

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBQBM – SBBq

CAROLINA TURATTI OLIVEIRA

EFEITO DE UMA PROTEÍNA DE RESERVA VEGETAL NO
DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO *SPODOPTERA*
FRUGIPERDA: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E MOLECULAR DO
MECANISMO ENTOMOTÓXICO

CAMPO GRANDE – MS

SETEMBRO – 2018

CAROLINA TURATTI OLIVEIRA

**EFEITO DE UMA PROTEÍNA DE RESERVA VEGETAL NO
DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera
frugiperda*: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E MOLECULAR DO
MECANISMO ENTOMOTÓXICO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo

Co-orientador: Walter Ribeiro Terra

CAMPO GRANDE – MS

SETEMBRO – 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINA TURATTI OLIVEIRA

EFEITO DE UMA PROTEÍNA DE RESERVA VEGETAL NO DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera frugiperda*: UMA ABORDAGEM BIOQUÍMICA E MOLECULAR DO MECANISMO ENTOMOTÓXICO

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Doutora em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2018

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dra. Simone Maria-Neto
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Suplentes:

Dra. Suzy Wider Machado
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

*“A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada”*

(Karl Popper)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela oportunidade, orientação, compreensão e incentivo durante todos esses anos, e também pelas conversas e ensinamentos relacionados não só a ciência, mas também a vida. Muito obrigada!;

Aos meus queridos pais, Efraim e Cássia, por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar, por sempre terem me dado suporte para que eu buscasse meus objetivos e, mesmo longe, se fazerem tão presentes e estarem sempre tão disponíveis para me ouvir e acalmar (nada no mundo me traz mais alegria do que tê-los como pais);

Às minhas irmãs, Nayara e Isabella, pelo apoio incondicional, compreensão e incentivo constantes;

A todos do LPPFB (ou que já foram um dia) pelo convívio, amizade, ajuda e paciência, e especialmente pelos cafés e risadas diárias;

À Suzy e ao Cézar, por tornarem os dias de laboratório menos difíceis, por dividirem comigo as angústias e as dificuldades encontradas, e assim tornarem tudo mais possível, fácil ou ao menos mais divertido;

Aos meus grandes amigos de longe e de Campo Grande, pelas infinitas conversas, discussões, experiências e reflexões;

À Mitcho pelo apoio, paciência e incentivo diários, pelo carinho e por me transmitir um pouco da calma e serenidade que tem (minha gratidão eterna!);

À Profa. Dra. Alda, pela sensibilidade e por desempenhar tão bem seu papel como docente;

Ao Programa multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PmBqBM) pela oportunidade;

À Profa. Dra. Fabiana, coordenadora do PmBqBM e à Rita, secretária durante algum tempo do PmBqBM, pela atenção e auxílio sempre que foi necessário;

A cada um que, direta ou indiretamente, contribuiu com este trabalho;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que sempre foi minha casa e onde construí grandes amizades;

Às Agências de Fomento CAPES, CNPq, Fundect e FINEP que viabilizaram a realização deste trabalho.

RESUMO

Talisin é uma proteína de reserva de sementes de *Talisia esculenta* que apresenta tanto propriedades de lectinas quanto de inibidores de peptidases. Tais características sugerem que Talisin desempenha um papel no processo de defesa da planta, fato este que torna Talisin uma proteína multifuncional. Este trabalho buscou investigar os efeitos da ingestão crônica de Talisin em larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda*, considerado o principal inseto praga do milho e causador de vultosos prejuízos econômicos em diversas outras culturas agrícolas. A ingestão crônica de Talisin acarretou efeitos antinutricionais nas larvas, reduzindo o peso e prolongando o tempo de desenvolvimento total dos insetos. Além disso, larvas alimentadas com Talisin também apresentaram redução significativa da atividade de enzimas do tipo tripsinas. Análises histológicas do intestino médio de larvas alimentadas com Talisin mostrou alterações no epitélio intestinal e ruptura da membrana peritrófica, o que possivelmente causou um aumento da atividade de aminopeptidase no lúmen intestinal. Talisin também se mostrou resistente a degradação pelas enzimas digestivas de *S. frugiperda*. O perfil de transcrição de genes de tripsinas, quimotripsinas e aminopeptidases foi analisado em qPCR. A ingestão de Talisin ocasionou a expressão diferencial de pelo menos dois genes de cada uma dessas classes de enzimas. Estudos de *docking* molecular indicaram haver uma maior afinidade de Talisin com as enzimas menos expressas.

Palavras-chave: Proteína de reserva, interação inseto-planta, bioinseticidas, inibidores de peptidases, lectinas

ABSTRACT

Talisin is a storage protein from *Talisia esculenta* seeds that presents lectin-like and peptidase inhibitor properties. Such characteristics suggests that Talisin plays a role in the plant defense process, making Talisin a multifunctional protein. This work aimed to investigate the effects of chronic intake of Talisin on fifth instar larvae of *Spodoptera frugiperda*, considered the main insect pest of maize and causer of large economic losses on several other agricultural crops. The chronical intake of Talisin had antinutritional effects on the larvae, reducing their weight and prolonging the total development time of the insects. In addition, Talisin-fed larvae also showed significant reduction in the activity of trypsin-like enzymes. Midgut histology analysis of Talisin-fed larvae showed alterations in the intestinal epithelium and rupture of the peritrophic membrane, possibly causing an increase of aminopeptidase activity in the midgut lumen. Talisin also proved to be resistant to degradation by the digestive enzymes of *S. frugiperda*. The transcription profile of trypsin, chymotrypsin and aminopeptidase genes was also analyzed through qPCR technique. Talisin intake resulted in differential expression of at least two genes from each of these classes of enzymes. Molecular docking studies indicated a higher affinity for Talisin with the less expressed enzymes.

Keywords: Reserve protein, insect-plant interaction, bioinsecticides, peptidase inhibitors, lectins

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de ação de algumas proteínas tóxicas de plantas no intestino médio de insetos. Figura adaptada de Velasques *et al.* (2017).23
- Figura 2.** Fases do ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*: (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupa e (D) mariposa adulta. Fonte: Carolina Turatti Oliveira.26
- Figura 3.** Representação dos compartimentos do sistema digestório dos insetos, suas células, vilosidades e glicoproteínas. Figura adaptada de Terra e Ferreira (2012).28
- Figura 4.** Árvores de *Talisia esculenta* (A), flores e frutos (B), frutos e folhas (C) e frutos e sementes (D). Fonte: Riet-Correa *et al.* (2014).30
- Figura 5.** Representação esquemática das etapas para obtenção de insetos para os ensaios biológicos. (A) Adulto de *Spodoptera frugiperda*; (B) Tubo de PVC (revestido internamente com papel) para a realização do acasalamento dos insetos; (C) Imagem ampliada dos ovos visualizados em microscópio estereoscópico; (D) Tubos de incorporação. Fonte: Carolina Turatti Oliveira. ...35
- Figura 6.** Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas nos experimentos de 2ª geração. CC: larvas que se alimentaram de dieta controle em duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.36
- Figura 7.** Efeito da ingestão de Talisin na sobrevivência (A) e massa (B) de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin. (C): Diferença de tamanho e peso em larvas alimentadas com Talisin. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey).45
- Figura 8.** Atividade inibitória de Talisin sobre as enzimas do tipo tripsina presentes no fluido intestinal de lagartas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda*.47
- Figura 9.** (A) Atividade de enzimas do tipo tripsina no lúmen intestinal e nas fezes de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA). (B) SDS-PAGE 15% do extrato fecal de larvas de quinto instar de *S. frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin.48
- Figura 10.** Inibição por Talisin da atividade de tripsinas presentes no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin.49
- Figura 11.** Atividade de enzimas aminopeptidase-N no epitélio e lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).50
- Figura 12.** Atividade de enzimas do tipo quimotripsina no lúmen intestinal e nas fezes de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e

- dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).....50
- Figura 13.** Atividade de enzimas α -amilase no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).51
- Figura 14.** Atividade proteolítica de enzimas presentes no intestino médio de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). As bandas foram designadas SfGP1 a SfGP6. Linha 1: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta controle; Linha 2: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta contendo Talisin; Linhas 3 e 5: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta controle incubadas com TLCK e Talisin, respectivamente; Linhas 4 e 6: extrato intestinal de larvas alimentadas com Talisin incubadas com TLCK e Talisin, respectivamente. TLCK: Inibidor sintético de tripsina. As setas ao lado direito indicam bandas inibidas.52
- Figura 15.** Efeito da ingestão de Talisin na sobrevivência (A) e massa (B) de larvas de 5º instar da 2ª geração de *Spodoptera frugiperda*. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.53
- Figura 16.** Atividade das enzimas do tipo tripsina no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.....54
- Figura 17.** Inibição por Talisin da atividade de tripsinas presentes no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.55
- Figura 18.** Atividade das enzimas do tipo quimotripsina no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0.5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta

- controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.....56
- Figura 19.** Atividade de enzimas aminopeptidase-N no extrato intestinal de larvas de 5^o ínstar de 2^a geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.56
- Figura 20.** Resistência de Talisin à hidrólise pelas proteases intestinais de *Spodoptera frugiperda*. SDS-PAGE dos extratos intestinais misturados com Talisin na razão 1:5 (Talisin para extrato intestinal) e incubados a 30°C por diferentes períodos. Digestão de BSA (A) e Talisin (C) com o extrato intestinal e larvas alimentadas em dieta controle e digestão de BSA (B) e Talisin (D) com extrato intestinal de larvas alimentadas com Talisin. TAL: Talisin; BSA: albumina sérica bovina.....57
- Figura 21.** Gel de agarose 1% das amostras de RNA total extraído do intestino médio de larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda*. Os números representam cada uma das 4 réplicas biológicas utilizadas.....58
- Figura 22.** Expressão relativa dos genes de tripsinas de larvas de 5^o instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....59
- Figura 23.** Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de larvas de 5^o instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....60
- Figura 24.** Expressão relativa dos genes de aminopeptidase de larvas de 5^o instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).....60
- Figura 25.** Fotomicrografia de larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda*. (A) Intestino médio de larvas controle, 10x. (B) Intestino médio de larvas alimentadas com Talisin 0,5% (m/m), 10x (C) Epitélio do intestino médio de larvas controle, 40X (D) Epitélio do intestino médio de larvas alimentadas com Talisin 0,5% (m/m), 40X. Lu, Lúmen; EP, Epitélio; MP, Membrana Peritrófica; (*) Diferença entre o espaço ectoperitrófico.61
- Figura 26.** Modelo tridimensional teórico para os complexos Talisin/Tripsina 6 (A) e Talisin/Tripsina 12 (B).63
- Figura 27.** Modelo tridimensional teórico para os complexos Talisin/Quimotripsina 2 (A) e Talisin/Quimotripsina 21 (B).64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta artificial para criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
Tabela 2. Lista de iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a validação da expressão através de qPCR de tripsinas, quimotripsinas e aminopeptidases. TA: temperatura de anelamento.	42
Tabela 3. Parâmetros fisiológicos analisados durante o desenvolvimento larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin.	46
Tabela 4. Parâmetros nutricionais em larvas de quinto instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> no controle e tratamento contendo Talisin 0,5%.	47
Tabela 5. Interação <i>in silico</i> dos complexos Talisin/Tripsina 6 (-8.4 kcal/mol) e Talisin/Tripsina 12 (-8.8 kcal/mol).	65
Tabela 6. Interação <i>in silico</i> dos complexos Talisin/Quimotripsina2 (-11.2 kcal/mol) e Talisin/Quimotripsina21 (-10.0 kcal/mol).	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de cadastro no SisGen das espécies utilizadas nesta pesquisa.90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Digestibilidade aproximada (<i>Approximate digestibility</i>)
APN	Aminopectidase
BAPNA	N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (<i>N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAPS	Ácido 3 - ciclohexilamino - 1 – propanosulfônico (<i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>)
cDNA	DNA de cadeia complementar (<i>Complementary DNA</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNS	Ácido 3,5-ácido dinitrosalicílico (<i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i>)
dsRNA	RNA de fita dupla (<i>double strand RNA</i>)
EB	Extrato bruto
ECD	Eficiência de conversão do alimento digerido
ECI	Eficiência de conversão do alimento ingerido
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de sódio (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
IM	Intestino médio
IPs	Inibidores de peptidases
KDa	Quilodalton (<i>Kilodalton</i>)
LpNa	Leucina p-nitroanilida (<i>L-Leucine-p-nitroanilide</i>)
M	Mortalidade
MC	Custo metabólico (<i>Metabolic cost</i>)
MIP	Manejo integrado de pragas
MKMLP	Proteína do tipo-miraculina de <i>Murraya koenigii</i> (<i>Murraya koenigii miraculin-like protein</i>)
MP	Membrana peritrófica
mRNA	RNA mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (<i>Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin</i>)
qPCR	PCR quantitativo em tempo real (<i>Quantitative PCR</i>)
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos (<i>Ribosome-inactivating proteins</i>)
RCR	Taxa de consumo relativo (<i>Relative consumption ratio</i>)
RGR	Taxa de crescimento relativo (<i>Relative growth ratio</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	Interferência por RNA (<i>RNA interference</i>)
RMR	Taxa metabólica relativa (<i>Relative metabolic ratio</i>)
SAAPFpNA	N-succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina p-nitroanilida (<i>N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine p-nitroanilide</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS;
SfChy	Quimotripsina de <i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>Spodoptera frugiperda chymotrypsin</i>)
SfGP	Peptidase do intestino médio de <i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>Spodoptera frugiperda gut peptidase</i>)
SfTry	Tripsina de <i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>Spodoptera frugiperda trypsin</i>)
STI	Inibidor de tripsina da soja (<i>Soybean trypsin inhibitor</i>)
TAE	Tris acetato EDTA (<i>Tris Acetate-EDTA</i>)
TDT	Tempo de desenvolvimento total (<i>Total development time</i>)
TEL	Lectina de <i>Talisia esculenta</i> (<i>Talisia esculenta lectin</i>)
TLCK	N-p-tosil-lisina clorometil cetona (<i>Nα-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride</i>)
Tris	Tri (hidroximetil) amino metano (<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Interação inseto planta	21
2.2 Proteínas tóxicas em plantas: inibidores de peptidases e lectinas.....	22
2.3 <i>Spodoptera frugiperda</i>	26
2.4 Sistema digestório de insetos Lepidópteros.....	27
2.5 Proteína de reserva de <i>Talisia esculenta</i> (Talisin)	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Extração e purificação de Talisin	33
4.2 Insetos.....	33
4.3 Ensaio <i>in vivo</i> de primeira geração.....	34
4.4 Ensaio <i>in vivo</i> de segunda geração.....	35
4.5 Preparação do intestino médio e das fezes	36
4.6 Parâmetros nutricionais.....	37
4.7 Quantificação de proteínas	38
4.8 Ensaio enzimático.....	38
4.9 Atividade proteolítica do extrato intestinal em gel nativo de poliacrilamida contendo caseína 1%	39
4.10 Digestão de Talisin.....	39
4.11 Microscopia	40
4.12 PCR quantitativo em tempo real	40
4.13 Modelagem molecular	42
4.14 <i>Docking</i> molecular.....	43
4.15 Análises estatísticas.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Efeitos de Talisin no desenvolvimento do inseto.....	45
5.2 Consumo e utilização do alimento	46
5.3 Atividade enzimática em larvas alimentadas com Talisin na primeira geração	47

5.4	Visualização em gel da atividade proteolítica.....	51
5.5	Efeito da ingestão de Talisin em larvas de segunda geração	52
5.6	Atividade enzimática em larvas alimentadas com Talisin na segunda geração	53
5.7	Resistência de Talisin à degradação pelas peptidases do intestino médio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	57
5.8	Análises de expressão gênica.....	58
5.9	Microscopia	61
5.10	Modelagem molecular e <i>docking</i> molecular	61
6.	DISCUSSÃO.....	67
7.	CONCLUSÕES.....	76
ANEXOS	90
	Anexo 1. Comprovante de cadastro no SisGen das espécies utilizadas nesta pesquisa.	90

1. INTRODUÇÃO

Com a população mundial alcançando até 10 bilhões de pessoas durante as próximas quatro décadas (Nations, 2004; Bongaarts, 2010), a demanda por alimento tornar-se-á, conseqüentemente, cada vez maior. Este aumento de demanda, por sua vez, gera a necessidade de adoção de medidas que maximizem e otimizem a produção de alimento de forma segura, além de econômica e ecologicamente aceitáveis (Godfray *et al.*, 2010).

As perdas ocasionadas por pragas e doenças nas lavouras são um dos principais fatores responsáveis pela diminuição do rendimento em diversas culturas agrícolas. Estima-se que, anualmente, as perdas correspondam à cerca de 10 a 16% da colheita global (Oerke, 2005). No Brasil, perdas devido ao ataque por insetos herbívoros são estimadas em 2 a 43% para as principais culturas agrícolas, sendo muitas vezes um dos fatores mais significativos que limitam e reduzem a produção de alimento (Oliveira *et al.*, 2014).

No Brasil, a agricultura desempenha um papel importante na economia, uma vez que é responsável, atualmente, por cerca de 20% do Produto Interno Bruto (Cepea, 2018). A região Centro-Oeste destaca-se por contribuir com uma parcela de mais de 40% na produção nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas (Conab, 2018). Dentre tais produtos, a cultura do milho está entre uma das mais importantes, colocando o Brasil como o terceiro maior produtor do mundo (Shiferaw *et al.*, 2011; Faostat, 2018). A produção mundial do milho na safra 2016/2017 foi estimada em 1,06 bilhões de toneladas, e deste total a produção brasileira é responsável por aproximadamente 94 milhões de toneladas (Conab, 2018; Faostat, 2018).

A cultura do milho no Brasil, como praticamente todos os cultivos agrícolas, é hospedeira de diferentes espécies de insetos fitófagos, os quais muitas vezes são também pragas importantes de outras culturas. Este é o caso de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como a lagarta-do-cartucho e considerada a principal lagarta praga do milho. Por ser uma espécie altamente polífaga, *S. frugiperda* é considerada também uma praga importante de outros cultivos, como o algodão, a soja e o sorgo (Figueiredo, Penteado-Dias e Cruz, 2005).

Estima-se que *S. frugiperda* provoque redução no rendimento da produção do milho em 17 a 55%, de acordo com o estágio da planta. O método convencional de controle de *S. frugiperda* e de outras pragas nas lavouras é feito, majoritariamente,

através do uso de inseticidas químicos. No caso da lagarta-do-cartucho o uso de inseticidas nem sempre é eficiente, uma vez que a lagarta tem o hábito de permanecer dentro do “cartucho” do milho, dificultando seu contato com o produto (Figueiredo, Penteado-Dias e Cruz, 2005).

Embora o Brasil tenha atingido o recorde na produção agrícola em 2017, o uso de agrotóxicos também vem apresentando um aumento recorde nos últimos anos. Segundo a Anvisa, nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto o mercado brasileiro neste período cresceu 190%, assumindo o posto de maior mercado de agrotóxicos do mundo (Anvisa, 2013) . As culturas da soja e do milho ocupam, respectivamente, o primeiro e segundo lugar no consumo de agrotóxicos no Brasil (Carneiro, 2015).

O uso intenso e inadequado de inseticidas químicos é responsável pelo aumento da tolerância de diferentes espécies de insetos fitófagos (Dawkar *et al.*, 2013; Hicks *et al.*, 2018) além de contaminar o meio ambiente (Hapeman *et al.*, 2003), ocasionar desequilíbrios ecológicos (Relyea, 2005) e afetar a saúde humana (Carneiro, 2015).

Com a necessidade de contornar tais problemas e estabelecer um sistema de agricultura mais sustentável, tem se buscado a implementação de um novo conceito de controle de pragas: o Manejo Integrado de Pragas (MIP). A prática do MIP baseia-se nos seguintes pontos: 1) como se deve modificar o sistema de vida de uma praga para reduzir a sua população a níveis toleráveis, ou seja, inferior ao nível de dano econômico; 2) aplicação do conhecimento biológico e da tecnologia disponível para obter a modificação desejada e 3) uso de táticas no controle de pragas adequado à tecnologia existente, compatível com os aspectos qualitativos, econômicos e ambientais (Prokopy e Kogan, 2009).

Neste cenário, o desenvolvimento de cultivares geneticamente modificados que apresentam uma maior resistência às pragas tem sido uma nova e importante oportunidade de incremento à redução do uso de pesticidas químicos e diminuição dos custos e perdas de produção (Babu *et al.*, 2003; Christou *et al.*, 2006). O uso de cultivares resistentes tem se mostrado um componente-chave em qualquer sistema de MIP, além de ser uma das táticas mais efetivas, econômica e ecologicamente (Kos *et al.*, 2009; Panizzi e Parra, 2009).

Durante o complexo curso de interação e co-evolução das plantas com os insetos fitófagos, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa, que

permitem lidar com o contínuo ataque e reduzir os danos causados pelos insetos. Tais mecanismos incluem a produção de uma série de compostos químicos, como metabólitos secundários, proteínas e peptídeos (Mithofer e Boland, 2012).

