sistema ubiquitina-proteassoma indicam que a degradação de proteínas é ativada em células epiteliais do intestino de *S. frugiperda* durante a fase de alimentação.

Em relação ao metabolismo de lipídios somente uma proteína de ligação a ácidos graxos foi identificada. Uma proteína semelhante foi clonada e caracterizada do intestino médio de *Spodoptera litura* por Huang *et al.* (2012). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que essa proteína desempenha um papel importante na captação e transporte de ácidos graxos no intestino médio durante os estágios de alimentação.

Entre as proteínas mais abundantemente identificadas, estão aquelas relacionadas à resistência contra estresse. Foram identificadas proteínas Heat shock (HSPs) no fluido intestinal de *S. frugiperda*. Altos níveis de proteínas heat shock podem ser desencadeados pela exposição a temperaturas elevadas e diferentes tipos de condições de estresse ambiental, tais como infecção, inflamação, exercício, toxinas, fome, a hipóxia, deficiência de

nitrogênio ou privação de água e ao sistema imunológico (NISHIKAWA *et al.*, 2008). Entretanto, o papel das heat shock 70 no intestino de insetos ainda não está totalmente esclarecido (LIU *et al.*, 2010).

Grandes quantidades da proteína arginina quinase também foram identificadas no fluido intestinal de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com ApTI. Estas são consideradas proteínas de manutenção, pois são constitutivas e altamente expressas em células, proporcionando as funções básicas essenciais para o crescimento e sobrevivência celular. Portanto, é esperada a identificação dessas proteínas na maioria das células do epitélio de intestino médio (SCHARLAKEN *et al.*, 2008).

Em relação ao metabolismo de nucleotídeos foi identificada uma nucleosídeo difosfato quinase, enzima presente em altas concentrações e relacionada à respiração celular em condições aeróbicas. Catalases e superoxidase dismutases são relacionadas ao estresse oxidativo e também foram identificadas. Dessa maneira podemos concluir que todas as proteínas identificadas no fluido intestinal de *S. frugiperda* possuem funções biológicas essenciais ao processo digestivo e manutenção destes insetos. Ao realizarmos o fracionamento das amostras e quantificarmos os níveis de expressão dessas proteínas, poderemos analisar de forma mais precisa o efeito do inibidor ApTI no processo antimetabólico desses insetos.

## **2.2 - Proteínas exclusivas identificadas no grupo controle**

No grupo controle foram identificadas 8 proteínas exclusivas: 2 Repat 32, 1 Beta-1,3-glucanase, 1 lipase digestiva neutra, 1 proteína GP 37, 1 trifosfato isomerase e 2 proteínas heat shock.

O intestino de larvas de insetos está permanentemente em contato com microrganismos e fatores de virulência. Por esta razão, as larvas desenvolveram vários mecanismos para detectar estes microrganismos potencialmente nocivos e bloquear sua ação. Estes mecanismos de resposta de defesa incluem, entre outros, a secreção de lisozimas, a produção local de peptídeos antimicrobianos (CHENG *et al.*, 2006; FREITAK *et al.*, 2007), a síntese de espécies reativas de oxigênio (BUCHON *et al.*, 2009), fagocitose de células (STUART e EZEKOWITZ, 2005) e apoptose celular (BLISSARD e ROHRMANN, 1990). Estudos realizados por Navarro-Cerrillo *et al.* (2013) com *Spodoptera exigua*, identificaram um grupo de proteínas cuja expressão responde a intoxicação por toxinas. Algumas destas proteínas denominadas REPAT (resposta a patógeno) tiveram suas expressão induzidas em resposta a toxinas Cry e outros patógenos microbianos (HERRERO *et al.*, 2007). Duas proteínas (REPAT 32) foram identificadas no fluido intestinal de *S. frugiperda*, provavelmente expressa mediante a exposição do inseto a microrganismos ou fatores virais.

Em nosso estudo, a enzima Beta-1,3-glucanase foi identificada no fluido intestinal de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial. Beta-1,3-glucanase são enzimas encontradas em bactérias, fungos, plantas e invertebrados, são endo ou exo-glucanases da família de 16 glicosídeo hidrolases (DAVIES e HENRISSAT, 1995). Beta-1,3-glucanases de insetos estão evolutivamente relacionada além de serem semelhantes em sequência às proteínas de ligação a bactérias gram-negativas (GNBP), que agem como proteínas de reconhecimento de moléculas associadas a patógenos. Bragatto *et al.* (2010) identificaram uma proteína de 40 kDa de ligação a 1,3-glucano com sequência similar já previamente caracterizada em hemolinfa de lepidópteros, entretanto essa 1,3-glucanase não foi detectada na hemolinfa, e sim expressa no intestino quando as larvas se alimentam de uma dieta contendo bactéria.

Dentre as proteínas exclusivas do controle, uma lipase digestiva neutra foi identificada. As lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis resultando na liberação de ácidos graxos. As do tipo neutra apresentam uma ampla faixa de estabilidade ao pH e são relativamente estáveis a altas temperaturas. FILIETAZ, 2011 realizou um trabalho com lipases de *Aedes aegypti*, as quais foram consideradas lipases neutras por serem estáveis a uma faixa de pH de 8,5 a 9,0. Análises de genoma e PCR semi quantitativo comprovaram a expressão diferencial dessas enzimas como sendo de uma família mutagênica envolvidas na expressão de lipases digestivas provavelmente reguladas por dietas.

Uma proteína de ligação à quitina GP37 foi encontrada em nossas análises do fluido intestinal de *S. frugiperda*. Li *et al.*(2003) caracterizaram uma proteína ligante a quitina (GP37) de multicapsid nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera litura* (SpltMNPV). Em outro estudo, Cheng *et al.* (2001) sugerem que proteínas GP37 podem vincular-se de uma forma ainda desconhecida à quitina da membrana peritrófica facilitando à infecção pelo vírus nas células epiteliais do intestino.

Duas enzimas fundamentais envolvidas na via glicolítica em ambos os tratamentos foram identificadas: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enolase, como descritas anteriormente. Entretanto, outra enzima exclusiva da via glicolítica, a triose-fosfato isomerase, foi identificada exclusivamente no grupo controle. Esta enzima é responsável por catalisar a interconversão reversível de diidroxiacetona fosfato e D-gliceraldeído-3-fosfato, sendo essencial para uma produção eficiente de energia.

### **2.3 - Proteínas exclusivas identificadas no grupo tratado com ApTI**

No grupo tratado foram identificadas 16 proteínas exclusivas: 1 proteína GP37, 1 serinopeptidases, 1 profilina, 1 citocromo c, 2 apolipoporphin, 3 proteínas ribossomais 60S, uma proteína IMD, 2 Acil CoA desaturase, 2 receptores Ecdysone, 1 proteína Rad 50, 1 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e 2 heat shock, (As proteínas heat shock, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GP37 e serinopeptidases não serão descritas, uma vez que foram descritas e identificadas como exclusivas somente pela diferença no código de acesso).

Apolipoporphin-3 é uma proteína transportadora de lipídeos presente na hemolinfa dos insetos. Ele tem como função auxiliar no transporte de diacilglicerol na hemolinfa desempenhando um papel fundamental no transporte de lipídios (KIM *et al.*, 1998). Halwai *et al.* (2001) identificaram níveis máximos de apolipoporphin-3 em hemolinfa de *Galleria mellonella* no último instar larval. Estes dados são consistentes com os resultados observados em nosso estudo, uma vez que os intestinos de *S. frugiperda* analisados foram dissecados no último instar.