Dentre as classes de proteínas envolvidas no mecanismo de defesa das plantas, destacam-se os inibidores de peptidases, as lectinas e vicilinas (Macedo, Oliveira e Oliveira, 2015; Shamsi, Parveen e Fatima, 2016; Velasques *et al.*, 2017). Estas proteínas são encontradas principalmente, e em maior quantidade, em sementes e órgãos de reserva. Quando ingeridas pelos insetos, as proteínas tóxicas podem afetar o metabolismo e desenvolvimento normal dos insetos, e algumas vezes levá-los à morte. Por outro lado, os insetos também desenvolveram estratégias para lidar com as barreiras de defesa impostas pelas plantas, e assim tentam sobrepujar o efeito da ingestão das proteínas entomotóxicas, através, por exemplo, de processos de detoxificação e alterações no padrão de expressão gênica (Mello e Silva-Filho, 2002; Zhu-Salzman e Zeng, 2015).

Há, portanto, uma necessidade irrefutável de entender melhor os fatores que governam as relações entre as proteínas de defesa de plantas e os insetos, pois tal conhecimento pode ajudar a desvendar as causas para o desenvolvimento de insetos pragas e seus mecanismos de resistência, além de ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle seguras destinadas a uma maior efetividade no controle e, conseqüente, otimização da produção em áreas já cultivadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação inseto-planta

A interação entre plantas e herbívoros está entre uma das interações ecológicas mais importantes da natureza. Os herbívoros consomem mais de 15% da biomassa produzida anualmente em ecossistemas temperados e tropicais, tornando a herbivoria o principal canal pelo qual a energia entra nas cadeias alimentares (Agrawal, 2011). Dentre os grupos que compõem os herbívoros, destacam-se os insetos, que representam a classe com o maior número de espécies na Terra, e dentre estas espécies, metade alimentando-se de plantas (Basset *et al.*, 2012).

Os insetos herbívoros e as plantas são membros de uma comunidade ecológica extremamente diversa. Estes dois grupos de organismos coevoluem há mais de 350 milhões de anos e ao longo deste período coevolutivo ambos desenvolveram estratégias para evitar os mecanismos de defesa uns dos outros (Mooney, 2007). Essa “corrida armamentista evolutiva” levou as plantas a desenvolverem uma ampla gama de estratégias de defesa, físicas (ex.: espinhos, tricomas) e químicas (ex.: metabólitos primários e secundários), a fim de minimizar os danos causados pelos ataques e garantir seu crescimento e sucesso reprodutivo. Além disso, por serem organismos sésseis, as plantas estão sujeitas continuamente a diversos fatores de estresses abióticos e bióticos no ambiente, como a falta de nutrientes e a contínua ameaça de predadores (insetos, fungos, nematoides, vírus, bactérias, etc) (Johnson, 2011). As estratégias de defesa podem ser classificadas de forma geral em duas categorias, sendo elas: constitutiva e induzida. A defesa constitutiva inclui barreiras físicas e químicas que existem antes mesmo do ataque ou injúria, enquanto as defesas indutíveis incluem mecanismos defensivos que são ativados somente após o ataque do inseto ou patógeno (War *et al.*, 2012; Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny e Bak, 2013).

Ao sofrer um ataque, as plantas são capazes de reconhecer o dano através de um sofisticado conjunto de vias de sinalização e, dessa forma, converter estes sinais em respostas bioquímicas, fisiológicas ou celulares apropriadas (Maffei, Mithofer e Boland, 2007; Wu e Baldwin, 2010). Em geral, o modo de ação destes compostos envolve o rompimento de membranas, inibição de nutrientes e transporte de íons,

inibição de sinais de processos de transdução de sinal, inibição do metabolismo ou rompimento do controle de processos fisiológicos (Mithöfer e Boland, 2008).

Através da estratégia de defesa química, as plantas desenvolveram e sintetizam uma diversidade impressionante de compostos naturais bioativos, muitos deles tóxicos (Maag *et al.*, 2014). Dentre os diferentes compostos tóxicos reportados em plantas está um grande grupo de compostos de baixo peso molecular, entre eles alcalóides, terpenóides, taninos e glicosídeos (Mithofer e Boland, 2012). Além disso, as plantas sintetizam um arsenal de proteínas, como as lectinas, vicilinas, inibidores de peptidases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) e outras, que ajudam a planta em sua contínua batalha pela sobrevivência (Lannoo e Van Damme, 2014; Dang e Van Damme, 2015; Zhu-Salzman e Zeng, 2015).

As interações entre insetos e plantas podem também ser benéficas, como é o caso do mutualismo e polinização. Em geral, a importância dos insetos como polinizadores foi o que deu origem aos primeiros estudos sobre interações inseto-planta há mais de duzentos anos. Por sua vez, as interações antagônicas, em particular entre insetos herbívoros e culturas agrícolas, foram motivadores para inúmeros estudos nos últimos cem anos, que tem levado a uma maior compreensão sobre a bioquímica de plantas, ecologia, fisiologia e comportamento dos insetos (Klein *et al.*, 2007; Burkle, Marlin e Knight, 2013).

Um grande incentivo adicional para estudos que envolvam aspectos relacionados aos mecanismos de defesa de plantas contra herbívoros, é o fato de que a herbivoria custa às economias mundiais bilhões de dólares a cada ano em receitas perdidas relacionadas à agricultura, horticultura e silvicultura (Oerke e Dehne, 2004; Esker, Savary e Mcroberts, 2012).

2.2 Proteínas tóxicas em plantas: inibidores de peptidases e lectinas

Atualmente, um grande número de proteínas vegetais que supostamente apresentam propriedades tóxicas e estão envolvidas no mecanismo de defesa vegetal são conhecidas (Dang e Van Damme, 2015). Dentre as mais bem estudadas estão as lectinas, RIPs, vicilinas, inibidores de α -amilase e inibidores de peptidases (IPs) (Figura 1). A maioria dessas proteínas tendem a acumular nas partes mais vulneráveis das plantas, como as sementes e os tecidos vegetativos de reserva.

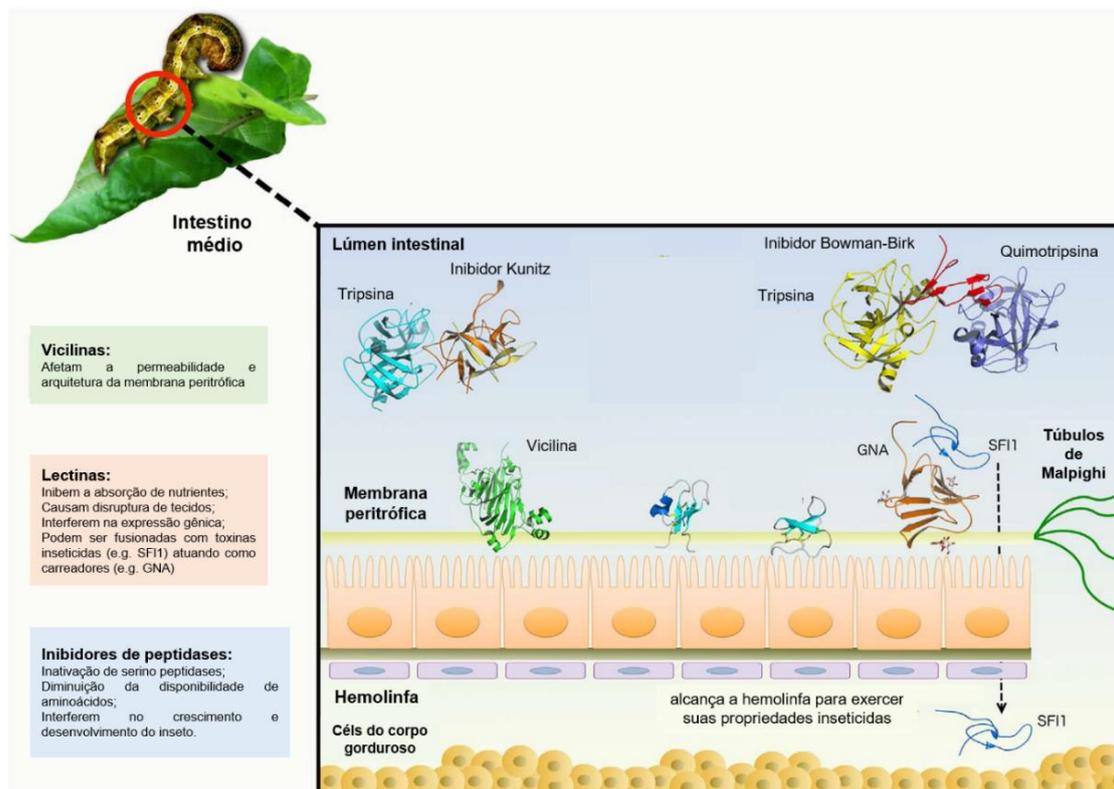


Figura 1. Mecanismos de ação de algumas proteínas tóxicas de plantas no intestino médio de insetos. Figura adaptada de Velasques *et al.* (2017).

As sementes representam um estágio crítico na sobrevivência das plantas superiores, sendo uma estrutura que possui um papel ecológico bastante importante. A síntese de proteínas nas sementes ou demais órgãos vegetativos desempenha um papel primário importante no estoque de nitrogênio e sua distribuição, sendo uma importante contribuição para a sobrevivência das plantas no seu ambiente natural (De Souza Cândido *et al.*, 2011; Tegeder e Masclaux-Daubresse, 2017). A síntese e o acúmulo de uma variedade de proteínas de reserva nas sementes e outros tecidos vegetativos têm se mostrado intimamente relacionado com a defesa das plantas, uma vez que várias destas proteínas apresentam propriedades entomotóxicas (Macedo, Oliveira e Oliveira, 2015; Shamsi, Parveen e Fatima, 2016; Zhu *et al.*, 2018).

Os inibidores de peptidases (IPs) compreendem uma das classes de proteínas mais abundantes nas plantas. Eles são encontrados nos mais variados tecidos vegetais, mas em maiores quantidades nas sementes e tubérculos, e sua expressão nas plantas está frequentemente associada à injúrias ou ataque por patógenos e insetos (Grosse-Holz e Hoorn, 2016). A maioria dos IPs são proteínas pequenas com peso molecular entre 8 e 20 kDa. Os IPs interagem com as peptidases ligando-se ao

seu sítio ativo, o que resulta na formação de um complexo estável peptidase-inibidor, tornando a enzima inativa e, portanto, incapaz de exercer sua atividade enzimática (Fan e Wu, 2005).

Os inibidores de peptidases conhecidos até o momento são reportados para todas as quatro classes de peptidases, incluindo serino, cisteíno, aspártico e metalopeptidases. Essas proteínas têm sido descritas e organizadas de acordo com a similaridade de sequências proposta por Rawlings *et al.* (2018) na base de dados MEROPS, onde estão descritas até o momento 82 famílias.

Dentre as famílias dos inibidores de serinopeptidases, uma das mais bem estudadas e caracterizadas é a família Kunitz (Bendre, Ramasamy e Suresh, 2018), representando a maior família de IPs e difundida entre diferentes famílias botânicas, mas principalmente concentrada entre sementes de leguminosas. Os membros dessa família apresentam atividade sobre diferentes enzimas proteolíticas, sendo principalmente ativos contra as serinopeptidases, como tripsinas e quimotripsinas (Antao e Malcata, 2005). Esses inibidores geralmente têm massa molecular de 18 a 22 kDa e são constituídos por aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos. O padrão estrutural dos inibidores de plantas do tipo Kunitz é de uma única cadeia polipeptídica, com até duas pontes dissulfeto além de possuírem, em geral, um único sítio reativo (Oliva *et al.*, 2011).

O primeiro inibidor de planta do tipo Kunitz purificado e caracterizado foi um inibidor de tripsina da soja (*Glycine max*, STI *soybean trypsin inhibitor*), em 1945. A partir de então, inúmeros inibidores de peptidases foram purificados de diversas espécies vegetais, caracterizados e estudados quanto a uma diversidade de aplicações (Antao e Malcata, 2005; Bezerra *et al.*, 2016).

Basicamente, o papel de defesa dos IPs é baseado em sua capacidade de inibição da atividade das enzimas digestivas de insetos (Figura 1) ou enzimas de demais patógenos. A formação destes complexos nos insetos causa uma redução da disponibilidade de aminoácidos necessários para seu crescimento e desenvolvimento, interferindo em importantes processos bioquímicos e fisiológicos (Zhu-Salzman e Zeng, 2015).

Outra classe particular de metabólitos primários envolvidos no mecanismo de defesa vegetal são as lectinas. O estudo de lectinas de plantas teve início ao final do século dezenove com o trabalho de Hermann Stillmark (Stillmark, 1888) ao observar que extratos de sementes de *Ricinus communis* (mamona) apresentavam a habilidade

de aglutinar células vermelhas, característica comum a lectinas. No entanto, mais tarde foi descoberto que algumas lectinas não exibiam essa atividade aglutinante. A partir de então, a definição atual de lectinas propõe a presença de pelo menos um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans e Van Damme, 1995). As lectinas também podem demonstrar domínios adicionais, além dos domínios de ligação a açúcares, o que por sua vez confere diferentes atividades biológicas para estas moléculas (Van Damme *et al.*, 2003).

Com base no seu número e características de domínios, as lectinas vegetais podem ser divididas em quatro classes. A classe mais simples, as merolectinas, são lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos. Como resultado, as merolectinas não apresentam atividade aglutinante. As hololectinas contêm dois domínios ou domínios multivalentes de ligação a carboidratos. A terceira classe de lectinas, as quimerolectinas, possuem um domínio de ligação a carboidratos e um domínio adicional que confere a elas outras atividades biológicas. Finalmente, as superlectinas são lectinas com dois domínios ou domínios multivalentes de ligação a carboidratos, capazes de reconhecer açúcares estruturalmente não relacionados (Van Damme, Lannoo e Peumans, 2008b). Atualmente, dados de estudos de genoma e transcriptoma indicam que a maioria dos genes das lectinas vegetais possuem uma arquitetura de domínio quimérico, reforçando a ideia de um grupo com papéis biológicos bi ou multifuncionais (Van Damme *et al.*, 2011).

A partir do trabalho de Stillmark, outras lectinas de plantas têm sido estudadas (Van Damme, Lannoo e Peumans, 2008b), bem como sua interação com outros organismos (Lannoo e Van Damme, 2014). O efeito de lectinas sobre o desenvolvimento de insetos foi investigado pela primeira vez através de um estudo utilizando a lectina do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*), denominada PHA (Janzen, Juster e Liener, 1976). Quando adicionada à dieta artificial de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera), a lectina apresentou um efeito deletério nas larvas deste bruquídeo. Entretanto, ironicamente, este primeiro indício experimental do papel de defesa das lectinas de plantas contra insetos foi baseado em um resultado falso-positivo, pois o efeito deletério ocorreu devido a contaminação por uma outra classe de proteína, um inibidor de α -amilase (Huesing *et al.*, 1991). No entanto, durante as duas últimas décadas, progressos importantes foram feitos no estudo de lectinas de plantas e na compreensão dos seus efeitos contra patógenos e especialmente insetos

pragas das ordens Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e Diptera (Vandenborre, Smaghe e Van Damme, 2011; Macedo, Oliveira e Oliveira, 2015). Os mecanismos mais prováveis da atividade entomotóxica das lectinas envolvem interações com diferentes glicoproteínas ou estruturas glicanas nos insetos (Figura 1), o que resulta na interferência em vários processos fisiológicos nesses organismos.

Apesar do papel fisiológico dos IPs (Mosolov e Valueva, 2005) e lectinas vegetais (Van Damme *et al.*, 2011) não serem completamente elucidados nas plantas, há fortes evidências que as plantas acumulam essas proteínas como reserva (geralmente mais do que 10% do tecido de reserva em leguminosas (Shewry, Napier e Tatham, 1995)), além de também utilizá-las como resposta às injúrias e infecções por micro-organismos oportunistas, e assim contribuir contra o ataque de herbívoros.

2.3 *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma lagarta conhecida como a lagarta do cartucho do milho (Figura 2). Em todo o Hemisfério Ocidental, *S. frugiperda* é a principal praga do milho (Nagoshi *et al.*, 2007). No Brasil, essa lagarta ocorre em todas as regiões produtoras, tanto nos cultivos de verão quanto na segunda safra.

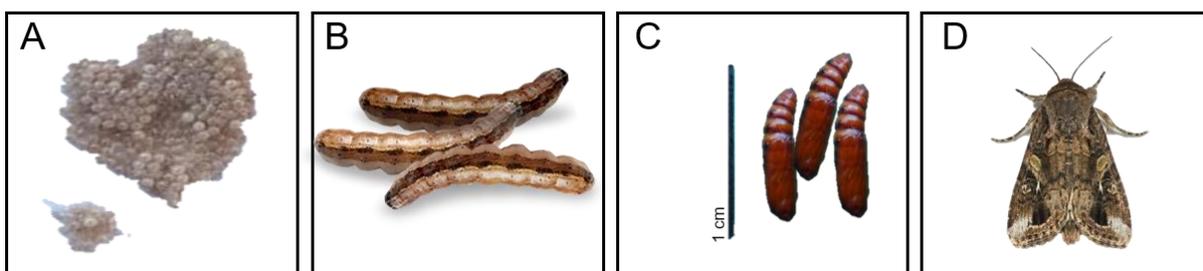


Figura 2. Fases do ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*: (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupa e (D) mariposa adulta. Fonte: Carolina Turatti Oliveira.

Por apresentar hábito generalista, *S. frugiperda* é considerada também uma praga importante de outros cultivos agrícolas, como o algodão, a soja e o sorgo (Cruz *et al.*, 2013). No caso do milho, as lagartas recém emergidas alimentam-se das folhas centrais, destruindo-as completamente. Dessa forma, a lagarta afeta a capacidade fotossintética da planta e, conseqüentemente, a produção (Sarmiento *et al.*, 2002). A lagarta-do-cartucho se alimenta em todas as fases de crescimento da planta, mas à medida que as lagartas crescem, aumentam os danos nas folhas e no cartucho do

milho, o que pode propiciar a entrada de patógenos e umidade, aumentando ainda mais os prejuízos (Rosa *et al.*, 2012).

O método convencional de controle de *S. frugiperda* nas lavouras é feito através do uso de inseticidas químicos (Busato *et al.*, 2006), que nem sempre é eficiente, uma vez que a lagarta tem o hábito de permanecer dentro do “cartucho” do milho, dificultando seu contato com o inseticida.

Outra estratégia de controle é o uso de plantas transgênicas expressando as proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que apresentam controle a um amplo espectro de pragas lepidópteros (Barcelos e Angelini, 2018). No entanto, a expressão contínua da(s) proteína(s) Bt nos tecidos da planta, associada com o cultivo intensivo e expressão de baixa dose da proteína inseticida e com proteínas que compartilham o mesmo modo de ação, além da baixa adoção de áreas de refúgio, acarreta uma elevada pressão de seleção sobre as pragas-alvo, favorecendo a evolução de resistência, e que vem sendo reportado para *Spodoptera frugiperda* (Huang *et al.*, 2014; Jakka *et al.*, 2016), tornando ainda mais urgente e necessário a identificação de novas moléculas promissoras para o controle desse inseto praga.

Outra técnica que vem sendo recentemente explorada é o silenciamento de genes de interesse através da interferência por RNA (RNAi). A técnica RNAi pode ser usada para suprimir genes essenciais ao inseto, levando à uma redução de seu *fitness* (e.g. enzimas digestivas) ou ocasionando a mortalidade (Scott *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2016). No entanto, em lepidópteros, relata-se uma inconsistência do silenciamento, sendo uma das causas a rápida degradação do *dsRNA* pelo complexo de multinucleases antes de atingir seu alvo, sendo necessário ainda um avanço maior da técnica para resultados realmente efetivos e aplicáveis para o controle de pragas (Terenius *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015).

2.4 Sistema digestório de insetos Lepidópteros

O sistema digestório dos insetos constitui a maior interface desprotegida de contato entre o inseto e o meio ambiente, tornando-se um alvo relativamente mais frágil para ser atacado por substâncias que visem desorganizar alguma de suas propriedades (Hakim, Baldwin e Smaghe, 2010). Assim, tem-se buscado cada vez mais uma maior compreensão sobre as enzimas, compartimentos e funções

intestinais dos insetos, pois estes parecem ser aspectos essenciais para o desenvolvimento de métodos de controle que exerçam sua função através do trato digestório dos insetos.

Embora haja uma considerável variação entre as ordens, o sistema digestório dos insetos é formado, em geral, por uma região anterior, uma média e uma posterior. O intestino anterior começa na boca e inclui a faringe, o esôfago, o papo e o proventrículo, que é um órgão triturador em alguns insetos e em outros apenas uma válvula que regula a entrada de alimento no intestino médio (IM), que é o principal sítio de digestão e absorção de nutrientes. O intestino posterior inclui os túbulos de Malpighi (órgãos excretores), o íleo, o cólon e o reto (envolvidos na absorção de água e íons) e por fim o ânus (Figura 3) (Terra e Ferreira, 2012).

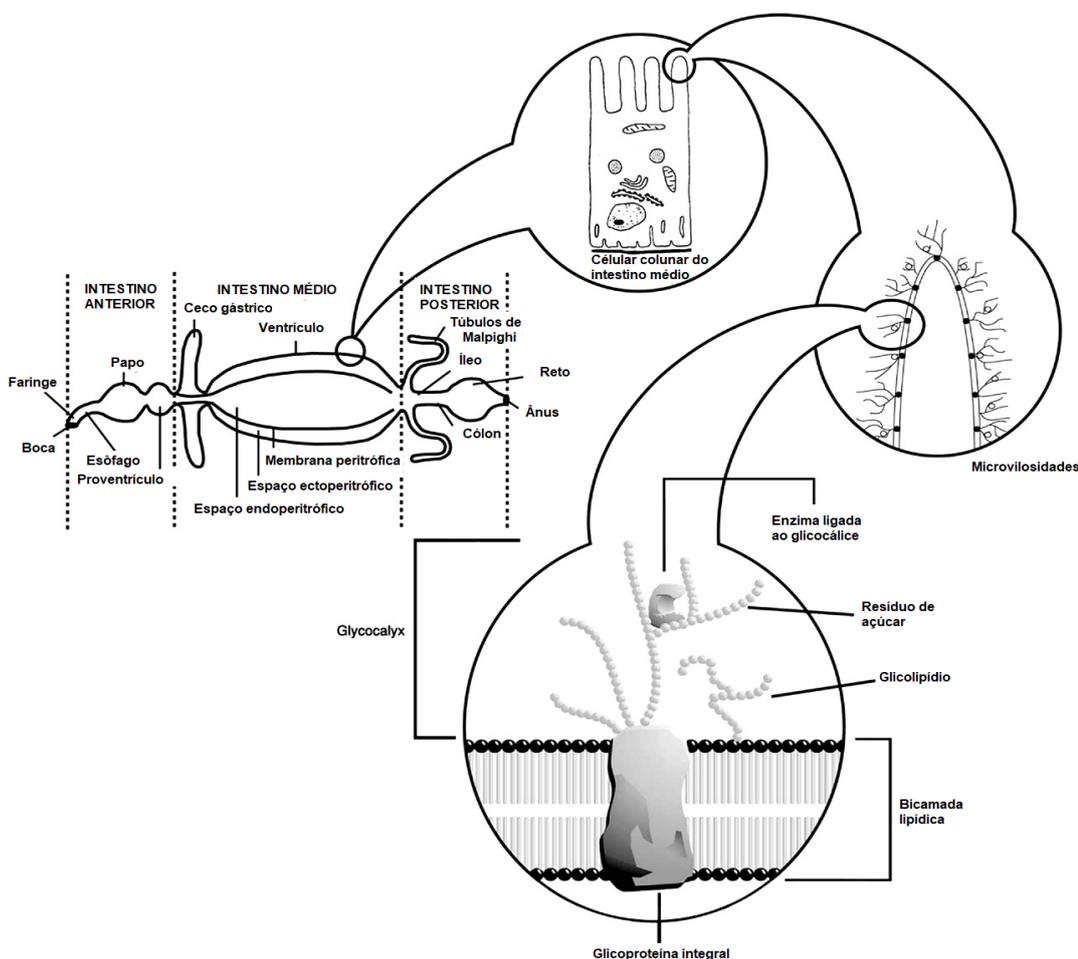


Figura 3. Representação dos compartimentos do sistema digestório dos insetos, suas células, vilosidades e glicoproteínas. Figura adaptada de Terra e Ferreira (2012).

O intestino médio é o compartimento responsável pela secreção de enzimas e pela absorção de nutrientes. O pH no IM de insetos da ordem Lepidoptera é bastante alcalino, variando de 9 a 12. Após ingerido, o alimento é transformado em bolo

alimentar e contido por uma membrana semipermeável denominada membrana peritrófica (MP), composta majoritariamente por quitina e glicoproteínas. A MP é uma membrana semipermeável que delimita o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico (espaço luminal entre a MP e o epitélio), funcionando como uma barreira física e química, além de possibilitar a ocorrência de um mecanismo de reciclagem de enzimas, sendo o fluxo dentro do espaço endoperitrófico no sentido anterior-posterior, enquanto no espaço ectoperitrófico observa-se o sentido oposto (Bolognesi *et al.*, 2001; Bolognesi, Terra e Ferreira, 2008; Hegedus *et al.*, 2009).

Essa compartimentalização do intestino permite que o alimento parcialmente digerido, ao ser transformado em partículas menores, atravesse a MP, entrando em contato com as enzimas responsáveis pela digestão intermediária do alimento. A compartimentalização permite ainda a prevenção da ligação não específica de alimento sobre a superfície celular, a prevenção da excreção de enzimas digestivas e a restrição dos oligômeros de hidrolases ao espaço ectoperitrófico devido ao seu elevado diâmetro (Terra e Ferreira, 2012).

As enzimas digestivas têm a função de hidrolisar os alimentos ingeridos em suas unidades oligoméricas para que sejam absorvidos pelas células intestinais. A digestão de proteínas é feita pelas peptidases, que catalisam a quebra hidrolítica das ligações peptídicas nas proteínas, processo este conhecido como proteólise. As peptidases são classificadas de acordo com o seu sítio de clivagem, em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, enquanto as exopeptidases atuam na porção final da cadeia retirando um resíduo de aminoácido da porção N-terminal (aminopeptidases) ou da porção C-terminal (carboxipeptidase) (Terra e Ferreira, 1994).

Uma classificação amplamente aceita de enzimas proteolíticas é baseada na natureza química dos grupos responsáveis pelas catálises. Cinco classes de peptidases (serino, treonina, cisteína, aspártica e tipos metalo) são reconhecidas. Uma serinopeptidase típica tem a tríade catalítica consistindo de His, Asp, e Ser no sítio ativo (Bergmann, 2006).

Em uma análise com 12 espécies de lepidópteros, Christeller *et al.* (1992) relata que a maioria das espécies se utiliza de tripsinas e elastases no sistema digestório, enquanto outras dependem largamente de quimotripsinas. Em geral, tripsinas e

quimotripsinas correspondem a 90% das enzimas digestivas em lepidópteros (Gatehouse *et al.*, 1998).

2.5 Proteína de reserva de *Talisia esculenta* (Talisin)

Talisia esculenta é uma espécie arbórea pertencente à família Sapindaceae. As árvores possuem de 5 a 15 m de altura e são conhecidas popularmente como pitombeiras ou pitomba (Figura 4). Esta espécie é nativa do oeste da Amazônia, porém é cultivada em quase todas as regiões do Brasil (Lorenzi, 2002). A árvore produz frutos comestíveis, que são pequenas drupas, sementes grandes e cobertas por uma polpa agridoce de coloração branco a transparente quando a fruta está madura (Figura 4D).



Figura 4. Árvores de *Talisia esculenta* (A), flores e frutos (B), frutos e folhas (C) e frutos e sementes (D). Fonte: Riet-Correa *et al.* (2014).

Freire *et al.* (2001) descreveram e caracterizaram parcialmente o isolamento de uma lectina a partir de sementes de *T. esculenta*, a qual foi denominada inicialmente TEL (*Talisia esculenta lectin*). Os autores relataram que a proteína

apresentava duas bandas em SDS-PAGE (20 e 40 kDa) e uma atividade hemaglutinante fraca. Dos vários açúcares testados, a lectina foi melhor inibida por manose. Mais tarde, Freire *et al.* (2009) buscando caracterizar melhor essa proteína, relataram que TEL na verdade seria uma proteína de reserva, que passou então a ser denominada Talisin. Neste estudo, demonstrou-se que Talisin apresenta características comuns a lectinas, porém com fraca atividade hemaglutinante se comparada a lectinas típicas. No entanto, Talisin apresenta uma forte interação com quitina. A análise em SDS-PAGE mostrou que Talisin (20 kDa) consiste de duas subunidades, que em condições nativas associam-se como uma proteína dimérica. Além disso, demonstrou-se que Talisin também apresenta propriedades de inibidores de peptidases e que seu mecanismo de inibição frente a tripsina é do tipo não-competitivo.

Através do sequenciamento N-terminal da proteína, os autores constataram que Talisin apresenta um alto grau de homologia com uma proteína de reserva de tecido vegetativo de *Litchi chinensis* (80%), bem como a uma proteína de reserva do tubérculo da batata (sporamin) (57%) e com as miraculinas (50%), também proteínas de reserva. Além disso, os autores obtiveram a sequência do cDNA, que foi clonado e as análises indicaram que Talisin possui uma sequência de 756 pares de base codificando uma proteína de 198 aminoácidos. A proteína deduzida apresenta uma alta similaridade a outras proteínas de reserva, bem como similaridade a inibidores de peptidase do tipo Kunitz (Freire *et al.*, 2009).

O potencial inseticida de Talisin já foi investigado em *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2002), *Diatraea saccharalis* (Freire *et al.*, 2012) e *Anticarsia gemmatalis* (Macedo *et al.*, 2010), demonstrando significativos efeitos negativos sobre o desenvolvimento destes insetos. No entanto, o mecanismo pelo qual Talisin exerce sua atividade tóxica ainda não foi completamente elucidado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão de Talisin no desenvolvimento larval de *S. frugiperda* e identificar neste inseto possíveis genes envolvidos em respostas adaptativas.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar *in vivo* o efeito da ingestão de Talisin sobre o peso e sobrevivência em larvas de quinto instar de *S. frugiperda* por duas gerações consecutivas;

Verificar o efeito da ingestão de Talisin sobre a atividade das principais enzimas digestivas deste inseto (tripsina, quimotripsina, aminopeptidase e α -amilase);

Analisar a expressão gênica das enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e aminopeptidase através de PCR quantitativo em tempo real, em resposta a ingestão de Talisin.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração e purificação de Talisin

As sementes de *Talisia esculenta* foram obtidas do banco de sementes do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande e purificadas como sugerido por Freire *et al.* (2012). As sementes foram descascadas, finamente trituradas em moinho elétrico e delipidadas com hexano para retirada dos lipídeos. Após o processo de delipidação, a farinha foi depositada em uma bandeja plástica revestida com papel filtro e permaneceu em capela de exaustão até que houvesse a completa volatilização do solvente. A farinha delipidada foi então submetida a uma extração proteica com solução de NaCl 150mM na proporção de 1:5 (m/v), sob agitação constante por 24 h a 4 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 10,000 g por 30 min na mesma temperatura, obtendo-se assim duas frações: o precipitado, que foi descartado e a fração sobrenadante, que teve seu volume medido, dialisado por 24 h contra água destilada a 4 °C, liofilizado e denominado Extrato Bruto (EB). O EB foi diluído em uma solução de NaCl 150 mM e aplicado em uma coluna Sephadex G-100 (2,5 cm x 80 cm) equilibrada com a mesma solução. A fração rica em proteínas foi recolhida e aplicada em uma coluna de quitina (1,5 cm x 10 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,6, e eluído com HCl 100 mM. A detecção de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm. A proteína purificada foi dialisada, liofilizada e armazenada a – 20 °C até o momento do uso.

4.2 Insetos

A colônia de *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) foi mantida em condições padrões de umidade e temperatura (27 ± 1 °C, 60–70% de umidade relativa), fotoperíodo de 14 h e alimentada em dieta artificial. A dieta artificial foi composta por feijão branco, gérmen de trigo, farinha de soja, caseína, complexo vitamínico, ácido ascórbico, ágar, formaldeído e inibidores microbianos (tetraciclina, ácido sórbico e nipagina) (Tabela 1), de acordo com Parra (1996). Esta dieta foi acondicionada em tubos de vidro de fundo chato de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, tampados com algodão hidrófobo (Figura 5D).

Tabela 1. Composição da dieta artificial para criação de *Spodoptera frugiperda*.

Componentes	Quantidade
Feijão	75 g
Gérmen de trigo	60 g
Proteína de soja	30 g
Caseína	30 g
Levedura de cerveja	37,5 g
Complexo vitamínico*	9 mL
Ácido ascórbico	3,6 g
Ácido sórbico	1,8 g
Metil-parahidroxibenzoato (Nipagin)	3 g
Tetraciclina	113 mg
Formaldeído	3,6 mL
Ágar	23 g
Água	1200 mL

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

4.3 Ensaio *in vivo* de primeira geração

Para avaliar os efeitos da ingestão de Talisin no desenvolvimento de *S. frugiperda* na primeira geração, larvas neonatas foram selecionadas e transferidas individualmente para tubos de vidro contendo dieta artificial suplementada com Talisin nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% (m/m) até atingirem o quinto instar. Larvas controle foram alimentadas em dieta artificial na ausência de Talisin. Cada tratamento foi composto por 20 larvas, e os resultados experimentais são a média de três bioensaios independentes. A sobrevivência e a massa larval foram determinadas quando as larvas atingiram o quinto instar sob condições padrões como citado anteriormente. O tratamento capaz de reduzir a massa larval em aproximadamente 50% comparado ao grupo controle foi selecionado para dar continuidade aos ensaios enzimáticos e moleculares, bem como dar continuidade às análises de desenvolvimento e de segunda geração.

A massa pupal, o estágio pupal e o número de adultos emergentes foram contabilizados para determinar a mortalidade (M). Além disso, o tempo decorrido da emergência das larvas até a morte dos adultos foi contabilizado para estimar a média de tempo de desenvolvimento total (TDT).

4.4 Ensaios *in vivo* de segunda geração

Para o estudo relativo à segunda geração dos insetos, os adultos oriundos da primeira geração foram colocados em gaiolas de PVC de 15 x 15 cm, revestidas internamente com papel, dispostas em pratos plásticos também forrados com o mesmo papel e fechadas na extremidade superior com tecido tipo tule, preso com elástico (Figura 5B). Foram preparadas duas gaiolas, sendo uma de insetos adultos que na fase larval foram alimentados em dieta controle e outra de insetos adultos alimentados na fase larval em dieta acrescida de 0,5% (m/m) de Talisin na primeira geração (Figura 5).

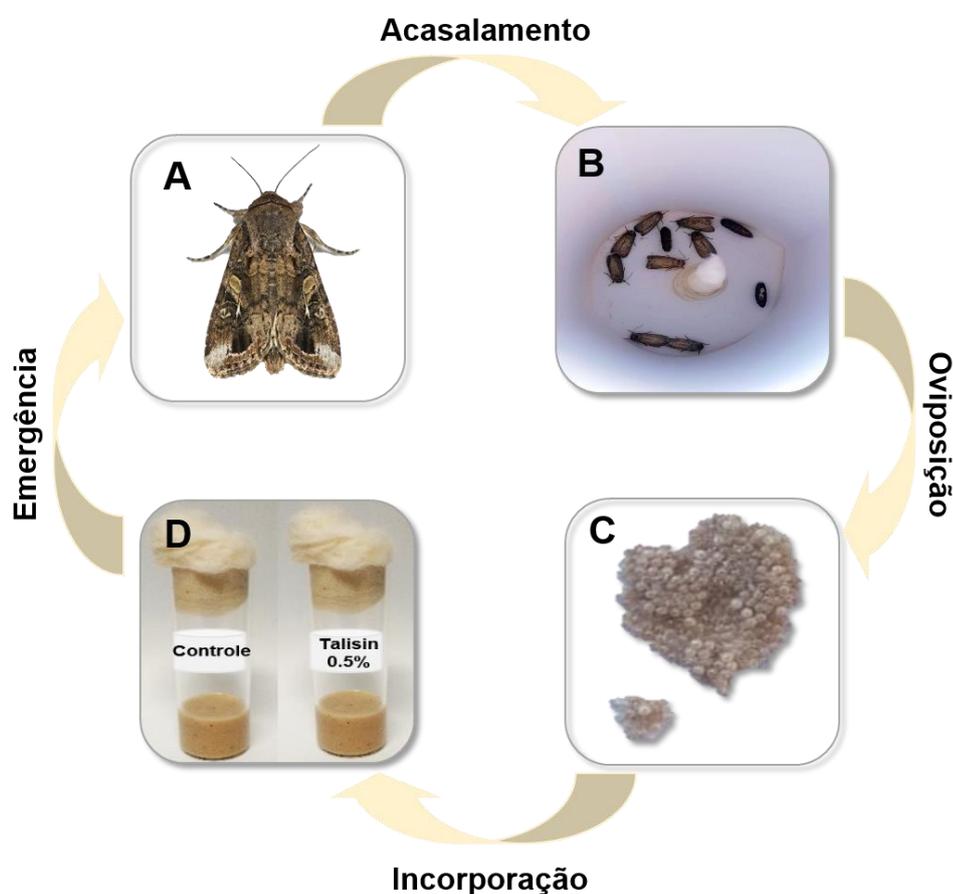


Figura 5. Representação esquemática das etapas para obtenção de insetos para os ensaios biológicos. (A) Adulto de *Spodoptera frugiperda*; (B) Tubo de PVC (revestido internamente com papel) para a realização do acasalamento dos insetos; (C) Imagem ampliada dos ovos visualizados em microscópio estereoscópico; (D) Tubos de incorporação. Fonte: Carolina Turatti Oliveira.

Durante a fase adulta, os insetos foram alimentados com solução de mel a 10%, fornecida por capilaridade através de pedaços de algodão mantidos em recipientes de vidro, e renovados a cada dois dias. Diariamente, os insetos foram observados e foi

feita a retirada da postura de ovos. Assim que ocorreu a eclosão dos ovos, larvas neonatas oriundas tanto do grupo controle quanto do grupo tratado foram colocadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% de Talisin, dando origem à quatro diferentes grupos: CC, larvas que se alimentaram em dieta controle por duas gerações consecutivas; CT, larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC, larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin nas duas gerações consecutivas (Figura 6).

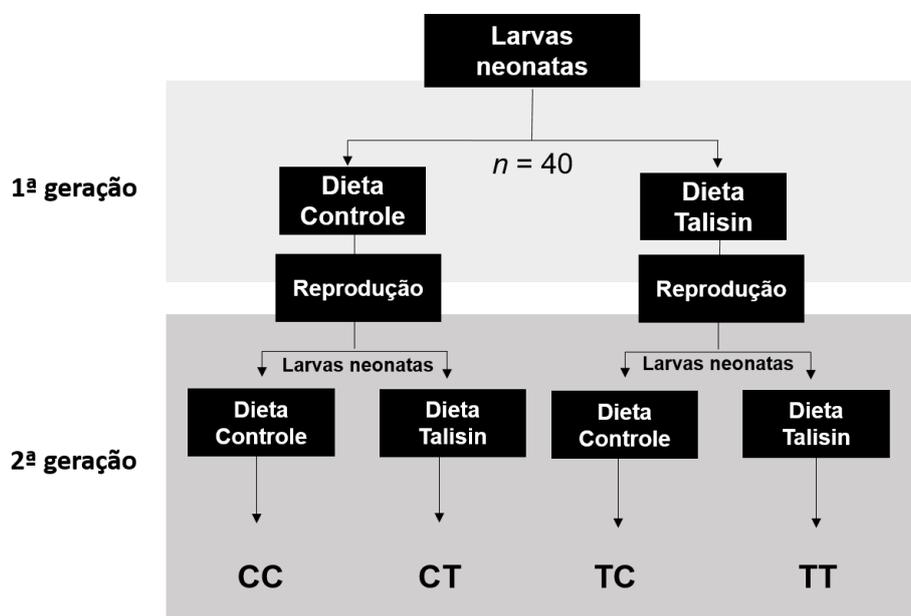


Figura 6. Fluxograma do experimento conduzido para obtenção das lagartas utilizadas nos experimentos de 2ª geração. CC: larvas que se alimentaram de dieta controle em duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

4.5 Preparação do intestino médio e das fezes

As larvas de quinto instar foram imobilizadas em gelo e tiveram seus intestinos removidos com auxílio de pinças e solução de NaCl 150 mM gelado. Foram preparados dois tipos de extratos: (I) extrato de todo o intestino médio (epitélio do intestino médio e conteúdo do lúmen) e (II) extrato apenas do epitélio do intestino médio.

Ao fim do quinto instar, as fezes das larvas foram separadas do restante da dieta remanescente nos tubos de dieta e então coletadas. Tanto as amostras do intestino médio quanto as amostras das fezes foram maceradas em NaCl 150 mM com auxílio de um homogenizador portátil Potter-Elvehjem. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14,000 *g* a 4 °C durante 20 min, e o sobrenadante foi estocado a – 20 °C até vir a ser utilizado como fonte enzimática.

4.6 Parâmetros nutricionais

O peso seco das larvas no seu desenvolvimento máximo, o alimento consumido e as fezes eliminadas foram pesados para determinar os parâmetros nutricionais ($n = 20$). Consumo, digestão, e índices de utilização do alimento foram calculados de acordo com metodologia proposta por Waldbauer (1968) e modificada por Scriber e Slansky Jr (1981). A massa do alimento ingerido durante o tempo T (I), ganho de massa larval durante T (B), média da massa larval durante T (\bar{B}), massa das fezes produzida durante T (F), e duração do período de alimentação (T) foram empregados para determinar os seguintes parâmetros: Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), calculado como $(B/I) \times 100$, expressando a porcentagem do alimento ingerido realmente convertido em biomassa; Eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), calculado por $[B/(I - F)] \times 100$, expressando a eficiência com a qual o alimento digerido é convertido em biomassa; Taxa de consumo relativo (RCR), calculada por $I/(\bar{B} \times T)$, expressando a quantidade de alimento ingerido por miligrama do peso corporal do inseto por dia; Taxa de crescimento relativo (RGR), calculada por $B/(\bar{B} \times T)$, indicando o ganho de biomassa do inseto em relação ao seu peso; Taxa metabólica relativa (RMR), calculada por $M/(\bar{B} \times T)$, indicando a quantidade de alimento gasto no metabolismo por miligrama do peso corporal; e a Digestibilidade aproximada (AD), calculada por $[(I - F)/I] \times 100$, expressando a quantidade de alimento ingerido que sofre digestão. O custo metabólico (MC) foi calculado por $100 - [B/(I - F)] \times 100$.

4.7 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) a 1 mg/mL como padrão.