Dentre as proteínas exclusivas, identificou-se a presença de um citocromo c. Trata-se de uma proteína solúvel, ao contrário de outros citocromos, sendo um componente essencial da cadeia transportadora de elétrons. Liu *et al.* (2010) identificaram quinze peptídeos de citocromo p450 no intestino de *Spodoptera litura*, sugerindo o envolvimento destas na metabolização de compostos exógenos durante a muda e metamorfose dos insetos, uma vez que o citocromo p450 é uma família de enzimas envolvidas no metabolismo detox de um grande número de compostos endógenos e exógenos (GUENGERICH, 2008).

Uma proteína denominada IMD foi identificada em nossas análises. Em estudos realizados com *Drosophila melanogaster*, foram identificadas proteínas IMD relacionadas a



respostas imunológicas a infecções bacterianas (FERRANDON *et al.*, 2007) e infecções virais (COSTA *et al.*, 2009). Entretanto, até o momento, homólogos do gene *Imd* não foram relatados em espécies de Lepidoptera. Pascual *et al.* (2012) identificaram em *S. exíqua*, ortólogos hipotéticos do gene *Imd* de *D. melanogaster* com base na identidade de sequência, sugerindo que este possivelmente exerce papel funcional semelhante em Lepidoptera.

A ecdisona também identificada em nossas análises, é um receptor nuclear encontrado em artrópodes, controlando o desenvolvimento e contribuindo para outros processos tais como a reprodução. O receptor é um heterodímero não-covalente de duas proteínas: a proteína EcR e proteína ultraspiracle (USP). Elas ligam-se e se ativam por meio de ecdisteroides (hormônio de crescimento de insetos). Receptores de ecdisona em insetos são atualmente mais bem caracterizados do que os de outros artrópodes, e ecdisteroides sintéticos são comercialmente utilizados como inseticidas para controlar insetos-praga (SWEVERS *et al.*, 2008).

Dentre as demais proteínas identificadas também estão às proteínas ribossomais 60S, enzima Acil-CoA desaturase (enzima que remove dois átomos de hidrogênio de um ácido graxo criando uma dupla ligação carbono/carbono), proteínas Rad 50 (proteínas envolvidas na replicação, recombinação, e reparo do DNA) e profilina (se ligam à actina e afeta a estrutura do citoesqueleto). Em concentrações elevadas, a profilina impede a polimerização da actina.



## X – CONCLUSÕES

1) A proteína ApTI mostrou-se uma boa candidata para o controle da broca-da-cana por apresentar:

- Propriedades antinutricionais;
- Resistência à digestão pelas peptidases intestinais;
- Potente atividade inibitória frente às principais peptidases do inseto;
- Atividade inibitória mantida ao longo de gerações consecutivas, sem indícios de respostas adaptativas.

2) Estudos realizados com *S. frugiperda* deram indicativos de que a espécie foi capaz de se adaptar à presença de ApTI em dieta artificial, como já reportado para outros inibidores de peptidases;

3) Análises proteômica identificaram uma série de proteínas relacionadas ao processo digestivo e estresse em insetos:

- Foram identificadas 41 proteínas distintas em fluido intestinal de *S. frugiperda*;
- Parte das proteínas identificadas foram exclusivas a um dos grupos analisados, e outra parte foi identificada em ambos;

Os trabalhos com inibidores de peptidases vêm despertando grande interesse, principalmente por seu potencial biotecnológico no controle biológico de pragas. Este trabalho apresenta o potencial do ApTI no controle de *D. saccharalis* e os possíveis efeitos desencadeados durante a adaptação de *S. frugiperda* contra IPs. Nosso intuito foi fornecer novas informações que possibilitem a implementação de novas estratégias para utilização de IPs no controle biológico de pragas.



## **XI - PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Determinar as diferenças relacionadas aos níveis de expressão de proteínas entre os grupos controle e alimentados com ApTI;
- Análises de fracionamento e sequenciamento para a obtenção de informações acerca de alterações no proteoma dos insetos em consequência da presença do inibidor ApTI em dieta artificial;
- Identificar as vias metabólicas onde proteínas diferencialmente expressas participam;



## XI – REFERÊNCIAS

ABDEEN, A.; VIRGOS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILES, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant molecular biology**, v. 57, n. 2, p. 189-202, 2005. ISSN 0167-4412.

AGRAWAL, A. A. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. **Functional Ecology**, v. 25, n. 2, p. 420-432, 2011. ISSN 1365-2435.

ALVES, D. T.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; FARIAS, L. R.; DIAS, S. C.; CHIARELLO, M. D.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O. L. Identification of four novel members of Kunitz-like  $\alpha$ -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 3, p. 166-172, 2009. ISSN 0048-3575.

ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS letters**, v. 480, n. 1, p. 25-31, 2000. ISSN 0014-5793.

ANDREWS, R. E.; FAUST, R. M.; WABIKO, H.; RAYMOND, K. C.; BULLA, L. A. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. **Critical reviews in biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 163-232, 1987. ISSN 0738-8551.

ARIMURA, G.-I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 5, p. 911-923, 2009. ISSN 0032-0781.

BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; RANGASAMY, P.; EBENEZER, E.; VIDHYASEKARAN, P. *Alternaria alternata* toxin detection by fluorescence derivatization and separation by high performance liquid chromatography. **Phytoparasitica**, v. 31, n. 1, p. 61-68, 2003. ISSN 0334-2123.

BABU, S. R.; SUBRAHMANYAM, B. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 3, p. 349-358, 2010. ISSN 0048-3575.

BALDWIN, I. T.; PRESTON, C. A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, n. 2, p. 137-145, 1999. ISSN 0032-0935.

BALDWIN, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. **Natural Product Reports**, v. 12, n. 1, p. 33-44, 1995. ISSN 0265-0568.

BANTSCHIEFF, M.; SCHIRLE, M.; SWEETMAN, G.; RICK, J.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017-1031, 2007. ISSN 1618-2642.

BAYÉS, A.; COMELLAS-BIGLER, M.; DE LA VEGA, M. R.; MASKOS, K.; BODE, W.; AVILES, F. X.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J.; VENDRELL, J. Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 46, p. 16602-16607, November 15, 2005 2005.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. Springer, 1994. ISBN 0412031310.

BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR LEIGHTON, S.; BABU, C. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 145, n. 4, p. 669-77, May 2007. ISSN 1532-0456.

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annu Rev Entomol**, v. 35, p. 127-55, 1990. ISSN 0066-4170

BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1453-1466, 1993. ISSN 0031-9422.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 7, p. 625-638, 1997. ISSN 0965-1748.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, v. 29, n. 3, p. 278-290, 2004. ISSN 1365-3032.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697.

BRAGA, D. P.; ARRIGONI, E. D.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, v. 5, n. 2-3, p. 209-221, 2003. ISSN 1522-886X.

BRAGATTO, I.; GENTA, F. A.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Characterization of a beta-1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to beta-glucan-binding proteins. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 12, p. 861-72, Dec 2010. ISSN 1879-0240 (Electronic).

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007. ISSN 0965-1748.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 2, p. 107-116, 1995. ISSN 0022-1910.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996. ISSN 1520-6327.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n. 10, p. 827-833, 1986. ISSN 0022-1910.



BROCK, F.; FORSBERG, C.; BUCHANAN-SMITH, J. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 3, p. 561-569, 1982. ISSN 0099-2240.

BROEHAN, G.; ZIMOCHE, L.; WESSELS, A.; ERTAS, B.; MERZENDORFER, H. A chymotrypsin-like serine protease interacts with the chitin synthase from the midgut of the tobacco hornworm. **Journal of experimental biology**, v. 210, n. Pt 20, p. 3636-43, Oct 2007. ISSN 0022-0949 (Print).