4.8 Ensaio enzimáticos

A atividade das enzimas do tipo tripsina e quimotripsina foram determinadas de acordo com Oliveira *et al.* (2011). A atividade das enzimas do tipo tripsina foi determinada pela medida da atividade hidrolítica residual da enzima para o substrato N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA; Sigma-Aldrich). Amostras do extrato do lúmen intestinal (10 μ L) foram misturadas com 60 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, por 15 min, seguido da adição de 200 μ L de BAPNA por 30 min. A atividade de enzimas do tipo quimotripsina foi determinada utilizando N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine p-nitroanilide (SAAPFpNA; Sigma-Aldrich) como substrato. Amostras do extrato do lúmen intestinal (10 μ L) foram misturadas com 60 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, por 15 min, seguido da adição de 20 μ L de SAAPFpNA por 5 min. Todos os substratos foram usados em uma concentração final de 1 mM. Os ensaios foram conduzidos a 30 °C e a absorbância monitorada em 410 nm.

Para analisar a sensibilidade das enzimas do tipo tripsina presentes no extrato do lúmen intestinal das larvas frente à Talisin, foi feita uma curva de inibição com concentrações crescentes de Talisin (0-0,7 μ g), e a atividade da tripsina mensurada como descrito acima.

A atividade de α -amilase foi determinada empregando o reagente ácido 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS; Sigma-Aldrich), preparado de acordo com Noeltling e Bernfeld (1948). O aumento do poder redutor, medido pelo reagente DNS, foi usado como medida para digestão do amido. Alíquotas (25 μ L) do extrato intestinal foram incubadas com 25 μ L de uma solução tampão-substrato (1% de amido solúvel em tampão 50 mM CAPS, pH 9,6 contendo CaCl_2 2 mM e NaCl 20 mM). A reação foi parada com a adição de 200 μ L de DNS. A solução resultante foi aquecida em água fervente por 5 min e, então, resfriada. Foram adicionados 200 μ L de água destilada e a absorbância lida em 550 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de equivalente de maltose por minuto.

O ensaio enzimático para detecção da atividade de aminopeptidase N foi realizado utilizando o substrato sintético leucine p-nitroanilide (LpNa; Sigma-Aldrich) em uma concentração de 1 mM, como descrito por Erlanger, Kokowsky e Cohen (1961). O volume de reação compreendeu 10 µL do extrato do epitélio intestinal ou extrato do lúmen intestinal e 40 µL de substrato em tampão 50 mM Tris, pH 7,5 a 30 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido acético 30%. A absorbância foi monitorada em 410 nm.

Três experimentos independentes foram feitos em triplicada para cada ensaio.

4.9 Atividade proteolítica do extrato intestinal em gel nativo de poliacrilamida contendo 1% de caseína

A eletroforese em gel nativo de poliacrilamida foi utilizada para separar as peptidases em gel de poliacrilamida descontínuo (4% de gel de empilhamento e 8% em gel de resolução), como descrito por Hivrale *et al.* (2013) com algumas modificações. O extrato do intestino médio (6 µg de proteína) de larvas alimentadas com Talisin a 0,5% (m/m) e em dieta controle foram carregados em um gel nativo de poliacrilamida. Para permitir a identificação de enzimas do tipo tripsina, as amostras foram incubadas com o inibidor sintético de tripsina TLCK (1 mM N-p-tosyl-lysine chloro-ketone) a 30 °C por 30 min antes de ser aplicado ao gel. As amostras também foram incubadas com Talisin a 30 °C por 30 min antes de ser aplicado ao gel. A eletroforese foi realizada a 20 mA. Após a corrida, o gel foi lavado com água destilada e equilibrado em tampão glicina-NaOH 0,1M em pH 9,6. Após o equilíbrio, o gel foi colocado em um recipiente contendo solução de caseína 1% (m/v) (preparado no mesmo tampão), incubado a 30 °C durante 2 h, corado com azul brilhante Coomassie R-250 e em seguida descorado para visualização da atividade proteolítica.

4.10 Digestão de Talisin

Para investigar a resistência de Talisin à proteólise, Talisin foi incubada com o extrato do intestino médio de larvas de quinto instar de *S. frugiperda* (alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) de Talisin) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 por diferentes períodos. A razão proteica Talisin:extrato intestinal foi de 1:5. A digestão foi realizada a 30 °C por 0,5, 2, 8, 16 e 24 h e interrompida pela imersão das

amostras em água fervente por 2 min. A degradação do BSA foi usada como um controle positivo para a atividade proteolítica. As proteínas foram subsequentemente separadas por SDS-PAGE (15%), como descrito por Laemmli (1970), e então coradas com 0,1% de azul brilhante Coomassie R-250 para detecção. A massa molecular relativa aos produtos da digestão foi estimada utilizando marcadores moleculares de massa conhecida.

4.11 Microscopia

Para as análises histopatológicas do intestino médio de *S. frugiperda*, foram examinadas seções de larvas inteiras, tanto alimentadas em dieta controle quanto dieta contendo Talisin (0,5%, m/m). Para a microscopia de luz, as larvas inteiras foram fixadas *overnight* em solução de Bouin após várias incisões na cutícula para permitir a permeação do fixador neste local. As larvas foram então embebidas em parafina usando o processador automático de tecido Leica TPT1020. As seções foram cortadas usando micrótomo rotativo Leica RM2255 a 3-5 μm , coradas com hematoxilina/eosina e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem DePeX. O material foi então analisado e fotodocumentado em microscópio Olympus BX41.

4.12 PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído dos intestinos médios congelados em nitrogênio líquido utilizando 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen). Após extração, as amostras foram tratadas com DNase I (Thermo Scientific) a 37 °C por 1 h. A quantificação e checagem da qualidade do RNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro SimpliNano (GE Healthcare) e eletroforese em gel de agarose 1,0%, utilizando voltagem constante de 90 V durante 30 min. O gel de agarose foi preparado dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, pH 8,0 e 1 mM EDTA). Para visualização do gel, foi adicionado às amostras de RNA tampão de amostra contendo Gel Red. Após a separação eletroforética, o gel foi digitalizado em fotodocumentador (UVP ChemiDoc-It®2). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído em uma solução de trabalho e 8 μL foi usado na reação de qPCR. Para as análises de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram

utilizadas quatro réplicas biológicas e duas réplicas técnicas. A reação foi realizada no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)* (Thermo Scientific). O *master mix* preparado para análise de cada gene foi composto de 1 µL de *primer forward* (10 µM), 1 µL do *reverse primer* (10 µM), 10 µL de SYBR®, e 8 µL de cDNA (20 ng) em um volume total de 20 µL. As condições da reação de amplificação foram 95 °C por 10 min, 95 °C por 15 min seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 min, e 60 °C por 1 min. A curva de *Melt* foi incluída em seguida com uma rampa de temperatura de 60 – 95 °C por 1 °C a cada 5 s, para confirmar a ausência de amplificações não específicas. Os genes, da proteína ribossomal S30 e gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH), foram usados como genes de referência para normalizar os dados (Shu *et al.*, 2018). A quantificação relativa foi feita utilizando o programa REST® (Pfaffl, 2001). Os experimentos foram repetidos duas vezes para validação dos resultados.

Na Tabela 2 são relacionados os *primers* dos genes de tripsina e quimotripsina, sendo que SfTry6, SfTry7, SfTry8, SfTry12, SfChy2, SfChy5, SfChy7, SfChy11, SfChy12, SfChy17, SfChy 19, SfChy21 e SfChy22 foram desenhados e descritos anteriormente por Dias *et al.* (2015). Os *primers* SfTry1, SfTry2, SfChy4, SfChy15 e SfChy23 (Tabela 2) foram desenhados em regiões não homólogas ao longo do transcrito para o gene, utilizando o programa Amplifix® v. 1.7.0, onde é possível predefinir o tamanho das sequências, a sua temperatura de anelamento, a quantidade relativa de cisteínas e guaninas presentes, bem como avaliar a possibilidade de formação de estruturas secundárias, auto complementariedade e complementariedade com outros *primers*. Os *primers* dos genes de aminopeptidase (Tabela 2) foram desenhados a partir de sequências parciais de RNAm de aminopeptidases de *S. frugiperda* disponíveis na base de dados do NCBI. Para averiguar a especificidade dos *primers*, foi realizado um BLASTn no site ncbi.nlm.nih.gov entre as sequências dos *primers* e todas as sequências dos genes utilizados. Este mesmo parâmetro foi confirmado por PCR convencional, assim como a temperatura de anelamento. Já a eficiência de amplificação de cada *primer* foi obtida por meio do programa LinRegPCR, sendo considerados os *primers* com eficiência entre 90 e 100% (Ramakers *et al.*, 2003).

Tabela 2. Lista de iniciadores (*primers*) utilizados para a validação da expressão através de qPCR de tripsinas, quimotripsinas e aminopeptidases. TA: temperatura de anelamento.

Gene	Sequência do <i>primer</i>		
	<i>Foward</i> (5' – 3')	<i>Reverse</i> (5' – 3')	TA (°C)
SfS30	CACCCTCGGTGTTAGACGTT	CCACCGGGAAAGTGATACTGT	60/58
SfGAPDH	TCATCTCCAACGCTTCCTG	CATCACGCCACAGTTTTCC	60/58
SfTry1	ACGAGGTGGCAATTAGGAAG	GATCATGCTGCTGGTGACAG	60
SfTry2	CACACAGTGTCCCAGCTAGTCC	GGCTGGACGCTGTTGGAGTAT	60
SfTry6	TTGTGTTTCTGGCTCTGTGC	GGATCGGTTGTTGAGAATGG	60
SfTry7	TCGAGAATTACCCAGCATC	AGGTACCGGCTCTGATACGA	60
SfTry8	TCTTCTTTCGCACACAGTGG	GAAGGCAGATGGAGAGTGG	60
SfTry10	TCCGTACAGTCCAGCTTGT	CACCAATGACGATGCCGTTGT	60
SfTry11	TCAGAACCCGAATCGCATCGT	GGGTAAGCAAGGAACCTCCACA	60
SfTry12	CCTCGATTACCGCTCTCTTG	GCCATCTGTTCACTTGGTCA	60
SfChy2	CGTCTCAGGAAAACCCAGTC	AGGGACGTTGGAAATGTCAG	60
SfChy4	TGTCATGCATCCCAACTGGACT	CAGATGGCAGAGCGATAGGAGA	60
SfChy7	TTCCTGAGCCACGTTAGCTT	CAAGACAGGCTCGTTGTTGA	60
SfChy11	GGCTCCACCACTCTCTTCAC	GCAATGGGTTGGATGTTAGC	60
SfChy15	ATGACCAGCCAATCAGCTCAGT	TGTACCCTTCCCTGACCTTCCA	60
SfChy17	CTTTAGTGGCGGTGTCTTCC	GCTTCTATCTCGGCTTGTCG	60
SfChy19	ACGAACCCACGACTAACAC	TCCCTGGCAAATACCAACTC	60
SfChy21	CAATTTGCCGTCTTCAGT	CACCACCGAGTATAGGATT	60
SfChy22	CTTGCCCTACGCTAATGTTG	CTGCTCCTCTACCTTACG	60
SfChy23	AACCAGAACGGCGTACCTACTT	ACTGGCGGATGAAACTGTCGAA	60
SfAPN1	TAACCCTGCAGTGTCTGATCC	CGAAGACCCTTCTCATAGGTGT	58
SfAPN3	AACGACTGGTGGGACGTTCTAT	GTGTGTA CTTGCTCAGGAACGA	60
SfAPN4	ACAGTGCCCTCAATGCAGAT	CTCCTTTGGCATAGCTGGTAGT	60
SfAPN6	CTCCTTCCTCAGAATGACAGCA	GCTTCGTT CATAGCTTGCAAGA	58

4.13 Modelagem molecular

Estudos de modelagem molecular foram realizados com as sequências primárias de Talisin de *Talisia esculenta* (GenBank: ACJ51124.1), assim como tripsinas (NCBI sequência de referência: XP_022821647.1 e XP_022821658.1) e quimotripsinas (GenBank: ALO61082.1 e AIR09774.1) de *Spodoptera frugiperda*. O peptídeo sinal e a topologia transmembrana foram preditos através do servidor Phobius (Käll, Krogh e Sonnhammer, 2007) e desconsiderados para as demais análises. Os zimogênios não ativos também foram removidos de modo a obter as

sequências de serinopeptidases ativas. As estruturas modelo para a realização de modelagem molecular comparativa foram identificadas através das análises por BLASTp (Altschul *et al.*, 1990). Foram gerados cem modelos tridimensionais teóricos utilizando o programa MODELLER v 9.17 (Webb e Sali, 2016), e utilizando como estrutura modelo: (i) a estrutura cristalográfica do inibidor do tipo Kunitz (STI) obtido a partir de sementes de *Delonix regia* (Krauchenco *et al.*, 2001) para Talisin; (ii) a estrutura cristalográfica da tripsina de *Fusarium oxysporum* (Rypniewski *et al.*, 2001), para tripsina; e (iii) a colagenase das larvas da mosca *Hypoderma lineatum* (Broutin *et al.*, 1996), para quimotripsina. Todos os modelos foram classificados de acordo com o DOPE score (energia livre). Os modelos de menor energia livre foram validados quanto à estereoquímica e enovelamento usando os servidores PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e ProSa-web (Wiederstein e Sippl, 2007), respectivamente.

4.14 Docking molecular

Uma vez validados, os modelos teóricos para Talisin, tripsinas e quimotripsinas foram utilizados como entradas para simulações de *docking* molecular, a fim de melhor compreender as possíveis interações ocorridas nos complexos Talisin/peptidases. O programa AutoDock Tools (Trott e Olson, 2009) foi utilizado para configurar caixas contendo 60 x 60 x 60 pontos com 1 Å de espaçamento e posicionada no centro das serinopeptidases. A liberdade máxima para as cadeias laterais de Talisin foi bloqueada. Cinquenta simulações de *docking* molecular foram realizadas usando o programa AutoDock 4.2 (Trott e Olson, 2009), e os complexos foram classificados de acordo com suas afinidades de ligação em kcal/mol. Os complexos de melhor afinidade para cada condição foram então submetidos a 50.000 passos de minimização de energia (*steepest descent*) em caixas cúbicas preenchidas com moléculas de água de carga pontual (SPC) usando o campo de força do pacote computacional GROMACS 5.0.4 (Abraham *et al.*, 2015). A visualização das estruturas e a predição das interações atômicas (respeitando a distância máxima de 3.6 Å) foram feitas no PyMOL (<https://pymol.org>).

4.15 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão, quando apropriado. Os dados de mortalidade, duração dos períodos larval e pupal, parâmetros nutricionais e atividade enzimática foram submetidos a análises de variância com um fator (*one way ANOVA*). Quando foram encontradas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Tukey para determinar o nível de significância ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos de Talisin no desenvolvimento do inseto

Dietas contendo 0,1%, 0,5% e 1% de Talisin (m/m) causaram a redução da massa larval em aproximadamente 26, 48 e 73%, respectivamente (Figura 7B e C). Apesar da significativa redução do peso, a ingestão de Talisin não afetou a sobrevivência larval (Figura 7A).

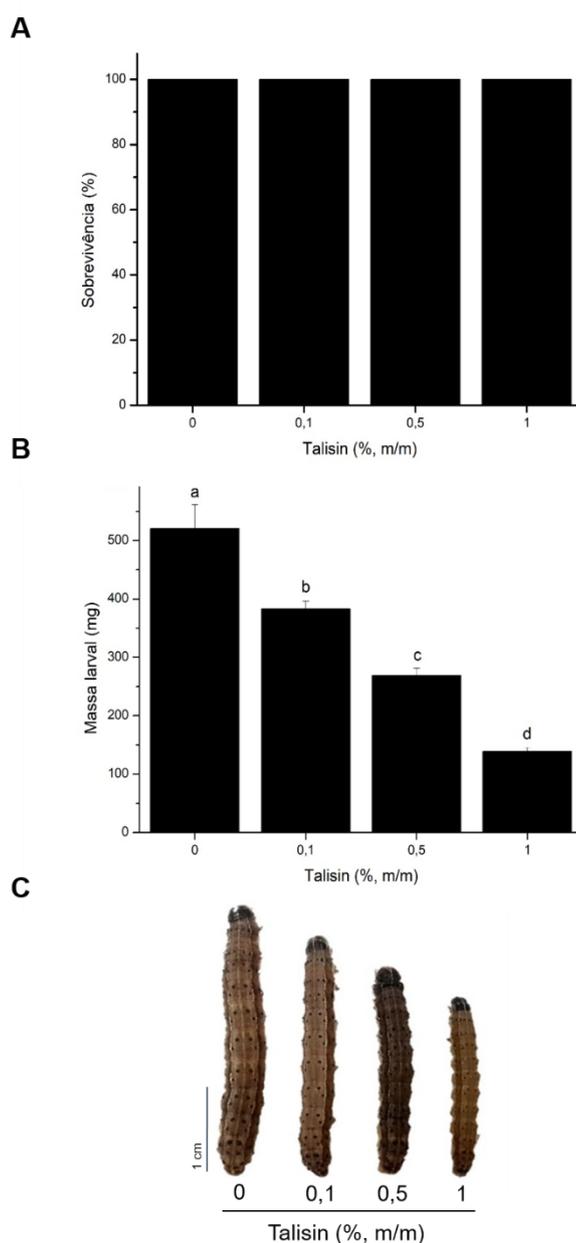


Figura 7. Efeito da ingestão de Talisin na sobrevivência (A) e massa (B) de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin. (C): Diferença de tamanho e peso em larvas alimentadas com Talisin. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$; Teste de Tukey).

Para avaliar o efeito de Talisin (0,5%) na longevidade, os insetos foram monitorados nos estágios larval e adulto até a morte. Nos insetos alimentados com Talisin, o estágio larval foi estendido em 1 dia e o tempo de desenvolvimento total (TDT), que compreende a eclosão até a morte dos adultos, foi 3,3 dias maior comparado ao controle (Tabela 3). Além disso, nenhuma diferença significativa foi encontrada na duração do estágio pupal ou na sobrevivência até a fase adulta (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros fisiológicos analisados durante o desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin.

	Controle	Talisin 0,5%
Massa pupal (mg)	275,08 ± 13,25 ^a	272,86 ± 15,67 ^a
Estágio larval (dias)	18,80 ± 0,97 ^a	19,7 ± 0,78 ^b
Estágio pupal (dias)	9,6 ± 0,91 ^a	10,4 ± 1,01 ^a
Tempo de desenvolvimento total (dias)	35,7 ± 2,53 ^a	39,00 ± 0,89 ^b
Emergência de adultos (%)	100 ^a	100 ^a

Valores são as médias ± desvio padrão. Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$).

5.2 Consumo e utilização do alimento

Larvas alimentadas com Talisin (0,5%) consumiram 9% a mais de alimento e produziram 36% a menos de fezes que o controle, resultando em diferença significativa na digestibilidade aproximada (AD) (Tabela 4). A AD das larvas alimentadas com Talisin aumentou em 21% em comparação ao controle. Contudo, a AD foi o único parâmetro nutricional alterado entre o grupo controle e alimentado com Talisin (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros nutricionais em larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* no controle e tratamento contendo Talisin 0,5%.

	Controle	Talisin 0,5%
RCR	0,749 ± 0,080 ^a	0,764 ± 0,259 ^a
RGR	0,083 ± 0,006 ^a	0,080 ± 0,010 ^a
RMR	0,390 ± 0,061 ^a	0,460 ± 0,201 ^a
AD	63,526 ± 4,025 ^a	76,855 ± 7,604 ^b
ECl	11,966 ± 1,813 ^a	11,215 ± 3,442 ^a
ECD	17,861 ± 2,605 ^a	14,838 ± 5,818 ^a
CM	85,447 ± 6,518 ^a	92,591 ± 6,568 ^a

RCR: taxa de consumo relativo (g/g/dia); RGR: taxa de crescimento relativo (g/g/dia); RMR: taxa metabólica relativa (g/g/dia); AD: digestibilidade aproximada (%); ECl: eficiência de conversão do alimento ingerido (%); ECD: eficiência de conversão do alimento digerido (%); CM: custo metabólico (%).

5.3 Atividade enzimática em larvas alimentadas com Talisin na primeira geração

Para avaliar o efeito *in vitro* de Talisin sobre as tripsinas de *S. frugiperda*, Talisin foi incubada com o extrato intestinal de larvas de quinto instar. Este ensaio mostrou que concentrações crescentes de Talisin causam um efeito inibitório significativo na atividade das tripsinas deste inseto (Figura 8).

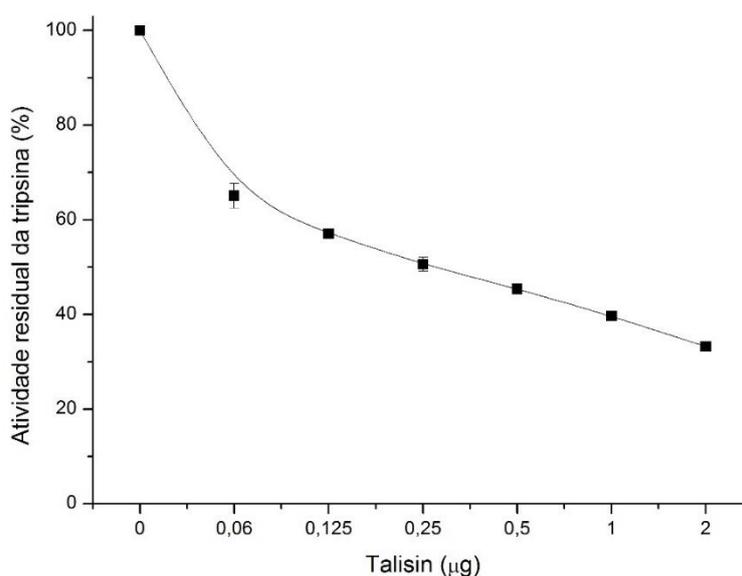


Figura 8. Atividade inibitória de Talisin sobre as enzimas do tipo tripsina presentes no fluido intestinal de lagartas de 5^o instar de *Spodoptera frugiperda*.