BROOKS, G.; WHITTAKER, J. Responses of three generations of a xylem-feeding insect, *Neophilaenus lineatus* (Homoptera), to elevated CO<sub>2</sub>. **Global Change Biology**, v. 5, n. 4, p. 395-401, 1999. ISSN 1365-2486.

BUCHON, N.; BRODERICK, N. A.; POIDEVIN, M.; PRADERVAND, S.; LEMAITRE, B. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 2, p. 200-11, Feb 19 2009. ISSN 1934-6069 (Electronic)

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, Supplement 1, n. 0, p. S68-S74, 3// 2013. ISSN 0022-2011.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L. A. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. **Molecular & cellular proteomics**, v. 2, n. 1, p. 19-28, 2003. ISSN 1535-9476.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CAPELI, M. J. **Manejo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), na cultura de cana-de-açúcar**. 2012. Faculdade de Tecnologia "Shunji Nishimura" Pompéia

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002. ISSN 0041-0101.

CHENG, T.; ZHAO, P.; LIU, C.; XU, P.; GAO, Z.; XIA, Q.; XIANG, Z. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. **Genomics**, v. 87, n. 3, p. 356-65, Mar 2006. ISSN 0888-7543 (Print).

CHENG, X.; KRELL, P.; ARIF, B. P34.8 (GP37) is not essential for baculovirus replication. **J Gen Virol**, v. 82, n. Pt 2, p. 299-305, Feb 2001. ISSN 0022-1317 (Print).

CHRISTELLER, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS Journal**, v. 272, n. 22, p. 5710-5722, 2005. ISSN 1742-4658.

CHRISTELLER, J. T.; BURGESS, E. P.; METT, V.; GATEHOUSE, H. S.; MARKWICK, N. P.; MURRAY, C.; MALONE, L. A.; WRIGHT, M. A.; PHILIP, B. A.; WATT, D. The expression of a mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. **Transgenic research**, v. 11, n. 2, p. 161-173, 2002. ISSN 0962-8819.

CILIA, M.; FISH, T.; YANG, X.; MCLAUGHLIN, M.; THANNHAUSER, T. W.; GRAY, S. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins. **J Biomol Tech**, v. 20, n. 4, p. 201-15, Sep 2009. ISSN 1943-4731 (Electronic).

COSTA, A.; JAN, E.; SARNOW, P.; SCHNEIDER, D. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7436, 2009. ISSN 1932-6203.

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

DA SILVA FORTUNATO, F.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science**, v. 80, n. 4, p. 241-247, 2007. ISSN 1612-4758.

DAMLE, M. S.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree). **Phytochemistry**, v. 66, n. 22, p. 2659-67, Nov 2005. ISSN 0031-9422 (Print).

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-833, 2001. ISSN 0028-0836.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995. ISSN 0969-2126.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; RUGGIERO CECI, L.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 6, p. 593-602, 2001. ISSN 0965-1748.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M. A.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of a low and high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 119, n. 2, p. 997-1004, 1998.

DE LEO, F.; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 489-496, 2002. ISSN 0965-1748.

DELMAR, E. G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Analytical Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 316-320, 1979. ISSN 0003-2697.

DU, L.; GE, F.; ZHU, S.; PARAJULEE, M. N. Effect of cotton cultivar on development and reproduction of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and its predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 4, p. 1278-1283, 2004. ISSN 0022-0493.

DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016-15021, August 24, 2010 2010.

ERLANDSON, M. A.; HEGEDUS, D. D.; BALDWIN, D.; NOAKES, A.; TOPRAK, U. Characterization of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larval midgut protease complement and adaptation to feeding on artificial diet, Brassica species, and protease inhibitor. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 75, n. 2, p. 70-91, 2010. ISSN 1520-6327.

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-8, Nov 1961. ISSN 0003-9861.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003. ISSN 0981-9428.

FAN, S.-G.; GUO-JIANG, W. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 2005.

FERRANDON, D.; IMLER, J. L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 11, p. 862-74, Nov 2007. ISSN 1474-1741 (Electronic)

FERREIRA, C.; CAPELLA, A. N.; SITNIK, R.; TERRA, W. R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, n. 4, p. 631-640, 4// 1994. ISSN 0300-9629.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004. ISSN 0958-1669.

FILIETAZ, C. F. T. **Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases**. 2011. Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FREITAK, D.; WHEAT, C. W.; HECKEL, D. G.; VOGEL, H. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. **BMC Biol**, v. 5, p. 56, 2007. ISSN 1741-7007 (Electronic).

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, JRP; ZUCCHI, RA; ALVES, SB; VENDRAMIN, JD; MARCHINI, LC; LOPES, JRS; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. GAZZONI, DL; YORINORI, JT Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 128 p.(Manuais de Identificação de Pragas e Doenças, n. 1). 2002.

GAO, F.; ZHU, S.-R.; SUN, Y.-C.; DU, L.; PARAJULEE, M.; KANG, L.; GE, F. Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and cotton cultivar on tri-trophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii*, and *Propylaea japonica*. **Environmental entomology**, v. 37, n. 1, p. 29-37, 2008. ISSN 0046-225X.

GATEHOUSE, A. M.; GATEHOUSE, J. A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A. M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 10, p. 948-958, 1979. ISSN 1097-0010.

GATEHOUSE, J. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409-416, 2011. ISSN 1389-2037.

GILAR, M.; OLIVOVA, P.; DALY, A. E.; GEBLER, J. C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **J Sep Sci**, v. 28, n. 14, p. 1694-703, Sep 2005. ISSN 1615-9306 (Print).

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÈGUE, M.-H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229-237, 1998. ISSN 0965-1748.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; KU, M. S.; GUPTA, V. S.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; FRANCESCHI, V. R. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 523-532, 2003. ISSN 0031-9422.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002. ISSN 1092-2172.

GREEN, T.; RYAN, C. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 776-777, 1972. ISSN 0036-8075.

GREENBLATT, H. M.; RYAN, C. A.; JAMES, M. N. Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution. **J Mol Biol**, v. 205, n. 1, p. 201-28, Jan 5 1989. ISSN 0022-2836 (Print).

GRUDEN, K.; KUIPERS, A. G. J.; GUNČAR, G.; SLAPAR, N.; ŠTRUKELJ, B.; JONGSMA, M. A. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 365-375, 2004. ISSN 0965-1748.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 70-83, Jan 2008. ISSN 0893-228X (Print).

HALWANI, A. E.; NIVEN, D. F.; DUNPHY, G. B. Apolipoprotein III in the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 48, n. 3, p. 135-43, Nov 2001. ISSN 0739-4462 (Print).

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, n. 1, p. 145-159, 2004. ISSN 0003-9861.

HERRERO, S.; ANSEMS, M.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; BAKKER, P. L.; DE MAAGD, R. A. REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 11, p. 1109-18, Nov 2007. ISSN 0965-1748 (Print).

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P. L.; MOAR, W. J.; DE MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, v. 6, p. 96, 2005. ISSN 1471-2164 (Electronic).

HILDER, V. A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. **Crop Protection**, v. 18, n. 3, p. 177-191, 1999. ISSN 0261-2194.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, n. 6144, p. 160-163, 1987. ISSN 0028-0836.

HOPFGARTNER, G.; VARESI, E. The life sciences mass spectrometry research unit. **Chimia (Aarau)**, v. 66, n. 5, p. 335-8, 2012. ISSN 0009-4293 (Print).

HU, X.; CHEN, L.; XIANG, X.; YANG, R.; YU, S.; WU, X. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 3427-34, Apr 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic).

HUANG, Z.; ZHOU, D.; GAO, G.; ZHENG, S.; FENG, Q.; LIU, L. CLONING AND CHARACTERIZATION OF A MIDGUT-SPECIFIC FATTY ACID BINDING PROTEIN IN *Spodoptera litura*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 1, p. 1-17, 2012. ISSN 1520-6327.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986. ISSN 0032-0889.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 3, p. 227-235, 2010. ISSN 0022-1910.

IBETO, C.; OFOEFULE, A.; AGBO, K. A global overview of biomass potentials for bioethanol production: a renewable alternative fuel. **Trends Appl Sci Res**, v. 6, p. 410-425, 2011.

INANAGA, H.; KOBAYASI, D.; KOUZUMA, Y.; AOKI-YASUNAGA, C.; IYAMA, K.; KIMURA, M. Protein engineering of novel proteinase inhibitors and their effects on the growth of *Spodoptera exigua* larvae. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2259-2264, 2001. ISSN 0916-8451.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; KHAN, M. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-34, 2012. ISSN 1568-7767.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 8041-8045, August 15, 1995 1995.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997. ISSN 0022-1910.

JONGSMA, M. A.; STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 331-333, 1996. ISSN 0167-7799.

KALLI, A.; SMITH, G. T.; SWEREDOSKI, M. J.; HESS, S. Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-Dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers. **Journal of proteome research**, 2013. ISSN 1535-3893.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.; BAXTER, K.; LAUE, G.; FELTON, G. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. **Oecologia**, v. 125, n. 1, p. 66-71, 2000. ISSN 0029-8549.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001. ISSN 0036-8075.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annu Rev Plant Biol**, v. 53, p. 299-328, 2002. ISSN 1543-5008 (Print).

KIM, E.; KIM, S. H.; CHOI, C. S.; PARK, Y. I.; KIM, H. R. Cloning and expression of apolipoprotein-III from the common cutworm, *Spodoptera litura*. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 39, n. 4, p. 166-73, 1998. ISSN 0739-4462 (Print).

KOIDE, T.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 417-431, 1973. ISSN 1432-1033.

KONUS, M.; KOY, C.; MIKKAT, S.; KREUTZER, M.; ZIMMERMANN, R.; ISCAN, M.; GLOCKER, M. O. Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**, v. 8, n. 2, p. 152-62, Jun 2013. ISSN 1878-0407 (Electronic).

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836.

LASKOWSKI JR, M. Protein inhibitors of serine proteinases—mechanism and classification. In: (Ed.). **Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods**: Springer, 1986. p.1-17. ISBN 1475700245.

LASKOWSKI JR, M.; QASIM, M. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1, p. 324-337, 2000. ISSN 0167-4838.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 5-6, 2002. ISSN 0717-3458.

LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* Trypsin Inhibitor Retains Its Native Structure and Function After Reducing Its Disulfide Bonds. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, n. 2, p. 276-284, 1994. ISSN 0022-2836.

LI, Z.; LI, C.; YANG, K.; WANG, L.; YIN, C.; GONG, Y.; PANG, Y. Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virus Res**, v. 96, n. 1-2, p. 113-22, Oct 2003. ISSN 0168-1702 (Print).

LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; JIANG, J.-H.; ZHAO, X.-J.; DU, L.-F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 4, p. 653-658, 2007. ISSN 0141-5492.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G.; LIENER, I. **Effect of Soybean Inhibitors on Growth**: ACS Publications 1954.

LIU, J.; ZHENG, S.; LIU, L.; LI, L.; FENG, Q. Protein profiles of the midgut of *Spodoptera litura* larvae at the sixth instar feeding stage by shotgun ESI-MS approach. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2117-47, May 7 2010. ISSN 1535-3907 (Electronic).

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 55, n. 3, p. 140-152, 2004. ISSN 1520-6327.

LOPES, A. R.; SATO, P. M.; TERRA, W. R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 3, p. 188-203, 2009. ISSN 1520-6327.

LWALABA, D.; HOFFMANN, K. H.; WOODRING, J. Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 1, p. 14-29, 2010. ISSN 1520-6327.

MACEDO, M.; DE SÁ, C.; FREIRE, M.; PARRA, J. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 9, p. 2533-40, May 2004. ISSN 0021-8561.

MACEDO, M.; PANDO, S.; CHEVREUIL, L.; MARANGONI, S. Properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds against digestive proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Protein Peptide Lett**, v. 16, n. 12, p. 1459-65, 2009. ISSN 1875-5305.

MACEDO, M. L. R.; DA S. ANDRADE, L. B.; MORAES, R. A.; XAVIER-FILHO, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 105, n. 1, p. 89-94, 1993. ISSN 0306-4492.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 4, p. 213-231, 2010. ISSN 1520-6327.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry & Molecular Biology**, v. 158, n. 2, p. 164-72, Feb 2011. ISSN 1879-1107.

MACHADO, S. W.; OLIVEIRA, C. F. R.; BEZERRA, C. S.; FREIRE, M. G. M.; KILL, M. R.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

MARCHETTI, S.; DELLEDONNE, M.; FOGHER, C.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; SAVAZZINI, F.; GIORDANO, A. Soybean Kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 4, p. 519-526, 2000. ISSN 0040-5752.

MCNALL, R. J.; ADANG, M. J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 10, p. 999-1010, 2003. ISSN 0965-1748.

MEDEIROS, A. H.; FRANCO, F. P.; MATOS, J. L.; DE CASTRO, P. A.; SANTOS-SILVA, L. K.; HENRIQUE-SILVA, F.; GOLDMAN, G. H.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. Sugarwin: A Sugarcane Insect-Induced Gene with Antipathogenic Activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 5, p. 613-624, 2012. ISSN 0894-0282.

MEDEIROS, A. H. D. **Identificação e caracterização de genes induzidos por *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 2008. Tese apresentada para o título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e melhoramento de plantas. Departamento de Genética, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba - SP.

MIGLIOLO, L.; DE OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; DE SALES, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 148-156, 2010. ISSN 1093-3263.

MOHAN BABU, R.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1071-1086, 2003. ISSN 0261-2194.

MORAES, M. C. B.; DO LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003. ISSN 0100-4042.

MORRIS, K.; LORENZEN, M. D.; HIROMASA, Y.; TOMICH, J. M.; OPPERT, C.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K.; JURAT-FUENTES, J. L.; FABRICK, J.; OPPERT, B. *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the coleopteran gut. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 8, p. 3889-3898, 2009. ISSN 1535-3893.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6605-6611, 2002. ISSN 0021-8561.

MYKLES, D. L. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. **Int Rev Cytol**, v. 184, p. 157-289, 1998. ISSN 0074-7696 (Print).

NAUEN, R.; SORGE, D.; STERNER, A.; BOROVSKY, D. TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 47, n. 4, p. 169-180, 2001. ISSN 1520-6327.



NAVARRO-CERRILLO, G.; HERNANDEZ-MARTINEZ, P.; VOGEL, H.; FERRE, J.; HERRERO, S. A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes in Lepidoptera: classification and expression analysis. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 164, n. 1, p. 10-7, Jan 2013. ISSN 1879-1107 (Electronic).

NELSON, M. E.; ALVES, A. P. Chapter 4 - Plant Incorporated Protectants and Insect Resistance. In: ONSTAD, D. W. (Ed.). **Insect Resistance Management (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.99-147. ISBN 978-0-12-396955-2.