Avaliamos em seguida, a atividade proteolítica *in vivo* das enzimas do tipo tripsina oriundas de larvas alimentadas com Talisin, tanto do lúmen intestinal quanto das fezes, e os resultados mostram uma redução de 30 e 35% de atividade, respectivamente (Figura 9). Além disso, a sensibilidade das enzimas tripsinas de larvas alimentadas com Talisin foi alterada quando comparada a atividade das tripsinas de larvas controle. A atividade das tripsinas de larvas alimentadas com Talisin apresentaram menor inibição após a exposição crônica a Talisin (Figura 10).

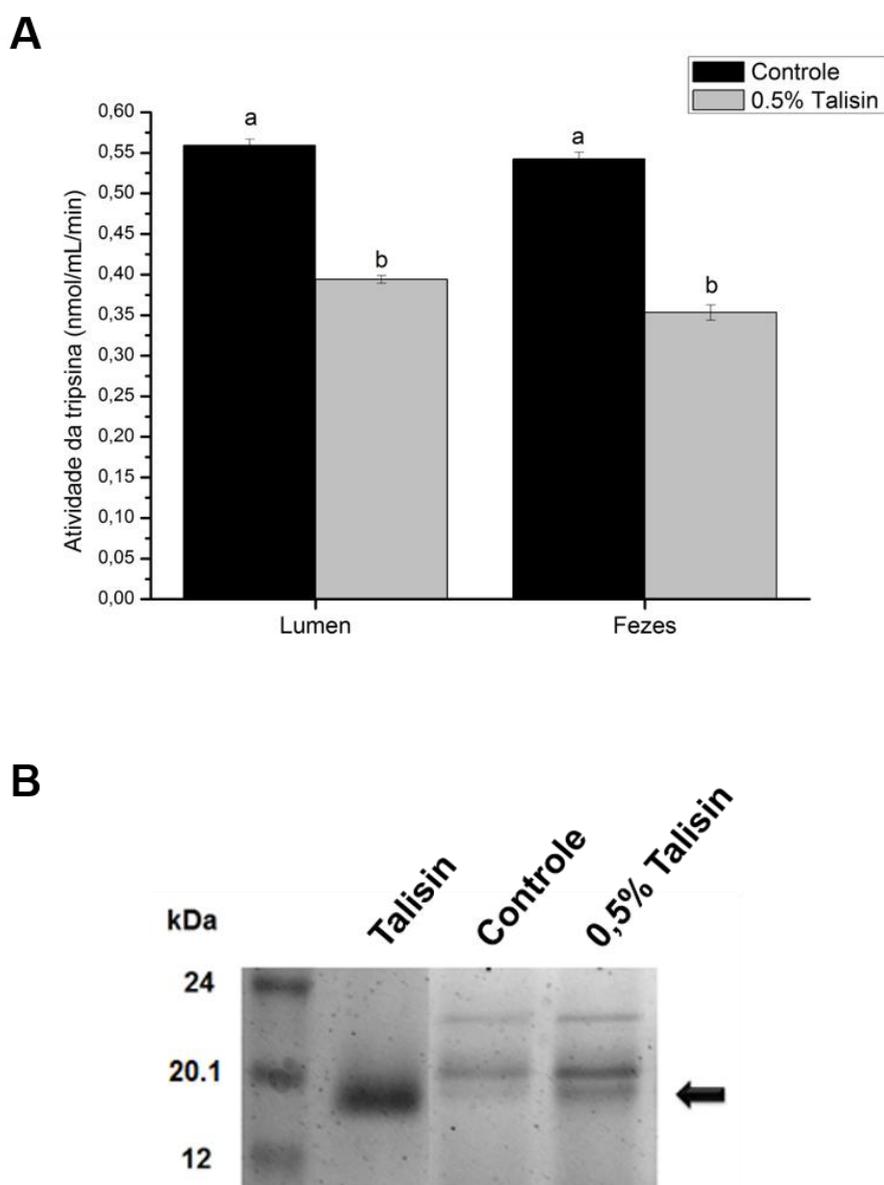


Figura 9. (A) Atividade de enzimas do tipo tripsina no lúmen intestinal e nas fezes de larvas de 5^o instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA). (B) SDS-PAGE 15% do extrato fecal de larvas de quinto instar de *S. frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin.

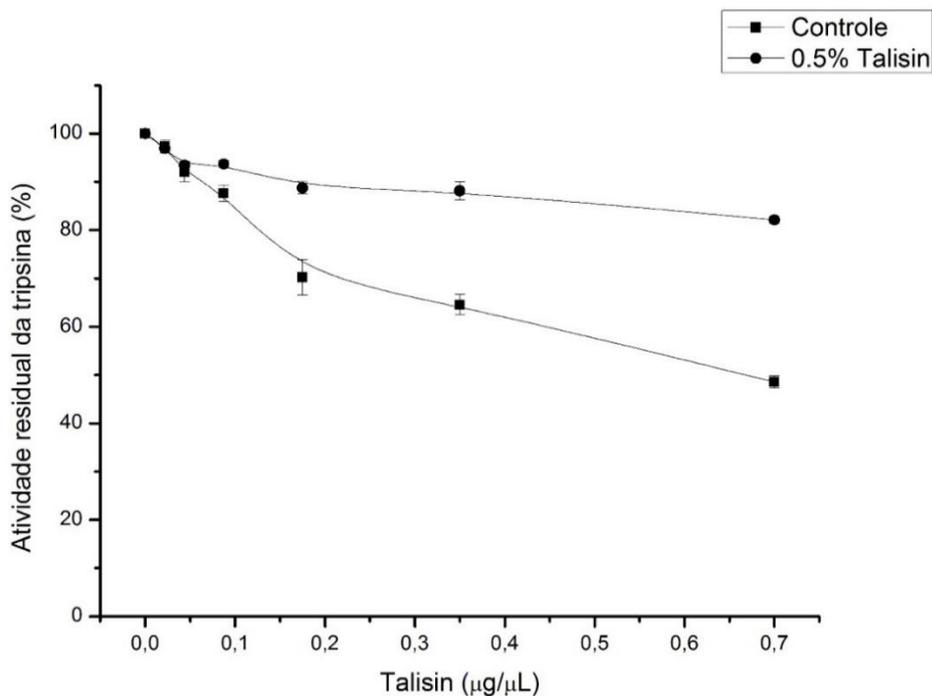


Figura 10. Inibição por Talisin da atividade de tripsinas presentes no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% (m/m) Talisin.

A atividade das aminopeptidases-N medida a partir do extrato do epitélio intestinal de larvas alimentadas com Talisin aumentou 25% em comparação ao controle. Um aumento ainda mais expressivo (70%) foi medido no extrato obtido a partir do lúmen intestinal (Figura 11). Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à atividade das quimotripsinas (Figura 12) e α -amilases (Figura 13).

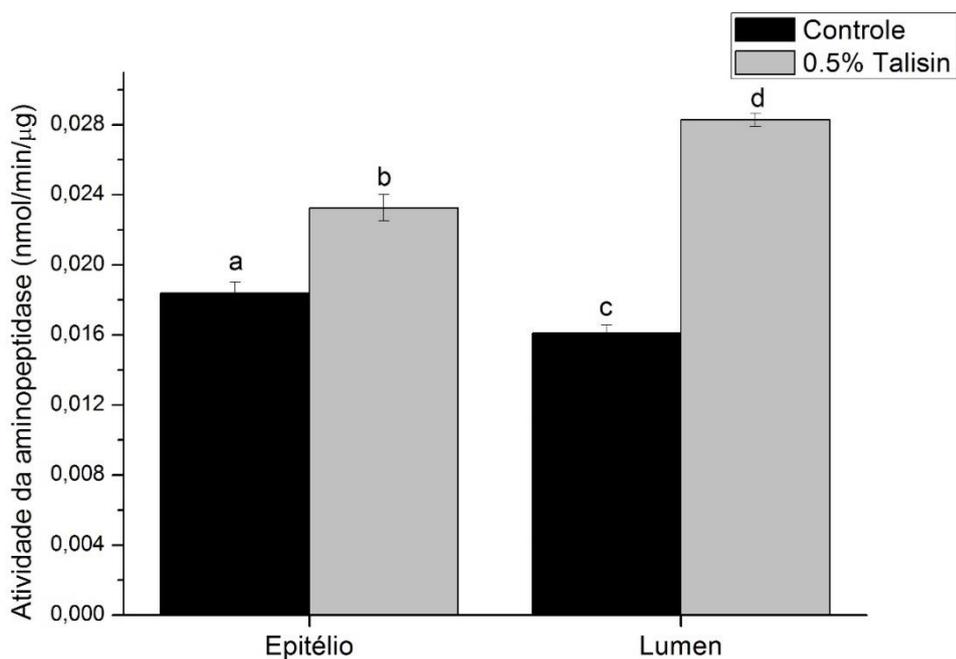


Figura 11. Atividade de enzimas aminopeptidase-N no epitélio e lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).

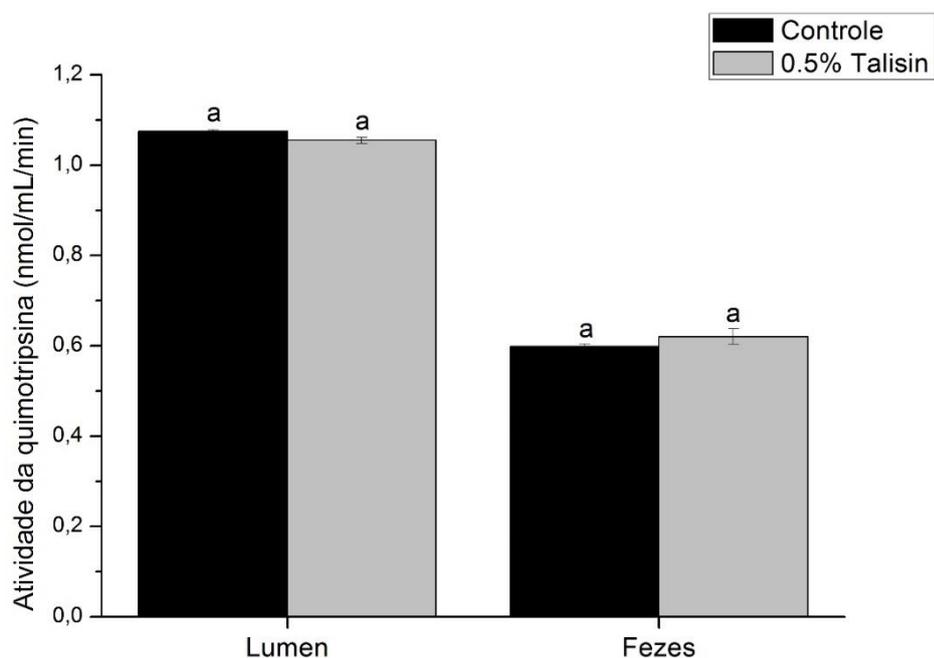


Figura 12. Atividade de enzimas do tipo quimotripsina no lúmen intestinal e nas fezes de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).

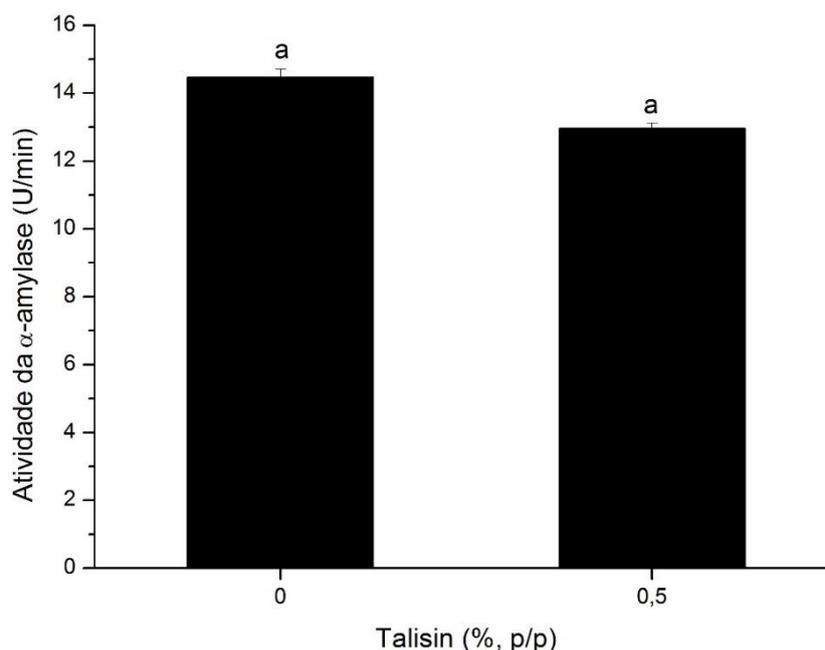


Figura 13. Atividade de enzimas α -amilase no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA).

5.4 Visualização em gel da atividade proteolítica

A zimografia de caseína foi realizada para visualização da atividade proteolítica do extrato intestinal de larvas controle e larvas alimentadas com 0,5% de Talisin. As peptidases do intestino médio de *S. frugiperda* (SfGP) foram designadas como SfGP1 a SfGP6 (Figura 14). A incubação das amostras com TLCK demonstrou que SfGP1 e SfGP4 são enzimas do tipo tripsina, pois a intensidade destas bandas apresentou-se diminuída após a incubação. A visualização do gel não foi suficiente para revelar diferenças na atividade enzimática entre larvas controle e tratadas com Talisin (Figura 14, colunas 1 e 2). No entanto, a incubação de Talisin com o extrato intestinal, tanto de larvas controle quanto de larvas alimentadas com Talisin, mostrou que a atividade proteolítica nestas amostras foi inibida (Figura 14, seta do lado direito, colunas 5 e 6).

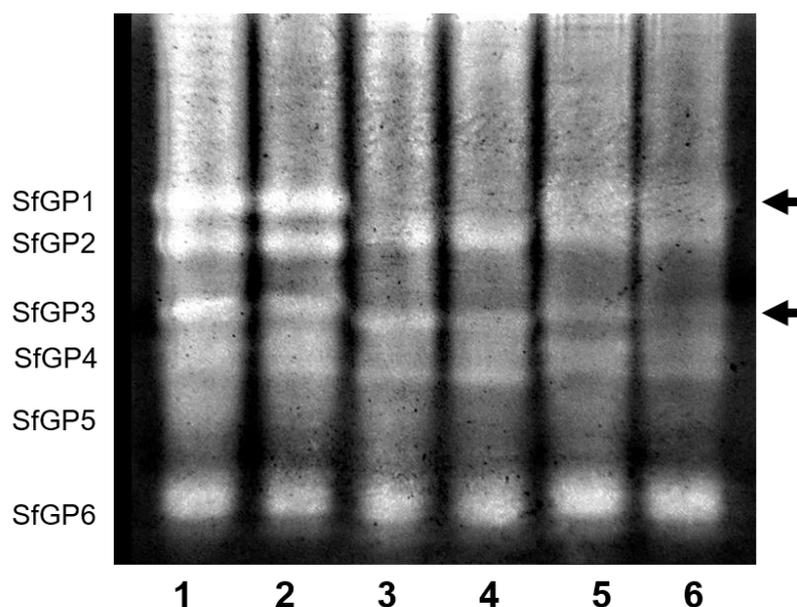


Figura 14. Atividade proteolítica de enzimas presentes no intestino médio de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). As bandas foram designadas SfGP1 a SfGP6. Linha 1: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta controle; Linha 2: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta contendo Talisin; Linhas 3 e 5: extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta controle incubadas com TLCK e Talisin, respectivamente; Linhas 4 e 6: extrato intestinal de larvas alimentadas com Talisin incubadas com TLCK e Talisin, respectivamente. TLCK: Inibidor sintético de tripsina. As setas ao lado direito indicam bandas inibidas.

5.5 Efeito da ingestão de Talisin em larvas de segunda geração

Para as análises comparativas em larvas de segunda geração, foi necessário montar quatro grupos, sendo um grupo formado por larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas (CC), um grupo alimentado em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin (0,5%, m/m) na segunda geração (CT), um grupo alimentado com Talisin por duas gerações consecutivas (TT) e um grupo alimentado em dieta contendo Talisin na primeira geração e em dieta controle na segunda geração (TC). Os resultados indicam que larvas que tiveram contato com Talisin na primeira geração apresentaram uma redução da massa larval de aproximadamente 30% quando comparada com seu respectivo controle, e larvas que se alimentaram de Talisin por duas gerações consecutivas tiveram uma redução da massa larval de 35% comparada também com seu respectivo controle. Essa redução se torna bem mais acentuada se comparada entre o grupo alimentado em dieta controle por duas gerações consecutivas (CC) e o grupo alimentado com Talisin por duas gerações consecutivas (TT) (Figura 15B). Apesar da evidente redução da

massa larval após ingestão de Talisin, não houve alteração na sobrevivência larval (Figura 15A).

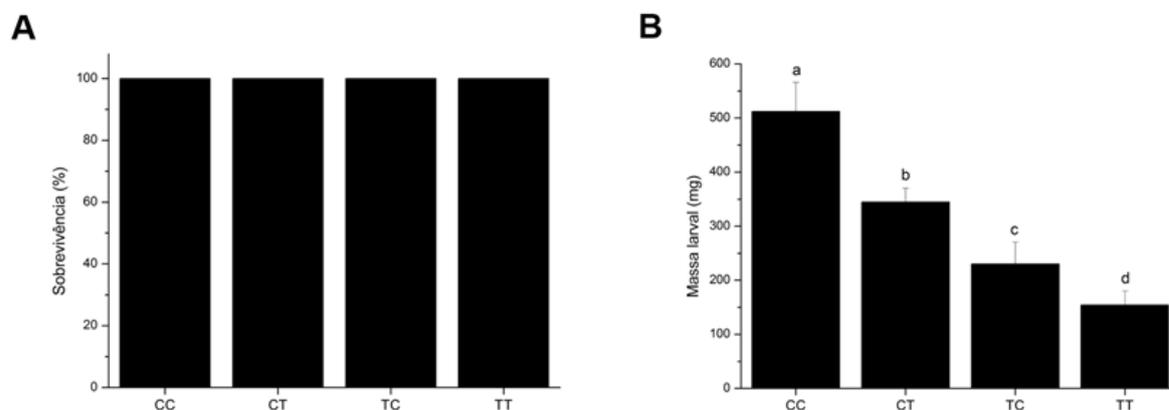


Figura 15. Efeito da ingestão de Talisin na sobrevivência (A) e massa (B) de larvas de 5º instar da 2ª geração de *Spodoptera frugiperda*. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

5.6 Atividade enzimática em larvas alimentadas com Talisin na segunda geração

Na segunda geração, larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin apresentaram uma redução na atividade das tripsinas de 25% comparada ao controle (Figura 16). As larvas oriundas de insetos alimentados com Talisin na primeira geração e que foram alimentadas em dieta controle na segunda geração (TC) reestabeleceram os níveis normais de atividade das tripsinas na segunda geração (Figura 16).

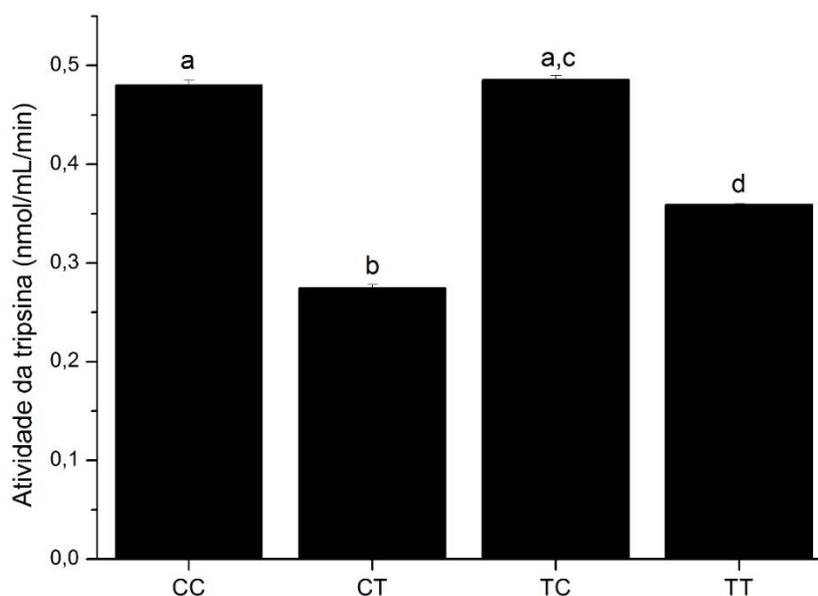


Figura 16. Atividade das enzimas do tipo tripsina no lúmen intestinal de larvas de 5^o instar de 2^a geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

Além disso, um ensaio de inibição das tripsinas, revelou que larvas alimentadas com Talisin apresentaram menor inibição por Talisin (Figura 17).

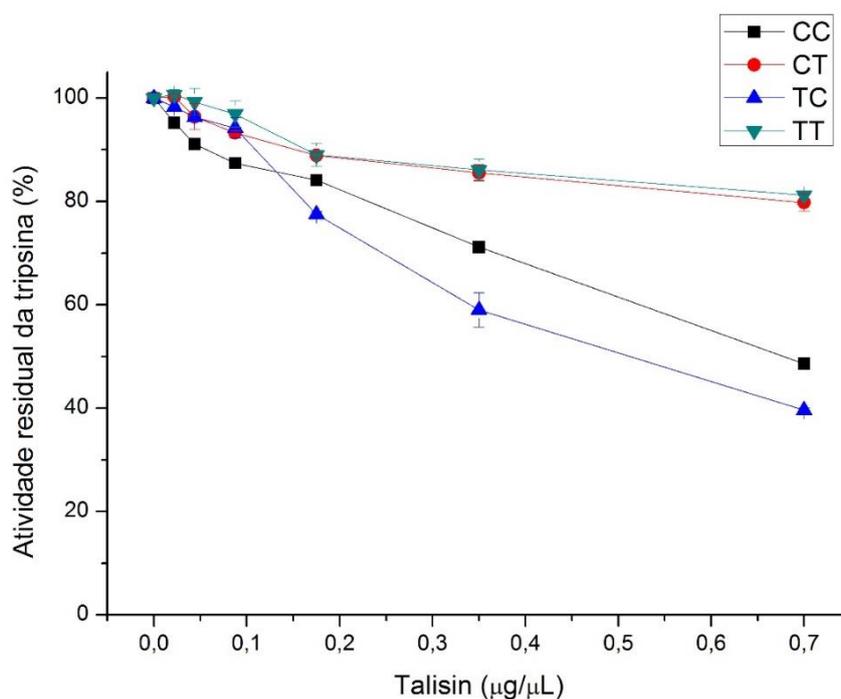


Figura 17. Inibição por Talisin da atividade de tripsinas presentes no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin 0,5% (m/m). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

Não houve diferença significativa em relação à atividade de enzimas do tipo quimotripsina entre os tratamentos (Figura 18). Por outro lado, ainda se observa um aumento da atividade das aminopeptidases em lagartas alimentadas por duas gerações consecutivas (Figura 19).

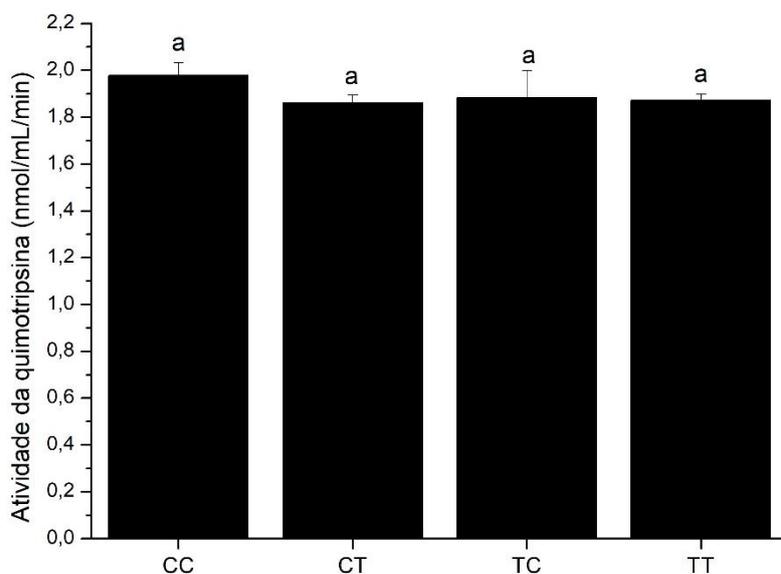


Figura 18. Atividade das enzimas do tipo quimotripsina no lúmen intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin 0.5% (m/m). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; Teste de Tukey). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

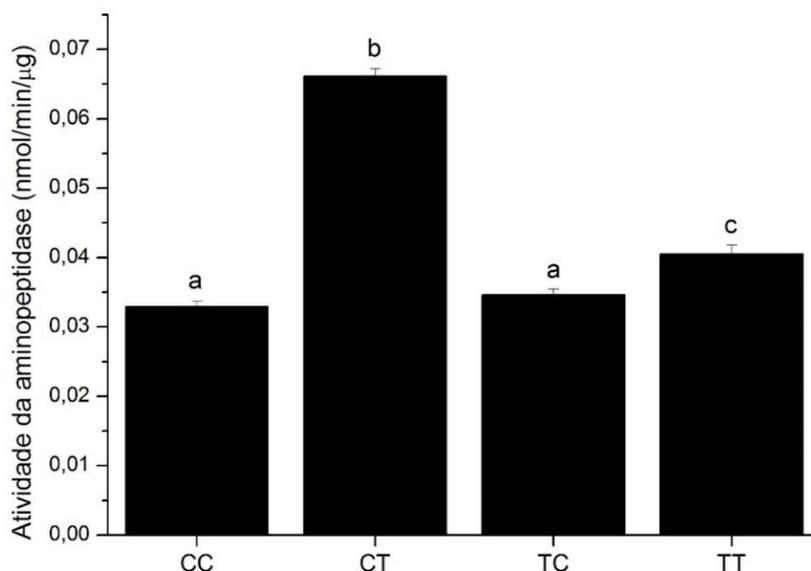


Figura 19. Atividade de enzimas aminopeptidase-N no extrato intestinal de larvas de 5º instar de 2ª geração de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta controle e dieta contendo Talisin. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA). CC: larvas que se alimentaram de dieta controle por duas gerações consecutivas; CT: larvas que se alimentaram em dieta controle na primeira geração e dieta contendo Talisin na segunda geração; TC: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin na primeira geração e dieta controle na segunda geração; TT: larvas que se alimentaram em dieta contendo Talisin por duas gerações consecutivas.

5.7 Resistência de Talisin à degradação pelas peptidases do intestino médio de *Spodoptera frugiperda*

Para avaliar se Talisin seria resistente a degradação pelas peptidases presentes no intestino médio de *S. frugiperda*, Talisin foi incubada com o extrato intestinal de larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo Talisin por um período de até 24 h. O gel de SDS-PAGE mostrou que a banda com peso molecular aparente de 22,1 kDa, correspondente ao peso de Talisin, permaneceu nas amostras mesmo depois de 24 h de incubação, indicando uma forte resistência de Talisin à proteólise pelas enzimas de *S. frugiperda* (Figura 20C e D).

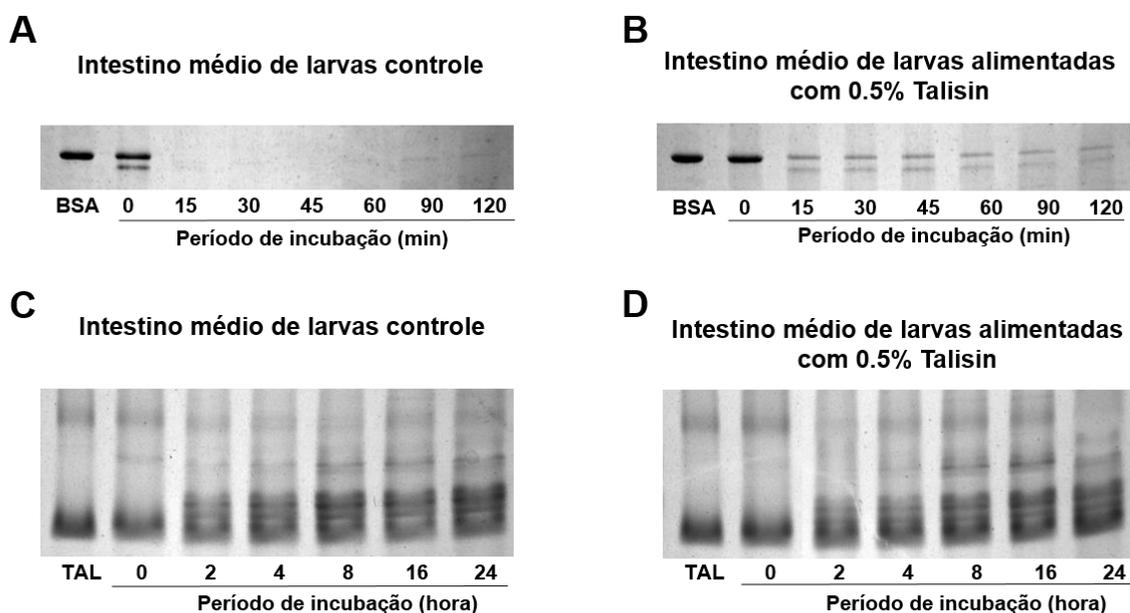


Figura 20. Resistência de Talisin à hidrólise pelas proteases intestinais de *Spodoptera frugiperda*. SDS-PAGE dos extratos intestinais misturados com Talisin na razão 1:5 (Talisin para extrato intestinal) e incubados a 30°C por diferentes períodos. Digestão de BSA (A) e Talisin (C) com o extrato intestinal e larvas alimentadas em dieta controle e digestão de BSA (B) e Talisin (D) com extrato intestinal de larvas alimentadas com Talisin. TAL: Talisin; BSA: albumina sérica bovina.

O gel de SDS-PAGE contendo o controle positivo (BSA) mostrou que as enzimas digestivas estavam ativas e degradaram o BSA nos primeiros 15 min, enquanto que as enzimas do intestino médio de larvas alimentadas com Talisin não foram capazes de degradar o BSA no mesmo intervalo de tempo, sugerindo que o processo digestivo em larvas alimentadas com Talisin é parcialmente inibido. Mais do que isso, as enzimas das larvas alimentadas com Talisin não foram capazes de

degradar totalmente o BSA mesmo quando incubadas pelo tempo máximo de 120 min (Figura 20B e D).

5.8 Análises de expressão gênica em larvas da primeira geração

O RNA total extraído do intestino médio das larvas de *S. frugiperda* mostrou-se íntegro após a extração, como é possível visualizar na Figura 21.

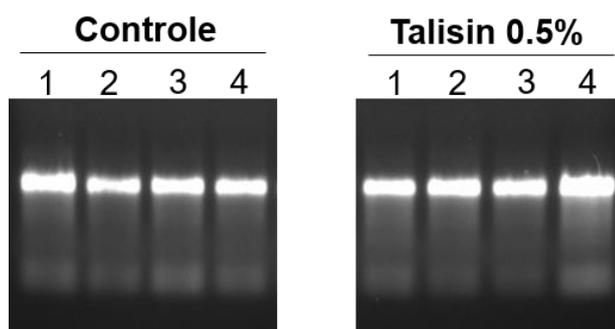


Figura 21. Gel de agarose 1% das amostras de RNA total extraído do intestino médio de larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda*. Os números representam cada uma das 4 réplicas biológicas utilizadas.

Após a extração do RNA, foram obtidos os cDNAs e as análises de PCR em tempo real mostraram os perfis transcricionais de 6 genes de tripsina, 7 genes de quimotripsina e 4 genes de aminopeptidase. Dos 6 genes de tripsina analisados, 3 deles apresentaram uma expressão diferencial em lagartas que se alimentaram de Talisin. O gene Try6 apresentou um aumento da expressão relativa de até 6 vezes. Já os genes Try8 e Try12 foram menos expressos (Figura 22).

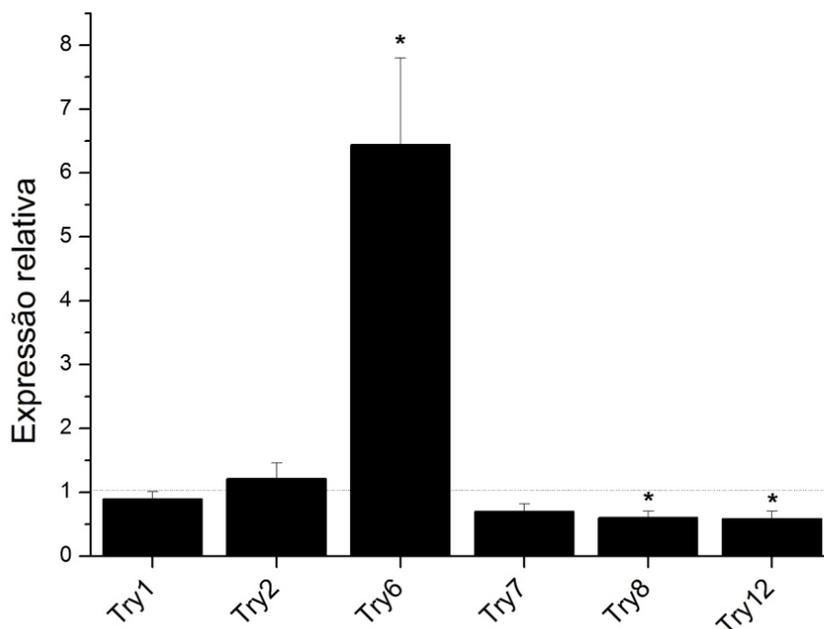


Figura 22. Expressão relativa dos genes de tripsinas de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Com relação aos genes de quimotripsina, apenas dois genes apresentaram expressão diferencial. Chy21 teve sua expressão aumentada em 4 vezes, e o gene Chy2 foi menos expresso (Figura 23). Os demais genes, tanto de tripsina quanto de quimotripsina, não apresentaram transcrição diferencial frente a ingestão de Talisin. Já os genes APN1 e APN6, referentes a aminopeptidases-N, foram menos expressos após ingestão de Talisin e os demais não apresentaram transcrição diferencial frente a ingestão de Talisin (Figura 24).

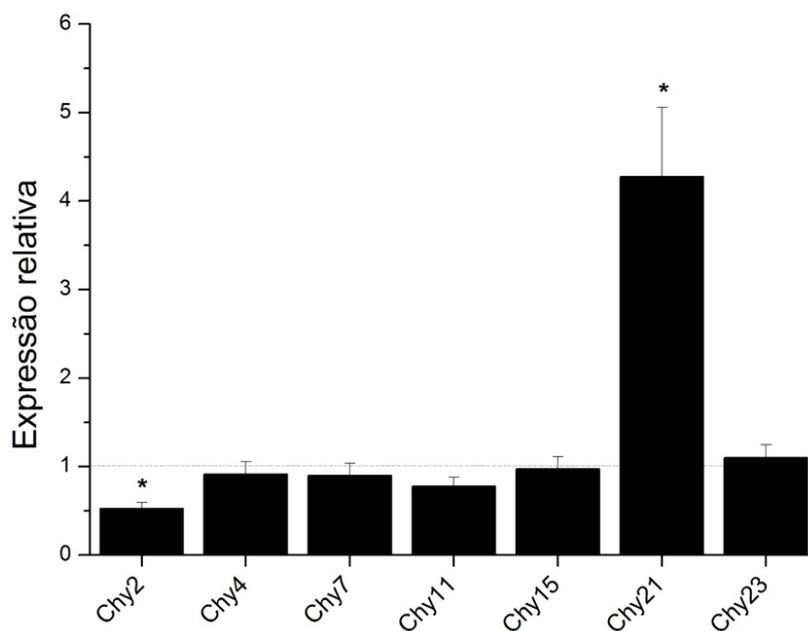


Figura 23. Expressão relativa dos genes de quimotripsinas de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

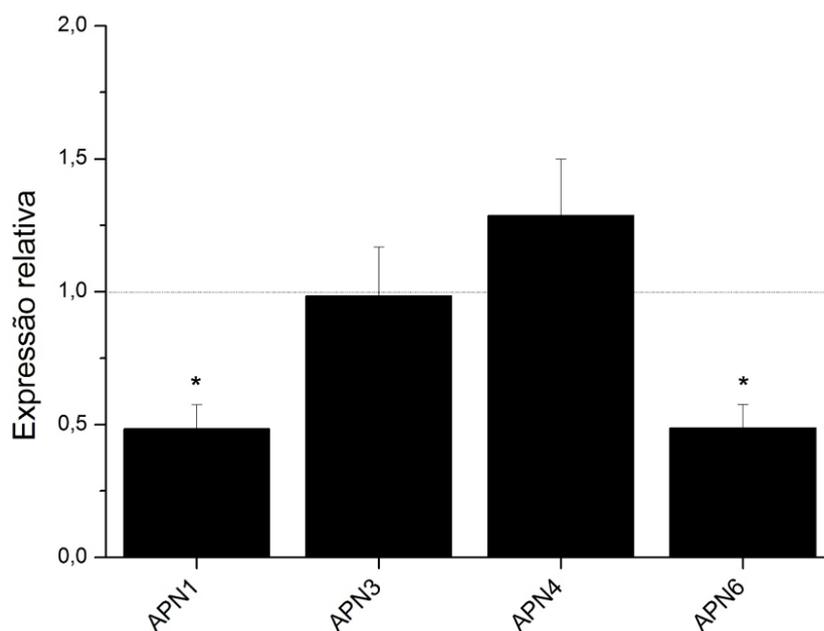


Figura 24. Expressão relativa dos genes de aminopeptidase de larvas de 5º instar de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com Talisin 0,5% (m/m). Genes acima da linha pontilhada foram considerados mais expressos e genes abaixo da linha pontilhada foram considerados menos expressos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

5.9 Microscopia

A camada epitelial do intestino médio de larvas controle apresentaram uma única camada de células colunares e a membrana peritrófica íntegra (Figura 25A e C). Já em larvas alimentadas com Talisin, é possível notar alterações nas células epiteliais, a membrana peritrófica menos espessa e com rupturas, além de ser possível notar uma redução do espaço ectoperitrófico (Figura 25B e D).

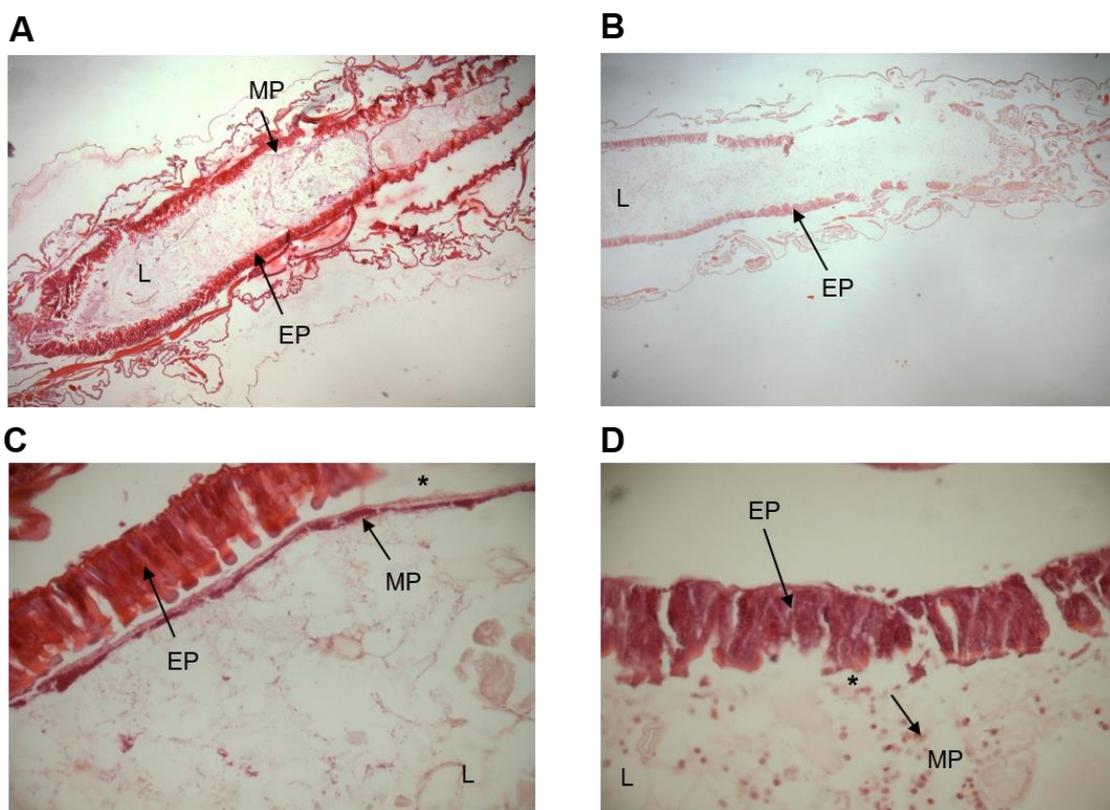


Figura 25. Fotomicrografia de larvas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda*. (A) Intestino médio de larvas controle, 10x. (B) Intestino médio de larvas alimentadas com Talisin 0,5% (m/m), 10x (C) Epitélio do intestino médio de larvas controle, 40X (D) Epitélio do intestino médio de larvas alimentadas com Talisin 0,5% (m/m), 40X. Lu, Lúmen; EP, Epitélio; MP, Membrana Peritrófica; (*) Diferença entre o espaço ectoperitrófico.