NISHIKAWA, M.; TAKEMOTO, S.; TAKAKURA, Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. **Int J Pharm**, v. 354, n. 1-2, p. 23-7, Apr 16 2008. ISSN 0378-5173 (Print).

NOGUEIRA, F. C.; SILVA, C. P.; ALEXANDRE, D.; SAMUELS, R. I.; SOARES, E. L.; ARAGAO, F. J.; PALMISANO, G.; DOMONT, G. B.; ROEPSTORFF, P.; CAMPOS, F. A. Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2704-15, Aug 2012. ISSN 1615-9861 (Electronic).

OGUNWOLU, E.; REAGAN, T.; FLYNN, J.; HENSLEY, S. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.)(Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi on sugarcane yield in Louisiana. **Crop protection**, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1991. ISSN 0261-2194.

OLIVEIRA, C. F. R.; DE PAULA SOUZA, T.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M. C.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, n. 1, p. 19-25, 2013. ISSN 1096-4959.

OLIVEIRA, C. F. R.; VASCONCELOS, I. M.; APARICIO, R.; FREIRE, M. D. G. M.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 929-935, 2012. ISSN 1359-5113.

OLIVEIRA, M.; DE SIMONE, S.; XAVIER, L.; GUEDES, R. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2005. ISSN 1096-4959.

OPPERT, B.; ELPIDINA, E. N.; TOUTGES, M.; MAZUMDAR-LEIGHTON, S. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 280-287, 2010. ISSN 1744-117X.

PARRA, J.; MIHSFELDT, L. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. **Advances in insect rearing for research and pest management. Boulder, Westview Press, 519p**, p. 195-209, 1992.

PASCUAL, L.; JAKUBOWSKA, A. K.; BLANCA, J. M.; CANIZARES, J.; FERRE, J.; GLOECKNER, G.; VOGEL, H.; HERRERO, S. The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 8, p. 557-70, Aug 2012. ISSN 1879-0240 (Electronic).

PATANKAR, A. G.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; SAINANI, M. N.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases

explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 453-464, 2001. ISSN 0965-1748.

PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOS, A.; HECKEL, D. G.; PREISS, S. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. **J Proteome Res**, v. 7, n. 4, p. 1629-39, Apr 2008. ISSN 1535-3893 (Print).

PAULILLO, L. C.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J Econ Entomol**, v. 93, n. 3, p. 892-6, Jun 2000. ISSN 0022-0493.

PÉREZ-HEDO, M.; RIVERA-PEREZ, C.; NORIEGA, F. G. The insulin/TOR signal transduction pathway is involved in the nutritional regulation of juvenile hormone synthesis in *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 6, p. 495-500, 2013. ISSN 0965-1748.

PETEK, M.; TURNŠEK, N.; GAŠPARIČ, M. B.; NOVAK, M. P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N.; POPOVIČ, T.; ŠTRUKELJ, B.; JONGSMA, M. A. A Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 3, p. 153-181, 2012. ISSN 1520-6327.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.; TERRA, W.; PARRA, J.; FALCO, M.; SILVA-FILHO, M. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001. ISSN 1570-7458.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001. ISSN 0013-8703.

PRICE, P. W. **Insect ecology**. Wiley. com, 1997. ISBN 0471161845.

RAMOS, V.; SILVA, G.; FREIRE, M.; MACHADO, O.; PARRA, J.; MACEDO, M. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 23, p. 11348-55, Dec 2008. ISSN 1520-5118.

RAMOS, V. D. S. "**CLONAGEM, EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Inga laurina* EM RELAÇÃO AOS INSETOS PRAGAS *Diatraea saccharalis* E *Heliothis virescens***". 2013. Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

RAMOS, V. D. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L. O.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; DA SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R. P.; PEREIRA, G. A. G.; MACEDO, M. L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 156, n. 3-4, p. 148-158, 2012. ISSN 1532-0456.

RAMOS, V. S.; FREIRE, M.; PARRA, J.; MACEDO, M. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymeria foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 152, n. 2, p. 255-61, Feb 2009. ISSN 1531-4332.

RASMANN, S.; AGRAWAL, A. A. Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 473-478, 2009. ISSN 1369-5266.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M. L. R.; MAIA, G. M. C.; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin iso-inhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 872, n. 1-2, p. 134-140, 1986. ISSN 0167-4838.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425-449, 1990. ISSN 0066-4286.

SAADATI, F.; BANDANI, A. R. Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. **Journal of Insect Science**, v. 11, 2011.

SCHARLAKEN, B.; DE GRAAF, D. C.; GOOSSENS, K.; PEELMAN, L. J.; JACOBS, F. J. Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Dev Comp Immunol**, v. 32, n. 8, p. 883-9, 2008. ISSN 0145-305X (Print).

SCHMIDT, T. M.; BLEAKLEY, B.; NEALSON, K. H. Characterization of an Extracellular Protease from the Insect Pathogen *Xenorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2793-2797, November 1, 1988 1988.

SENTHILKUMAR, R.; CHENG, C.-P.; YEH, K.-W. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 65-75, 2010. ISSN 1467-7652.

SHARMA, H. C.; SUJANA, G.; MANOHAR RAO, D. Morphological and chemical components of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of pigeonpea. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 3, n. 3, p. 151-161, 2009/09/01 2009. ISSN 1872-8855.

SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; VISSERS, J. P.; GEROMANOS, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144-56, Jan 2006. ISSN 1535-9476 (Print).

SILVA, W.; FREIRE, M. D. G. M.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 257-263, 2012. ISSN 1359-5113.

SILVERSTEIN, R. M. W., F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. . 2000.

SINGH, B.; SINGH, S.; ADJADI, O. Bruchid resistance in cowpea. **Crop Science**, v. 25, n. 5, p. 736-739, 1985. ISSN 0011-183X.

SIQUEIRA, G. A. **Hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da liquinina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular.** 2011. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Dissertação apresentada à escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sep 2004. ISSN 1471-0072 (Print).

STEVENS, J. A.; DUNSE, K. M.; GUARINO, R. F.; BARBETA, B. L.; EVANS, S. C.; WEST, J. A.; ANDERSON, M. A. The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 43, n. 2, p. 197-208, Feb 2013. ISSN 1879-0240 (Electronic).

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 539-50, May 2005. ISSN 1074-7613 (Print).

SWEVERS, L.; SOIN, T.; MOSALLANEJAD, H.; IATROU, K.; SMAGGHE, G. Ecdysteroid signaling in ecdysteroid-resistant cell lines from the polyphagous noctuid pest *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 9, p. 825-833, 2008. ISSN 0965-1748.

TELANG, M.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P.; GUPTA, G. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 6, p. 643-652, 2003. ISSN 0031-9422.

TELES, R. C.; DE SOUZA, E. M.; CALDERON, L. D. A.; DE FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 793-799, 2004. ISSN 0031-9422.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994. ISSN 0305-0491.

TOENNIESSEN, G. H.; O'TOOLE, J. C.; DEVRIES, J. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 191-198, 2003. ISSN 1369-5266.

TORRES-CASTILLO, J. A.; JACOBO, C. M.; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). **Phytochemistry**, v. 70, n. 11-12, p. 1374-1381, 2009. ISSN 0031-9422.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.; BOUGIS, P.; DE LIMA, M.; SANTOS, R.; PIMENTA, A. *Tityus serrulatus* Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 371, n. 3, p. 515-520, 2008. ISSN 0006-291X.

VINOKUROV, K. S.; ELPIDINA, E. N.; OPPERT, B.; PRABHAKAR, S.; ZHUZHNIKOV, D. P.; DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, n. 2, p. 126-137, 2006. ISSN 1096-4959.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 1, p. 10-19, 2003. ISSN 1432-1033.

WALKER, P. T. Crop losses: The need to quantify the effects of pests, diseases and weeds on agricultural production. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 9, n. 2, p. 119-158, 1983.

WAR, A. R.; SHARMA, H. C.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 12, p. 1973-8, Dec 2011. ISSN 1559-2324 (Electronic).

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J.-C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996. ISSN 0264-8725.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, A. L. Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. **Environmental entomology**, v. 24, n. 1, p. 52-57, 1995. ISSN 0046-225X.

WU, Q.; BROWN, M. R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p. 1-24, 2006. ISSN 0066-4170.

XIA, H.; CHEN, L.; WANG, F.; LU, B.-R. Yield benefit and underlying cost of insect-resistance transgenic rice: implication in breeding and deploying transgenic crops. **Field crops research**, v. 118, n. 3, p. 215-220, 2010. ISSN 0378-4290.

YU, S. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991. ISSN 0048-3575.

YU, S.; NGUYEN, S.; ABO-ELGHAR, G. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* JE Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 1, p. 1-11, 2003. ISSN 0048-3575.

ZHOU, Z.-H.; YANG, H.-J.; CHEN, M.; LOU, C.-F.; ZHANG, Y.-Z.; CHEN, K.-P.; WANG, Y.; YU, M.-L.; YU, F.; LI, J.-Y. Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 12, p. 5103-5111, 2008. ISSN 1535-3893.

ZOU, Z.; NAJAR, F.; WANG, Y.; ROE, B.; JIANG, H. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 6, p. 677-82, Jun 2008. ISSN 0965-1748 (Print).

ZOU, Z.; NAJAR, F.; WANG, Y.; ROE, B.; JIANG, H. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 677-682, 2008. ISSN 0965-1748.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288-5296, 2013. ISSN 0003-2700.



## ANEXO 1

### Digestão Triptica e Preparo de Amostra Complexa para LC-MSE, usando o Sistema 2D nonoAcquity

Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas

Departamento de Genética

#### Esalq/Usp

**Obs:** Todos os ácidos e solventes orgânicos devem ser manipulados com muito cuidado e sempre no interior de capela de exaustão e descartados de acordo com as normas para descarte de resíduos. Acetonitrila, TFA e Hidróxido de amônio são **tóxicos** e o ácido fórmico é **corrosivo**. Dessa forma, devem ser manipulados com muito cuidado.

**Obs:** Cuidados a serem tomados para minimizar contaminações com queratina, polímeros e outras impurezas que podem interferir na qualidade das amostras:

i) Use luvas de nitrila: [www.danny.com.br](http://www.danny.com.br) o tempo todo e lave-as, caso necessário, para evitar contato com poeira e fios de cabelo que eventualmente podem ficar aderidos devido à estática do material das luvas.

ii) Utilize sempre químicos (**grau MS**), ponteiros e microtubos novos, graduados e **não siliconizados (Tabela 1)**, para evitar contaminação por polímeros na amostra. Mantenha os tubos em locais livres de poeira e não autoclave-os. Se possível, utilize pipetas exclusivas para tal uso.

iii) Sempre verifique a limpeza dos tubos, frascos de preparo dos tampões e os vidros da cuba de eletroforese. É aconselhável separar a vidraria que deve ser de borossilicato (**Tabela 1**), para tal finalidade. Evite o uso de detergentes poliméricos, tais como: Triton X100, SDS, Tween, etc.. Recomenda-se fazer a lavagem da vidraria com água miilQ (5 a 6 vezes) e um enxágue final com metanol, antes do uso.

#### Soluções:

**Obs:** As soluções devem ser todas novas (**CRÍTICO**), preparadas na quantidade necessária, **no dia do uso**. Não devem ser estocadas. O bicarbonato de amônio é extremamente volátil.

#### Procedimento:

1) Dessalinize (100 – 200 µg) da amostra com auxílio de uma coluna Amicon®Ultra da **Millipore** ou Vivaspin, da **GE Healthcare**, seletivas para **3000-10000 NMWL** (dependendo do massa molecular das

proteínas de interesse e do volume da amostra (**Obs:** Cuidado para não exceder a capacidade da coluna), antes da quantificação que pode ser realizada pelo teste de Bradford ou, no caso de proteínas pouco abundantes, com auxílio do *Agilent Protein 80 Kit (cat# 5067-1515)* ou *Agilent Protein 230 kit (cat# 5067-1517)*, de acordo com as normas do fabricante (**Agilent Technologies**).

2) Corra um gel de SDS-PAGE das amostras, juntamente com uma amostra padrão de BSA (1, 2 e/ou 5 ug) para confirmar a quantificação da proteína por Bradford, pela análise visual e comparativa do gel. **Obs:** *Nem sempre, a quantificação por Bradford é compatível com a quantificação em gel.*

**Obs: Faça a correção da concentração da amostra, de acordo com o gel, pois a quantificação correta é imprescindível !.**

3) Subdivida as amostras em alíquotas de 50µL contendo 50µg (1µg/µL) para preparar as amostras para digestão com tripsina para análise de espectrometria de massas.

4) Transfira 50µL de amostra (1µg/µL) para um tubo eppendorf (1.5 mL) (**Axygen, cat# MCT-150-L-C**). *Essa é a quantidade de amostra necessária para a digestão.*

5) Adicione 25µL de uma solução **RapiGest SF** (0.2%) e agite (Vórtex). A solução de 0.2% **RapiGest SF** é preparada adicionando-se 500 µL de água a um “vial” de 1 mg de **RapiGest SF (Waters Part No186001861, 5 x 1 mg)**.

6) Transfira o tubo para um bloco aquecido (80°C). Aqueça por 15 min.

7) Remova o tubo do bloco aquecido. Centrifugue (pulso). Adicione 2.5 µL de 100 mM ditioneitol (**DTT, BioRad, cat# 161-0611**, MW=154.3) = [1.5 mg/100 µL H<sub>2</sub>O milliQ], para abrir a proteína e deixá-la mais acessível aos passos de alquilação e digestão. Agite (Vórtex).

8) Transfira o tubo para bloco aquecido (60°C). Aqueça por 30 min.

9) Remova o tubo do bloco. Espere a amostra chegar à temperatura ambiente. Centrifugue (pulso).

10) Adicione 2.5 µL de 300 mM iodoacetamida (**IAA, GE, cat# RPN 6302V**, MW=185.0) = [5.55 mg/100µL H<sub>2</sub>O milliQ], para a alquilação de cisteínas. Agite (Vórtex). **Obs: Composto muito sensível à luz. (CRÍTICO)**

11) Transfira as amostras para o escuro, à temperatura ambiente e mantenha-as por 30 minutos (tempo de reação).

12) Adicione 10 µL de solução de tripsina (Promega) em 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Preparada pela adição de 400 µL de 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> em um “vial” de 20 µg da **Promega Trypsin (= 0.05 ug/uL), Part No. V511A, 100 µg em 5 x 20 µg alíquotas**). Agite (Vórtex). Proceda a digestão a (37°C) “overnight”. Nesse caso a proporção enzima: proteína é de **1:100** (wt:wt).



13) Após a digestão, para hidrolisar o **RapiGest SF**, adicione 10 µL de 5% (v:v) **TFA** (preparado em H<sub>2</sub>O milliQ, a partir de ampolas de alta pureza, **Pierce, Part No. 53102, HPLC Grade**, 10 x 1 mL). Agite (Vórtex). Incube as amostras a (37°C) por 90 min. Centrifugue (18.000 *g*) a 6°C, por 30 min. Transfira o sobrenadante para “vial” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**).