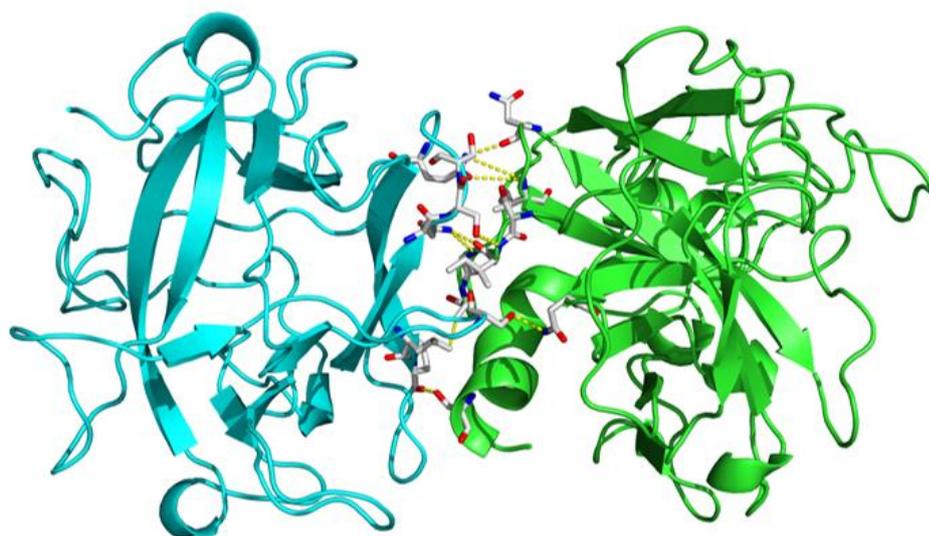
5.10 Modelagem molecular e *docking* molecular

A fim de verificar as interações e afinidade entre Talisin e as enzimas mais e menos expressas, foram feitas as modelagens destas proteínas, bem como análises de acoplamento molecular dos complexos Talisin-enzima. Talisin apresentou os melhores valores de cobertura (92%) e identidade (42%) aliados ao baixo *E-value* quando alinhada à sequência primária de um inibidor de peptidase serínica do tipo

Kunitz de *Delonix regia* (PDB id: 1R8N). Para as tripsinas 6 e 12 foi selecionada como estrutura modelo de coordenadas atômicas a estrutura cristalográfica de *Fusarium oxysporum* (PDB id: 1gdu) por apresentarem valores de identidade de 36 e 38%, respectivamente e valor de cobertura de 98% para ambas. Para as quimotripsinas 2 e 21, a estrutura modelo utilizada foi de uma colagenase das larvas da mosca *Hypoderma lineatum* (PDB id: 1hyl) pelos melhores valores de identidade de 41 e 37%, e valores de cobertura de 94 e 99%, respectivamente. As análises ProSa também confirmaram a qualidade do dobramento dos modelos teóricos obtidos, revelando z-scores equivalentes (-4,62, -5,82, -5,28, -5,42 e -5,82 para Talisin, Try6, Try12, Chy2 e Chy21, respectivamente) de proteínas estruturalmente resolvidas por cristalografia de raios-X e depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). Todos os modelos validados apresentaram acima de 83% dos resíduos em regiões mais favoráveis no mapa de Ramachandran. Todas essas características e parâmetros revelaram a confiabilidade dos modelos construídos, tornando-os adequados para os estudos de *docking* molecular.

Os melhores valores de afinidade para os complexos Talisin/Tripsina 6, Talisin/Tripsina 12, Talisin/Quimotripsina 2 e Talisin/Quimotripsina 21 foram -8,4 -8,8, -11,2, -10,0 kcal/mol, respectivamente. Com isso, podemos afirmar que Talisin possui maior afinidade pela Tripsina 12 (menos expressa), do que pela Tripsina 6 (mais expressa). Talisin também apresenta maior afinidade pela Quimotripsina 2 (menos expressa) do que pela quimotripsina 21 (mais expressa). As interações do complexo Talisin/Tripsina 6 foram preditas variando de 1,9 a 3,6 Å de distância, em 9 ligações de hidrogênio e 1 interação hidrofóbica. Já o complexo Talisin/Tripsina 12 apresentaram 12 ligações de hidrogênio e 2 interações hidrofóbicas, onde as distâncias entre os átomos envolvidos na interação variaram de 1,7 a 3,6 Å (Figura 26). O complexo Talisin/Quimotripsina 2 apresentou 13 ligações de hidrogênio e 3 interações hidrofóbicas, variando de 2,6 a 3,6 Å de distância. E o complexo Talisin/Quimotripsina21 apresentou o mesmo número de ligações de hidrogênio que o complexo Talisin/Quimotripsina 2 e apenas 1 interação hidrofóbica, variando de 2,9 a 3,6 Å (Figura 27).

A



B

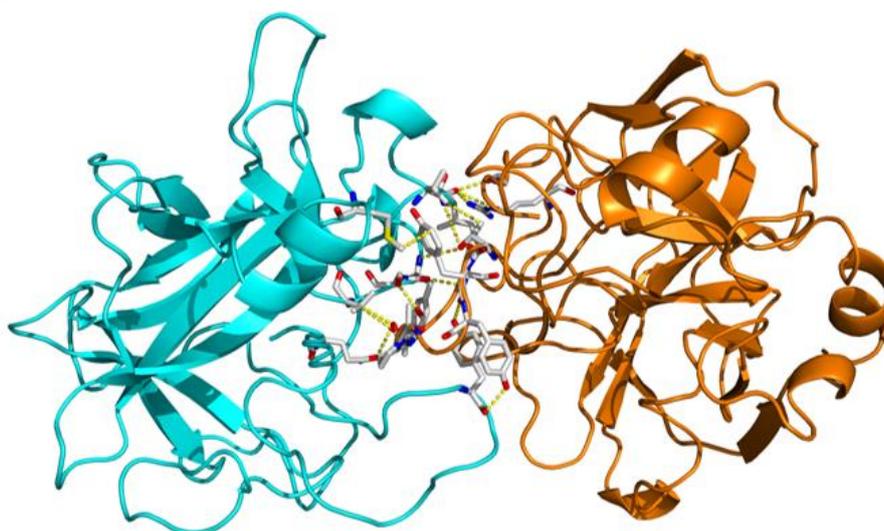


Figura 26. Modelo tridimensional teórico para os complexos Talisin/Tripsina 6 (A) e Talisin/Tripsina 12 (B).

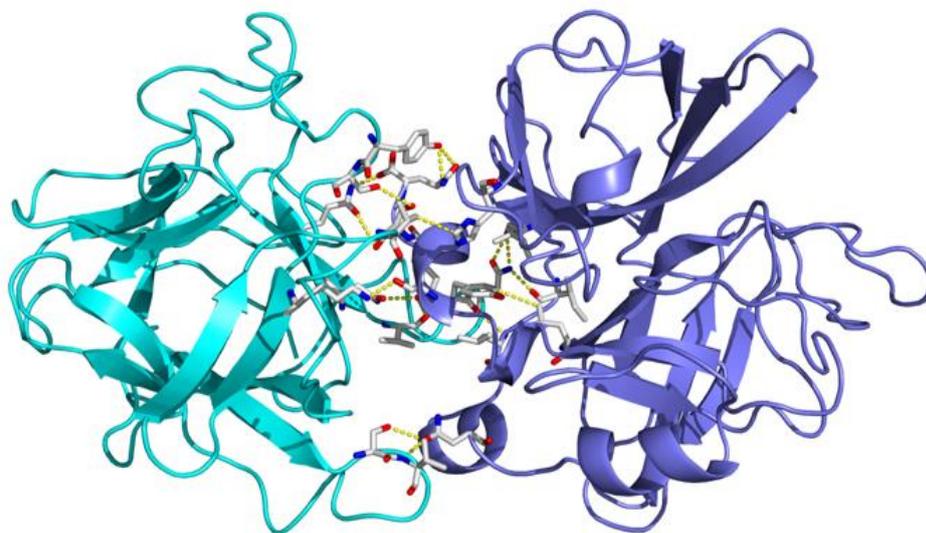
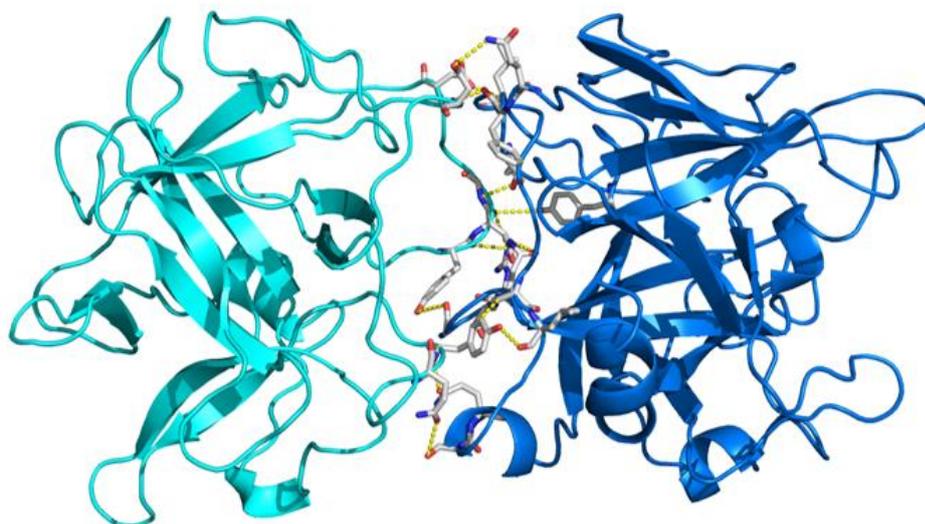
A**B**

Figura 27. Modelo tridimensional teórico para os complexos Talisin/Quimotripsina 2 (A) e Talisin/Quimotripsina 21 (B).

Tabela 5. Interação *in silico* dos complexos Talisin/Tripsina 6 (-8.4 kcal/mol) e Talisin/Tripsina 12 (-8.8 kcal/mol).

Tripsina 6 (XP_022821647.1*)		Distância (Å)	Talisin (ACJ51124.1*)		Interação
Resíduo	Posição		Resíduo	Posição	
Asn	37	1.9	Ser	106	HB
Ser	112	3.1	Ser	50	HB
Ile	113	1.9	Gln	48	HB
Ile	113	2.5	Ser	49	HB
Gly	115	3.1	Gln	48	HB
Ala	116	3.6	Leu	34	H
Asn	197	2.1	Gln	53	HB
Ile	199	3.5	Gln	53	HB
Ile	199	3.3	Gln	53	HB
Ser	231	1.9	Pro	35	HB
Tripsina 12 (XP_022821658*)		Distância (Å)	Talisin (ACJ51124.1*)		Interação
Resíduo	Posição		Resíduo	Posição	
Gly	4	2.9	Ile	117	HB
Thr	133	3.6	Val	116	H
Thr	133	3.6	Ile	117	HB
Tyr	134	3.2	Tyr	65	HB
Tyr	134	3.6	Met	126	H
Tyr	135	2.0	Tyr	65	HB
Ala	137	1.9	Tyr	65	HB
Pro	138	3.3	Val	96	HB
Thr	139	1.7	Ser	94	HB
Thr	139	2.3	Gln	82	HB
Thr	139	3.2	Val	96	HB
Ser	141	3.4	Tyr	93	HB
Arg	145	2.3	Ile	117	HB
Arg	145	2.7	Ile	117	HB

Å: Ångström; HB: Ligação de hidrogênio; H: Interação hidrofóbica; * Identificação NCBI.

Tabela 6. Interação *in silico* dos complexos Talisin/Quimotripsina2 (-11.2 kcal/mol) e Talisin/Quimotripsina21 (-10.0 kcal/mol).

Quimotripsina 2 (ALO61082.1*)		Distância (Å)	Talisin (ACJ51124.1*)		Interação
Resíduo	Posição		Resíduo	Posição	
Ile	35	2.6	Asn	66	HB
Ile	35	3.2	Asn	66	HB
His	81	3.5	Val	116	H
Ile	110	2.8	Asn	66	HB
Leu	112	3.2	Tyr	65	HB
Asn	119	3.1	Val	149	H
Asn	119	3.2	Ser	148	HB
Leu	201	3.6	Tyr	65	H
Ser	229	2.9	Lys	98	HB
Gln	232	2.9	Val	63	HB
Gln	232	3.2	Asn	80	HB
Ser	233	3.4	Ser	94	HB
Ser	233	3.5	Gln	82	HB
Gln	234	2.9	Gln	82	HB
Gln	234	2.9	Tyr	93	HB
Gln	234	3.0	Tyr	93	HB
Quimotripsina 21 (AIR09774.1*)		Distância (Å)	Talisin (ACJ51124.1*)		Interação
Resíduo	Posição		Resíduo	Posição	
Leu	9	3.0	Asp	70	HB
Glu	11	3.6	Gly	67	HB
Gln	102	3.3	Asp	192	HB
Phe	103	3.0	Asp	192	HB
Ala	111	3.3	Tyr	93	H
Leu	112	2.9	Tyr	93	HB
Ser	116	3.5	Gln	92	HB
Gln	117	2.9	Tyr	93	HB
Tyr	151	3.6	Asn	66	HB
Gln	197	3.1	Asn	66	HB
Gln	197	3.6	Asn	66	HB
Arg	198	3.4	Tyr	65	HB
Arg	198	3.5	Asn	66	HB
Gly	200	3.6	Tyr	65	HB

Å: Ångström; HB: Ligação de hidrogênio; H: Interação hidrofóbica; * Identificação NCBI.

6. DISCUSSÃO

Talisin é uma proteína de reserva que apresenta tanto propriedades de inibidor de peptidase quanto de lectinas, duas classes de proteínas sabidamente envolvidas no mecanismo de defesa vegetal, e que podem acarretar efeitos tóxicos quando ingeridas por insetos (War *et al.*, 2012; Dang e Van Damme, 2015; Macedo, Oliveira e Oliveira, 2015). Talisin pode ser considerada, portanto, uma proteína multifuncional, e tal versatilidade torna esta proteína bastante interessante para ser explorada quanto ao seu potencial inseticida.

Para avaliar *in vivo* o efeito da ingestão de Talisin em larvas de 5^o instar de *S. frugiperda*, suplementou-se a dieta artificial oferecida às lagartas com diferentes quantidades de Talisin. As larvas que se alimentaram de 0,1%, 0,5%, e 1% (m/m) de Talisin apresentaram uma redução do peso de 26, 48 e 73%, respectivamente, o que indica que Talisin ocasiona um efeito antinutricional, dificultando a absorção de nutrientes. Embora Talisin cause significativa redução da massa larval, não observamos alteração na taxa de sobrevivência das larvas, possivelmente por Talisin prejudicar a digestão de proteínas mas não a bloquear completamente, permitindo ao inseto o desenvolvimento de mecanismos capazes de fazê-lo sobreviver e se adaptar (Stevens *et al.*, 2013; Howe e Herde, 2015). Macedo *et al.* (2010) relataram redução de 50 e 76% no peso de larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas em dieta artificial contendo 1,5 e 2,0% (m/m) de Talisin, respectivamente, e também não observaram alteração na taxa de sobrevivência ou no tempo de desenvolvimento larval.

A fim de aprofundar nossa investigação a nível enzimático e molecular, definimos a concentração de 0,5% para dar continuidade aos demais ensaios biológicos. Essa concentração corresponde a níveis de lectinas presentes naturalmente em sementes de leguminosas e é similar à utilizada em outros estudos com outras lectinas e inibidores de peptidases, além de ser uma concentração possível de ser expressa em uma planta transgênica sem afetar sua fisiologia (Wakefield *et al.*, 2007; Van Damme, Lannoo e Peumans, 2008a; Li *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015).

Apesar de Talisin afetar o ganho de massa larval, as larvas alimentadas em dieta suplementada com Talisin não apresentaram diferenças significativas em relação aos índices nutricionais analisados. Contudo, as larvas consumiram uma

quantidade maior de alimento e produziram uma quantidade significativamente menor de fezes, acarretando diferenças em relação a digestibilidade aproximada (AD) (Tabela 4). AD é um índice que indica a porcentagem de alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto, ou mais especificamente pelas paredes do intestino do inseto. A maior retenção do alimento no intestino constitui uma tentativa de maximizar a AD, provavelmente para atender ao aumento da demanda por nutrientes e compensar o efeito antinutricional de Talisin (Rath, Prasad e Sinha, 2003).

A ingestão de Talisin também levou a alterações no período de desenvolvimento do inseto, acarretando um aumento de 1 dia no estágio larval e de 3,3 dias no tempo de desenvolvimento total (TDT) (Tabela 3). De forma similar, Li e Romeis (2009), relataram um aumento de 3,7 dias no TDT de *Chrysoperla carnea* (Neuroptera) alimentado com 1% de GNA, uma lectina amplamente estudada, purificada de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae). Esse atraso no desenvolvimento larval também já foi observado em *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera litura* quando alimentados com proteínas do tipo miraculinas, as quais Talisin apresenta similaridade de sequência de aminoácidos (50%) (Gahloth *et al.*, 2011). Os autores relataram um aumento de 7 dias no tempo de desenvolvimento total de larvas de *H. armigera* após a ingestão de 0,43% da proteína do tipo-miraculina de *Murraya koenigii* (MKMLP).

Vandenborre *et al.* (2010) relataram que o desenvolvimento larval de *S. littoralis* foi comprometido ao ingerir *Nicotiana tabacum* expressando a lectina NICTABA. Os autores observaram que este retardo ocorre principalmente nos estágios larvais iniciais e apontaram que tal desaceleração do crescimento larval é vantajosa, pois torna os insetos mais vulneráveis a predadores por um período mais longo, o que em termos ecológicos é um papel relevante de defesa das lectinas induzidas por herbivoria, uma vez que envolve a interação com estratégias de defesa indiretas das plantas. Isso é consistente com o papel de defesa das lectinas vegetais, inibidores de peptidases e proteínas de reserva envolvidas no mecanismo de defesa vegetal (Senthilkumar, Cheng e Yeh, 2010; Vandenborre, Smagghe e Van Damme, 2011).

Para que proteínas possam exercer de fato um efeito antinutricional quando ingeridas pelos insetos, elas precisam necessariamente ser resistentes à ação das peptidases presentes no trato digestivo (Chen *et al.*, 2005; Chen, 2008), pois do contrário a proteína pode ser clivada perdendo sua atividade inseticida (Girard *et al.*, 1998). A fim de verificar a resistência de Talisin à ação das peptidases de *S. frugiperda*, Talisin foi incubada por até 24 h com o extrato intestinal das larvas. Através

de uma análise em SDS-PAGE, foi possível verificar que as peptidases intestinais de *S. frugiperda* não são capazes de degradar Talisin, que se mostra resistente a proteólise por até 24 h, período este que as enzimas digestivas ainda permanecem ativas (Figura 20C). Curiosamente, podemos observar que o BSA, usado como um controle positivo, é completamente degradado pelas peptidases das larvas alimentadas em dieta controle em um curto período de tempo (15 min) (Figura 20A), enquanto as peptidases de larvas que se alimentaram com Talisin degradaram o BSA apenas parcialmente e de forma muito mais lenta (Figura 20B), o que corrobora o fato de Talisin interferir na atividade proteolítica deste inseto inibindo a atividade de enzimas digestivas. A digestibilidade de proteínas de reserva de plantas está relacionada a uma estabilidade estrutural excepcionalmente alta (Xia *et al.*, 2016). Nosso resultado corrobora a estudos anteriores que mostram a elevada resistência de Talisin à proteólise pelas enzimas digestivas de insetos, uma vez que essa proteína já se mostrou resistente à degradação pelas peptidases de *Anticarsia gemmatalis* (Macedo *et al.*, 2010), *Callosobruchus maculatus* (Macedo, De Castro e Freire, 2004) e *Diatraea saccharalis* (Freire *et al.*, 2012).

Alguns insetos da ordem Lepidoptera apresentam uma grande capacidade de alterar as peptidases digestivas em resposta a mudanças nutricionais qualitativas na dieta e/ou quando as peptidases existentes são ineficazes e/ou ineficientes para a digestão (Oliveira *et al.*, 2013; Stevens *et al.*, 2013; Kuwar *et al.*, 2015). Um desses mecanismos inclui aumento da atividade das peptidases intestinais para atingir a taxa ideal de digestão de proteínas (Brioschi *et al.*, 2007; Hivrale *et al.*, 2013). O gel de SDS-PAGE de Talisin com os extratos intestinais de larvas alimentadas com Talisin indica que as enzimas proteolíticas destes insetos foram incapazes de degradar Talisin (Figura 14).

Em estudo anterior, Freire *et al.* (2009), fizeram a caracterização bioquímica e a clonagem de Talisin, que apresentou uma alta similaridade com diversas proteínas de reserva, todas elas apresentando sequências de aminoácidos claramente relacionadas aos inibidores de peptidase da família Kunitz. Tendo em vista esta propriedade de inibidor de peptidase, e considerando que lepidópteros como *S. frugiperda* possuem as serinopeptidases tripsina e quimotripsina como principais enzimas responsáveis pela digestão de proteínas (Terra e Ferreira, 2012), buscou-se primeiramente investigar o efeito *in vivo* da ingestão de Talisin sobre estas duas enzimas.

A atividade das enzimas do tipo tripsina do lúmen intestinal de larvas que se alimentaram cronicamente de Talisin apresentou uma redução de 30% quando comparada às larvas controle. Redução semelhante (cerca de 33%) foi observada também nas fezes. Através da análise qualitativa por zimografia (Figura 14), podemos notar que pelo menos duas bandas do gel podem ser classificadas como tripsinas, uma vez que quando as amostras são incubadas com um inibidor sintético específico para tripsina (TLCK) as bandas 1 e 4 foram inibidas (Figura 14, colunas 3 e 4). Outro detalhe a ser observado é que, quando incubadas com Talisin, as bandas SfGP 1 e 3 foram inibidas, sugerindo a interação direta de Talisin com estas enzimas com efeito sobre a atividade das mesmas. Já a atividade das quimotripsinas não foi alterada, nem no lúmen e nem nas fezes (Figura 18).