14) Seque as amostras em “speed vac”. A partir desse ponto, as amostras precisam passar por uma coluna C18 de purificação (ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, P10, da **Millipore, cat# ZTC18S960**) ou (PepCleanTMC-18 Spin Column, da **ThermoScientific, cat# 89870**), antes de serem analisadas.

15) No caso de utilização da coluna C18 de purificação (ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, P10, da **Millipore, cat# ZTC18S960**), ressuspenda as amostras em 50 µL de solução 0.1% TFA preparada em H<sub>2</sub>O milliQ.

16) Divida a amostra (50µL) em 5 frações de 10 µL em tubos eppendorf (1.5 mL) (**Axygen, cat# MCT-150-L-C**), pois a capacidade de retenção dessa coluna é pequena  $\leq 10 \mu\text{g}$ .

17) Purifique os peptídeos resultantes da digestão, com auxílio do ZipTip (*ver protocolo no site*) e faça a eluição individual dos peptídeos de cada fração em 10 µL da solução de 0.1% TFA em (50%) ACN. Combine as 5 frações purificadas em um único “vial” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**), de forma a obter um volume final de 50µL de amostra.

18) Outra possibilidade para purificação dos peptídeos, de forma menos trabalhosa, é utilizar colunas C18 de maior capacidade, para volumes maiores (PepCleanTMC-18 Spin Columns da **ThermoScientific, cat# 89870**). Nesse caso, a amostra previamente seca em “speed vac”, deve ser ressuspendida em 50µL de solução 0.5% TFA em 5% ACN, preparada em H<sub>2</sub>O milliQ. Divida a amostra em 2 frações de 25 µL e utilize 2 colunas separadamente para cada fração, pois a capacidade máxima de adsorção dessas colunas é de 30µg. Purifique e elua os peptídeos resultantes da digestão, de acordo com o protocolo do fabricante (**Thermo Scientific**). Combine as duas frações em um único “vial” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**), de forma a obter um volume final de 50µL de amostra.

19) Tanto para o caso de utilização da coluna C18 de purificação (ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, P10, da **Millipore**, assim como para o caso da PepCleanTMC-18 Spin Column da **ThermoScientific**, seque as amostras em “speed vac” . **Obs:** Nesse ponto, caso seja necessário, pode-se interromper o procedimento e manter as amostras a -80°C até o momento da análise.

20) No momento da análise, ressuspenda as amostras em 5  $\mu\text{L}$  de 1N **NH<sub>4</sub>OH 25%** (Hidróxido de amônio, **Merck, cat# K39008632**,  $d = 0.91$ ,  $MM = 35.04\text{g}$ )  $\rightarrow$  [192.5  $\mu\text{L}$ /5 mL H<sub>2</sub>O, grau MS], para que ocorra uma eficiente associação da amostra à coluna de 1<sup>a</sup> dimensão.

21) Adicione 1.0  $\mu\text{L}$  de 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  do padrão interno por exemplo: (**ADH, PHB ou ENO**) à amostra purificada e agite (vórtex). Acrescente 44  $\mu\text{L}$  de uma solução 20 mM de Formiato de amônio (**NH<sub>4</sub>Fo**), pH=10, chegando a um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . **Obs:** Dessa forma, a concentração final do padrão interno é de 20  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ . Caso não seja necessário o uso do padrão interno para quantificação, adicione *qsp*  $\mu\text{L}$  de **NH<sub>4</sub>Fo** 20 mM (pH=10), para obter um volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

**Obs:** A solução 20 mM de formiato de amônio (pH=10) deve ser preparada a partir da diluição (1:10), em H<sub>2</sub>O (grau MS), da solução estoque 200mM (pH=10), que se prepara adicionando-se 1.432 mL de **NH<sub>4</sub>OH 25%** (Hidróxido de amônio, **Merck, cat# K39008632**) em 90 mL de H<sub>2</sub>O (grau MS), acrescido de 162  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico (**Fluka, cat# 56302-10x1ML-F, ampolas de alta pureza, CAS: 64-18-6, MW= 46.03**). O pH=10, deve ser ajustado utilizando-se a solução de **NH<sub>4</sub>OH 25%** (Hidróxido de amônio, **Merck, cat# K39008632**) ou ácido fórmico (**Fluka, cat# 56302-10x1ML-F**).

**Obs:** Os passos 20 e 21, serão realizados no momento da análise pelo pessoal técnico responsável pela "facility".

## ANEXO 2

### Utilização de ZipTip para purificação de amostras de peptídios, provenientes da digestão triptica de spots de gel ou amostra complexa, para espectrometria de massas para MALDI e SynaptG2

Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas

Departamento de Genética

Referência: *User Guide For Reversed-Phase ZipTip C18, P10 - Millipore (cat# ZTC18S096)*, (modificado)

*Antes da análise MS/MS, os peptídios precisam ser dessalinizados. Para esse propósito, utilizamos os ZipTips.*

Material Necessário:

1) Reversed-Phase ZipTip C18, P10 - **Millipore (cat# ZTC18S096)**

2) Micropipeta (10 µL)

3) Soluções:

a) 100% Acetonitrila (ACN), (**CAS# 75-05-8, Fluka, cat# 34967**).

b) 0.1% (v:v) TFA (Ácido Trifluoracético, **Sigma-Aldrich, cat# 299537, CAS# 76-05-1**) em 100% ACN = [5 µL TFA em 5 mL ACN 100%].

c) 0.1% (v:v) TFA em 50% (v:v) solução de ACN em H<sub>2</sub>O milliQ = [5 µL TFA em 2.5 mL H<sub>2</sub>O milliQ + 2.5 mL ACN 100%].

d) 0.1% (v:v) TFA em H<sub>2</sub>O milliQ = [5 µL TFA em 5 mL H<sub>2</sub>O milliQ].

e) 0.1% (v:v) TFA em 5% (v:v) solução de metanol (**Merck, cat# 1.06009.1000**) = [5 µL TFA + 250 µL MeOH + 5 mL H<sub>2</sub>O milliQ].

f) 0.1% (v:v) FA (Ácido Fórmico, **Sigma-Aldrich, cat# 56302, CAS# 64-18-6**) em 50% (v:v) solução de ACN em H<sub>2</sub>O = [5 µL FA + 2.5 mL H<sub>2</sub>O milliQ + 2.5 mL ACN 100%]. *Obs: Solução necessária só para amostras de gel a serem analisadas pelo SynaptG2.*

**Obs:** Todos os ácidos e solventes orgânicos devem ser manipulados com muito cuidado e sempre no interior de capela de exaustão e descartados de acordo com as normas para descarte de resíduos. Acetonitrila, Metanol e TFA são **tóxicos** e o FA é **corrosivo**. Dessa forma, devem ser manipulados com muito cuidado.

**Obs:** Cuidados a serem tomados para minimizar contaminações com queratina, polímeros e outras impurezas que podem interferir na qualidade das amostras:

i) Use luvas de nitrila: [www.danny.com.br](http://www.danny.com.br) o tempo todo e lave-as, caso necessário, para evitar contato com poeira e fios de cabelo que eventualmente podem ficar aderidas devido à estática do material das luvas.

ii) Utilize sempre químicos (**grau MS**), ponteiros e microtubos novos, graduados e **não siliconizados (Tabela 1)**, para evitar contaminação por polímeros na amostra. Mantenha os tubos em locais livres de poeira e não autoclave-os. Se possível, utilize pipetas exclusivas para tal uso.

Sempre verifique a limpeza dos tubos e frascos de preparo dos tampões. É aconselhável separar a vidraria, que deve ser de boro silicato (**Tabela 1**), para tal finalidade. Evite o uso de detergentes poliméricos, tais como: Triton X100, SDS, Tween, etc.. Recomenda-se fazer um enxágüe da vidraria, com metanol, antes do uso.

Procedimento:

**Obs: Toda amostra que estiver armazenada em freezer, deve ser previamente homogeneizada em vórtex à temperatura ambiente, antes de se iniciar a purificação.**

1) Preparo da amostra: ajuste o pH da amostra de forma a obter um pH < 4.0. Para isso, ressuspenda a amostra de peptídios em 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em H<sub>2</sub>O milliQ.

2) Equilíbrio dos ZipTips I: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em 100% ACN. Descarte a solução.

3) Equilíbrio dos ZipTips II: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparado em 50% Acetonitrila (em H<sub>2</sub>O milliQ). Descarte a solução.

4) Equilíbrio dos ZipTips III: ajuste o ZipTip em uma micropipeta (10 µL) e aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparado em H<sub>2</sub>O milliQ. Descarte a solução.

5) Ligação da amostra à coluna: aspire e dispense, repetitivamente (7 a 10 X), 10 µL da amostra de peptídios, dissolvida em 0.1% TFA preparada em H<sub>2</sub>O milliQ, para garantir a fixação da mesma à coluna, particularmente, no caso de amostras complexas.

6) Lavagem I: aspire 10 µL da solução 0.1% TFA preparada em 5% solução de metanol (em H<sub>2</sub>O milliQ). Descarte a solução e repeta esse passo mais 2X. **Obs:** Essa lavagem com metanol é opcional, mas melhora bastante a eficiência de dessalinização, caso seja necessária.

7) Eluição para amostras (de gel) a serem analisadas por **MALDI**: aspire e dispense, repetitivamente (7 a 10X), em um “vial”, 10 µL da solução de 0.1% TFA em (50%) ACN, para eluição dos peptídios. Os peptídios devem ser transferidos para “vials” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No.**

**186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps).** *Obs: Nessa concentração menor de ACN (50%) melhora-se a detecção de peptídios hidrofílicos.*

8) Eluição para amostras (de gel) a serem analisadas por **SynapG2**: aspire e dispense, repetitivamente (7 a 10X), em um “vial”, 10 µL da solução de 0.1% TFA em (50%) ACN, para eluição dos peptídios. Seque as amostras em “speed vac” e ressuspenda-as em 10 µL 0.1% FA em (50%) ACN. Os peptídios devem ser transferidos para “vials” (**Waters Total Recovery Vial, Waters Part No. 186000385c, 100/pkg, preslit PTFE/silicone caps**).

**Cuidados Importantes:**

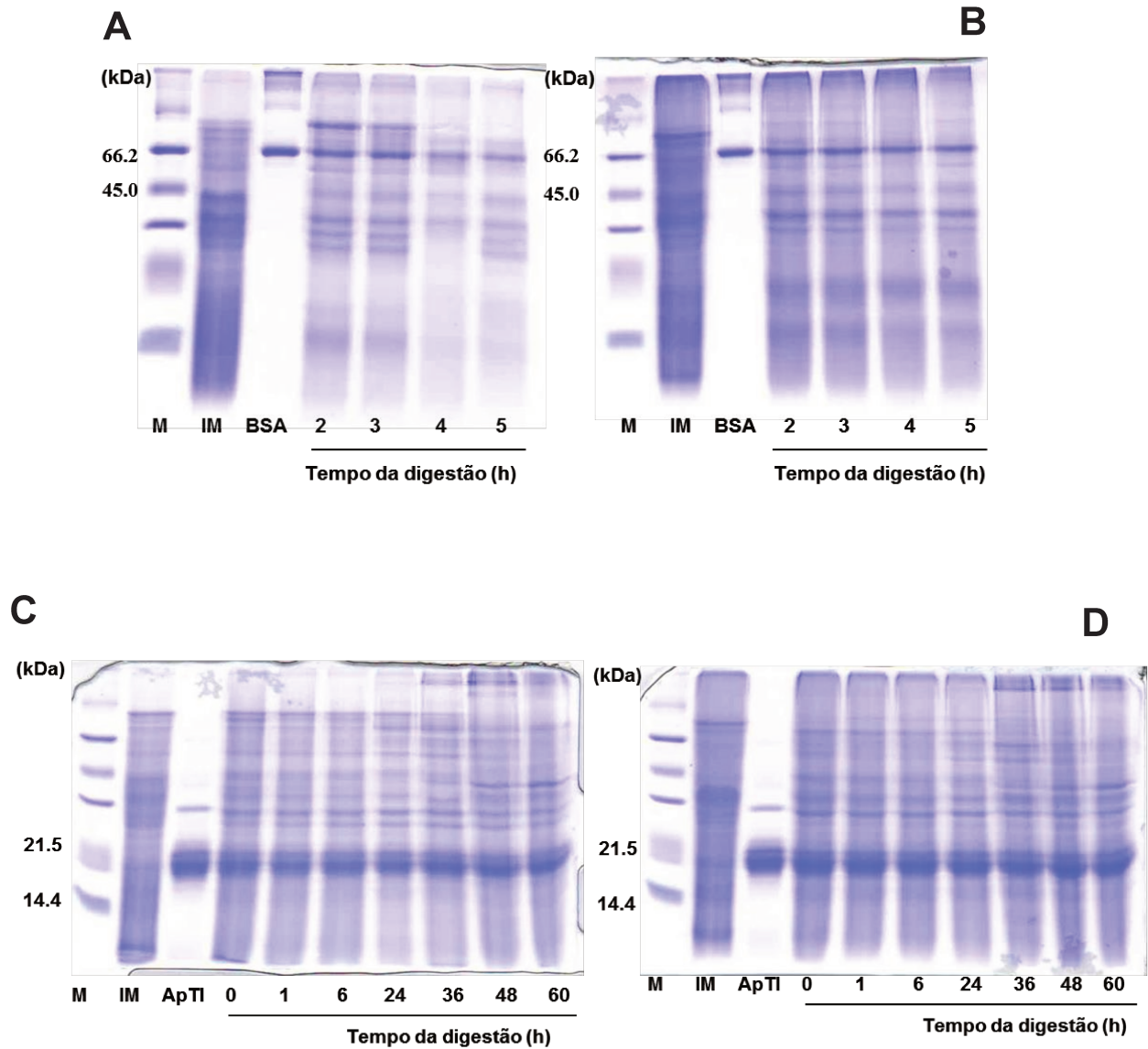
i) *Em nenhum passo, deixe que a coluna no interior do ZipTip reseque.*

ii) *ACN e Metanol são muito voláteis e evaporam rapidamente. Caso isso ocorra, adicione mais eluente para recuperar a amostra.*



### ANEXO 3

Digestibilidade *In vitro* de ApTI pelas peptidases digestivas de *D. saccharalis* (pg. 46 e 47)



**Figura 13:** Digestão *in vitro* de BSA; (A) digestão da BSA utilizando o extrato do intestino das larvas alimentadas em dieta controle, (B), digestão da BSA utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentadas com ApTI; Digestão *in vitro* de ApTI, (C) digestão do ApTI utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentadas em dieta controle, (D) digestão de ApTI utilizando o extrato do intestino médio de larvas alimentados com ApTI. Os marcadores de massa molecular são mostrados na figura.