Stevens *et al.* (2013) detectaram uma elevada perda de peptidases nas fezes de *Helicoverpa armigera* alimentadas com o inibidor de serinopeptidase NaPI e discutem que essa grande quantidade de enzimas perdidas limita a quantidade de enzimas que podem ser recicladas pelo inseto, reduzindo o *pool* de aminoácidos e nitrogênio para a síntese de proteínas, o que, por consequência, leva a uma redução do crescimento larval. É possível que Talisin ao se ligar às enzimas digestivas do intestino médio, formando um complexo, possa impedir a reabsorção dessas enzimas do espaço endoperitrófico para o espaço ectoperitrófico, fazendo com que haja uma perda crítica de aminoácidos essenciais para as fezes. Outrossim, por não ser degradada ao passar pelo trato digestório de *S. frugiperda*, Talisin, possivelmente, está sendo eliminada íntegra nas fezes (Figura 9B), o que corrobora com a redução da atividade das tripsinas nas fezes.

Neste estudo, avaliamos também os efeitos da ingestão de Talisin sobre as serinopeptidases de *S. frugiperda* por duas gerações consecutivas, no intuito de identificar e melhor compreender as possíveis respostas adaptativas que o inseto seleciona para sobrepujar os efeitos adversos da ingestão de Talisin. Em larvas de segunda geração, Talisin continuou a acarretar redução do peso, porém sem alterar a sobrevivência, assim como observado na primeira geração. Além disso, Talisin acarretou uma redução da atividade das tripsinas em 25%, semelhante à observada na geração anterior. Apesar desta redução, percebe-se que as enzimas voltam a apresentar sua atividade normal quando os insetos se alimentam em dieta controle, na ausência de Talisin (vide grupos CC e TC). Especulamos, então, que as larvas precisam estar em contato direto com Talisin para que esta proteína acarrete alteração

da atividade das tripsinas. A redução do peso em larvas do grupo alimentado com Talisin por duas gerações consecutivas quando comparada com seus respectivos grupos controle, mostra que Talisin promove uma redução do peso similar em diferentes gerações, sugerindo que nenhuma resposta adaptativa do inseto foi transferida de uma geração para a outra. Assim, as larvas da segunda geração são capazes de reestabelecer os níveis normais da atividade das enzimas, porém ainda sim são sensíveis aos efeitos antinutricionais promovidos por Talisin. Essa pode ser uma vantagem de Talisin se comparada aos inibidores de peptidases típicos, visto que a ingestão de IPs acarreta respostas adaptativas no inseto ainda na primeira geração (Kumar *et al.*, 2015).

Além disso, constatamos que as tripsinas de larvas alimentadas em dieta contendo Talisin apresentaram uma menor inibição por Talisin, como é possível observar na Figura 10. Este resultado sugere que as enzimas que a larva pode estar utilizando para fazer a degradação de proteínas sejam enzimas menos sensíveis a inibição por Talisin. O mesmo é observado no ensaio de inibição com as larvas de segunda geração, que quando em contato com Talisin, apresentam menor sensibilidade à inibição (Figura 17). Essa aparente diferença na inibição, pode decorrer da expressão diferencial de enzimas, uma vez que um dos mecanismos mais comuns, em espécies de lepidópteros como *S. frugiperda*, em resposta à ingestão de proteínas tóxicas como os inibidores de peptidases, é a superprodução de peptidases sensíveis ou a expressão de novas peptidases insensíveis aos inibidores de peptidases (Brioschi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). Outrossim, não seria possível verificar a produção de isoformas via zimografia, pois grande parte das isoformas apresentam modificações de poucos aminoácidos, e isso não poderia ser visualizado em gel. Dessa forma, buscamos então verificar diferenças quanto a expressão gênica de enzimas através de qPCR.

Através das análises de expressão dos genes de tripsinas e quimotripsinas, observamos que a ingestão de Talisin causa uma expressão diferencial de apenas três genes de tripsina e dois genes de quimotripsina. No caso das tripsinas, após a ingestão de Talisin, as larvas apresentaram um aumento de 6 vezes na expressão do gene Try6, enquanto outros dois genes foram menos expressos (Figura 22). Com relação aos genes de quimotripsina, o gene Chy21 teve sua expressão aumentada em 4 vezes, e o gene Chy2 foi menos expresso que larvas alimentadas em dieta controle (Figura 23). Há evidências para sugerir que alguns insetos são capazes de

modular o conjunto de serinopeptidases de acordo com o tipo de inibidor ingerido através da regulação diferencial dos genes de tripsinas e quimotripsinas (Bown, Wilkinson e Gatehouse, 2004; Brioschi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). O perfil de expressão de tripsinas e quimotripsinas, após a ingestão de Talisin, difere do perfil de expressão observado em outros estudos com *S. frugiperda* alimentadas em dieta contendo inibidores de peptidases da soja (Souza *et al.*, 2016). Souza *et al.* (2016) relataram que a ingestão de inibidores de peptidases da soja por *S. frugiperda* resultou na ativação de uma série de genes das serinopeptidases, podendo-se distinguir um grupo de genes responsivos e outro de genes não responsivos ao inibidor. Como citado anteriormente, neste trabalho, observamos, após ingestão crônica de Talisin, apenas um gene de tripsina superexpresso e dois genes menos expressos; e um gene superexpresso e outro menos expresso de quimotripsina.

Com base na observação dos resultados de expressão gênica, de aumento e redução da expressão de algumas enzimas, tentamos estabelecer alguma relação entre a afinidade de Talisin pelas enzimas mais ou menos expressas, com base em suas interações. Uma vez que a purificação de todas as isoformas de enzimas não seria possível, realizamos estudos *in silico* de *docking* molecular, técnica adequada para esse tipo de estudo. Freire *et al.* (2012) mostrou que o mecanismo de inibição de Talisin é do tipo não-competitivo, devido a substituição do resíduo Arg₆₄ por Glu₆₄ envolvido na interação com o sítio ativo da enzima. No entanto, Talisin é capaz de bloquear o acesso ao substrato devido a cinco interações com a região mais favorável da enzima, formando um complexo. Esse contato impede o acesso do substrato à enzima, embora nenhuma reação direta com o sítio catalítico seja observada. Este mecanismo difere ao dos inibidores de peptidase típicos do tipo Kunitz, que interagem com as proteases através do *loop* reativo do inibidor (Bendre, Ramasamy e Suresh, 2018).

Nossos resultados mostram que Talisin faz um número maior de interações com uma das tripsinas menos expressas (Try12) do que com a tripsina mais expressa (Try 6) (Tabela 5). O mesmo padrão é observado para as quimotripsinas mais e menos expressas (Tabela 6). Especulamos que em virtude do maior número de interações com Try12, essa enzima seja mais sensível a Talisin e, portanto, o inseto possua algum mecanismo, ainda desconhecido, para suprimir sua expressão. E, pelo mesmo raciocínio, sugere-se que Talisin por fazer menos interações com Try6, não interfira na função fisiológica desta enzima, e assim esta seja uma das enzimas superexpressas

em resposta a ingestão de Talisin. No entanto, não temos indícios suficientes para afirmar que o grau de interação de Talisin esteja diretamente relacionado com o nível de expressão dos genes das enzimas digestivas e nem como essa interação entre Talisin e enzimas seja percebida no ambiente digestivo. Para avaliar essa hipótese, seria necessário analisar a interação de Talisin com todo o *pool* gênico de tripsinas e quimotripsinas, uma vez que estas enzimas pertencem a famílias multigênicas e o genoma completo deste inseto ainda não é conhecido.

Os insetos possuem variados grupos de peptidases compondo seu sistema digestório. Essas peptidases têm altas taxas de auto-ativação o que permite ao inseto alta diversidade de transcrição, que representa uma vantagem evolutiva adquirida face a necessidade de digestão rápida, exploração de diversos tipos de alimentos e conseqüentemente a necessidade de fugir de efeitos negativos e antinutricionais de proteínas tóxicas vegetais. A família Noctuideae tem alta diversidade de enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas, que pode ter sido resultante destes mecanismos de adaptação (Dias *et al.*, 2015). Apesar de ser evidente que os insetos são capazes de expressar uma ampla variedade de peptidases em resposta a exposição aos inibidores de peptidases, o mecanismo desta indução ainda não é claramente conhecido.

A relação evolutiva entre proteínas biologicamente inativas ou proteínas de reserva pouco ativas e as enzimas normalmente ativas ou proteínas bioativas sugere fortemente que algumas proteínas de reserva podem ser derivadas de genes que originalmente codificavam proteínas com uma ação enzimática bem definida ou outra atividade biológica (Van Damme *et al.*, 2000). Em consequência, algumas proteínas ligantes a carboidratos funcionam como moléculas multifuncionais, podendo apresentar homologia de sequência com inibidores do tipo Kunitz, sem, no entanto, apresentar atividade inibitória a tripsina, ou serem estas menos ativas. Por outro lado, exibem atividades características de lectinas (Troncoso *et al.*, 2003; Macedo, De Castro e Freire, 2004; Shah *et al.*, 2016).

Uma vez que Talisin é uma proteína que se liga fortemente à quitina (Macedo *et al.*, 2002), e buscando explorar as propriedades de interação específica a carboidratos que Talisin apresenta, realizamos análises morfológicas do intestino médio das larvas alimentadas com Talisin e analisamos outras duas classes de enzimas envolvidas no processo digestivo de *S. frugiperda*, a α -amilase e

aminopeptidase, enzima envolvida na digestão de carboidratos e digestão final de peptídeos, respectivamente (Terra e Ferreira, 2012).

Não observamos nenhuma alteração na atividade da α -amilase, porém constatamos que a atividade da aminopeptidase de extratos do lúmen intestinal foi substancialmente maior em larvas alimentadas com Talisin quando comparada ao controle e mesmo ao epitélio. A atividade das enzimas isoladas do epitélio intestinal das larvas oriundas do grupo alimentado com Talisin, também foi maior. Aminopeptidases são enzimas microvilares tipicamente ancoradas ao epitélio intestinal (Silva *et al.*, 2013). Possivelmente o aumento da atividade das aminopeptidases no lúmen de larvas alimentadas com Talisin ocorra em decorrência de danos epiteliais e/ou ruptura da membrana peritrófica (Figura 11). Além disso, não observamos o aumento da expressão de nenhum gene de aminopeptidase (Figura 24). No entanto, é necessário enfatizar que não excluimos a possibilidade da existência de outros genes de aminopeptidase de *S. frugiperda* além dos quais desenhamos *primers*. Esta possibilidade só poderia ser confirmada após o sequenciamento completo do genoma da espécie.

Em lepidópteros, o intestino médio é circundado por uma estrutura semipermeável composta por microfibrilas de quitina associada a proteoglicanos e glicoproteínas, denominada membrana peritrófica (Hegedus *et al.*, 2009; Terra e Ferreira, 2012). A membrana peritrófica age como uma barreira física e química que compartimentaliza o processo digestivo nos insetos, favorecendo uma alta eficiência digestiva bem como a reciclagem de enzimas digestivas (Bolognesi, Terra e Ferreira, 2008). Após a digestão inicial do alimento no espaço endoperitrófico, as moléculas se tornam suficientemente pequenas e atravessam os poros da membrana peritrófica em direção ao espaço ectoperitrófico (acompanhadas das hidrolases de polímeros) e, posteriormente, estas moléculas fluem para o ceco e o intestino anterior, onde ocorre a digestão intermediária e final pelas enzimas ancoradas sobre a superfície do epitélio intestinal.

Uma enzima grande como aminopeptidase (massa molecular entre 90 a 130 kDa) possui um diâmetro maior que os poros da membrana peritrófica de *S. frugiperda* (Bolognesi *et al.*, 2001). Logo, em situações fisiológicas normais ela deve ser encontrada no espaço ectoperitrófico (Terra e Ferreira, 2012). A presença de aminopeptidase no espaço endoperitrófico sugere que a membrana peritrófica teve

sua integridade comprometida. Logo, buscamos investigar através de estudos histológicos a integridade da membrana peritrófica em larvas alimentadas com Talisin. As análises morfológicas mostraram alterações tanto no epitélio quanto comprometimento da integridade da membrana peritrófica nas larvas alimentadas com Talisin (Figura 25). Moléculas com tendência a se ligar a quitina podem competir pelos sítios de ligação das proteínas endógenas ligantes de quitina, dissociando a estrutura normal dos complexos proteínas-quitina na membrana e, por fim, modificando a fisiologia do trato digestório larval. A ruptura da membrana peritrófica afeta negativamente o desenvolvimento do inseto por diminuir a eficiência digestiva, além de aumentar os custos metabólicos associados a síntese de novas enzimas pela perturbação do mecanismo de reciclagem enzimática (Caccia *et al.*, 2012; Mino Sajjadian e Hosseinaveh, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

Explorar proteínas que apresentem multifuncionalidades, como é o caso de Talisin, pode ser um caminho vantajoso na busca por moléculas que possam ser usadas em estratégias mais eficientes para o controle de pragas. A piramidação de múltiplos genes de defesa em uma planta é uma estratégia promissora para aumentar sua proteção a fim de evitar ou retardar o desenvolvimento de resistência de insetos praga (Senthilkumar, Cheng e Yeh, 2010; Javaid *et al.*, 2018). O uso de genes entomotóxicos (Babu *et al.*, 2003; Kos *et al.*, 2009) é apenas uma das opções existentes para o controle de pragas. Quanto mais compreendermos os efeitos acarretadas por proteínas de defesa vegetal, bem como as respostas adaptativas utilizadas pelos insetos, mais avançaremos na direção certa para escolhas eficientes e ecologicamente adequadas, e também possíveis de serem integradas com outras técnicas de controle de pragas.

7. CONCLUSÕES

- Talisin, ao ser ingerida, causa redução do peso em larvas de *Spodoptera frugiperda* por duas gerações consecutivas, sem alterar sua sobrevivência;
- Talisin acarreta um efeito antinutricional, que resulta em uma alteração da digestibilidade aproximada de insetos alimentados;
- Larvas alimentadas com Talisin apresentam redução da atividade de tripsinas do lúmen intestinal e nas fezes, e não apresentam alterações da atividade das quimotripsinas e α -amilases;
- Talisin é resistente à degradação pelas enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda* e apresenta efeitos antinutricionais prolongando o tempo de desenvolvimento do inseto;
- Larvas alimentadas com Talisin apresentam alterações na histologia intestinal, ruptura da membrana peritrófica e aumento da atividade de aminopeptidases no lúmen;
- A ingestão de Talisin acarreta expressão diferencial de genes de tripsinas, quimotripsinas e aminopeptidases;
- Genes como Try6 e Chy21 são os genes mais responsivos à ingestão de Talisin;
- O efeito entomotóxico de Talisin ocorre em virtude de sua capacidade como inibidor de tripsina, de ligação à quitina e elevada resistência a degradação pelas enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1-2, p. 19-25, 2015.

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

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANTAO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, n. 7, p. 637-650, 2005.

ANVISA. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2013.

BABU, M. R. et al. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. *Crop Protection*, v. 22, n. 9, p. 1071-1086, 2003.

BARCELOS, P. H. S.; ANGELINI, M. R. Controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) em diferentes tecnologias Bts (*Bacillus thuringiensis*) na cultura do milho. *Journal of Neotropical Agriculture*, v. 5, n. 1, p. 35-40, 2018.

BASSET, Y. et al. Arthropod Diversity in a Tropical Forest. *Science*, v. 338, n. 6113, p. 1481, 2012.

BENDRE, A. D.; RAMASAMY, S.; SURESH, C. G. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 113, p. 933-943, 2018.

BERGMANN, M. A Classification of Proteolytic Enzymes. In: (Ed.). *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 2006.

BEZERRA, C. S. et al. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 6, p. 792-803, 2016.

BOLOGNESI, R. et al. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 47, n. 2, p. 62-75, 2001.

BOLOGNESI, R.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: Theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 10-11, p. 1413-1422, 2008.

BONGAARTS, J. *Population and Development Review*, v. 36, n. 4, p. 854-855, 2010.

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.

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, 1976.

BRIOSCHI, D. et al. 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.

BROUTIN, I. et al. 1.8 Å Structure of Hypoderma lineatum Collagenase: a Member of the Serine Proteinase Family. *Acta Crystallographica Section D*, v. 52, n. 2, p. 380-392, 1996.

BURKLE, L. A.; MARLIN, J. C.; KNIGHT, T. M. Plant-Pollinator Interactions over 120 Years: Loss of Species, Co-Occurrence, and Function. *Science*, v. 339, n. 6127, p. 1611, 2013.

BUSATO, G. R. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. *Ciência Rural*, v. 36, p. 15-20, 2006.

CACCIA, S. et al. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid* (Amaryllis) in *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 9, p. 1177-1183, 2012.

CARNEIRO, F. F. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz, 2015.

CEPEA. Boletim CEPEA do Agronegócio Brasileiro. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Piracicaba. 2018

CHEN, H. et al. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 52, p. 19237, 2005.

CHEN, M.-S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, v. 15, n. 2, p. 101-114, 2008.

CHRISTELLER, J. T. et al. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.

CHRISTOU, P. et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 6, p. 302-308, 2006.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo primeiro levantamento. Brasília, p.148. 2018

CRUZ, I. et al. Risco Potencial das Pragas de Milho e de Sorgo no Brasil. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas MG, p.40. 2013

DANG, L. Y.; VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, v. 117, p. 51-64, 2015.

DAWKAR, V. V. et al. Molecular Insights into Resistance Mechanisms of Lepidopteran Insect Pests against Toxicants. *Journal of Proteome Research*, v. 12, n. 11, p. 4727-4737, 2013.

DE SOUZA CÂNDIDO, E. et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 10, p. 3290-3305, 2011.

DIAS, R. O. et al. Digestive peptidase evolution in holometabolous insects led to a divergent group of enzymes in Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 58, p. 1-11, 2015.

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, 1961.

ESKER, P. D.; SAVARY, S.; MCROBERTS, N. Crop loss analysis and global food supply: Focusing now on required harvests. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v. 7, p. 1-14, 2012.

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

FAOSTAT, F. Food and Agricultural commodities production. <http://www.fao.org/faostat/>: FAO 2018.

FIGUEIREDO, M. D. L. C.; PENTEADO-DIAS, A. M.; CRUZ, I. Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos, na cultura do milho. *Comunicado Técnico 130*, 2005.

FREIRE, M. et al. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 161, n. 1, p. 86-92, 2012.

FREIRE, M. D. G. M. et al. Isolation and Characterization of Isolectins from *Talisia esculenta* Seeds. *Journal of Protein Chemistry*, v. 20, n. 6, p. 495-500, 2001.

FREIRE, M. D. G. M. et al. Characterization of a Saccharide-Binding Protein from *Talisia esculenta* Seeds with Trypsin Inhibitory Activity. *Protein & Peptide Letters*, v. 16, n. 12, p. 1557-1564, 2009.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant Defense against Insect Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013.

GAHLOTH, D. et al. Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculin-like protein against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Arch Insect Biochem Physiol*, v. 78, n. 3, p. 132-44, 2011.

GATEHOUSE, L. N. et al. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 27, n. 11, p. 929-944, 1998.

GHOSH, S. et al. RNAi Screening in *Spodoptera frugiperda*. In: AZORSA, D. O. e ARORA, S. (Ed.). *High-Throughput RNAi Screening: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 2016. p.199-212. ISBN 978-1-4939-6337-9.

GIRARD, C. et al. 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.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, v. 327, n. 5967, p. 812, 2010.

GROSSE-HOLZ, F. M.; HOORN, R. A. L. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. *New Phytologist*, v. 210, n. 3, p. 794-807, 2016/05/01 2016.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593-608, 2010.

HAPEMAN, C. J. et al. Current United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service research on understanding agrochemical fate and transport to prevent and mitigate adverse environmental impacts. *Pest Management Science*, v. 59, n. 6-7, p. 681-690, 2003.

HEGEDUS, D. et al. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. 1, p. 285-302, 2009.

HICKS, H. L. et al. The factors driving evolved herbicide resistance at a national scale. *Nature Ecology & Evolution*, v. 2, n. 3, p. 529-536, 2018/03/01 2018.

HIVRALE, V. K. et al. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors from *Albizia lebbeck* seeds in the *Helicoverpa armigera* larvae. *Arthropod-Plant Interactions*, v. 7, n. 3, p. 259-266, 2013.

HOWE, G. A.; HERDE, M. Interaction of plant defense compounds with the insect gut: new insights from genomic and molecular analyses. *Current Opinion in Insect Science*, v. 9, p. 62-68, 2015.

HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. *PLOS ONE*, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

HUESING, J. E. et al. α -Amylase Inhibitor, Not Phytohemagglutinin, Explains Resistance of Common Bean Seeds to Cowpea Weevil. *Plant Physiology*, v. 96, n. 3, p. 993-996, 1991.

JAKKA, S. R. K. et al. Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1fa-expressing corn associated with reduced Cry1fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 4, p. 1023-1034, 2016.

JANZEN, D. H.; JUSTER, H. B.; LIENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, v. 192, n. 4241, p. 795, 1976.

JAVAID, S. et al. Computational and biological characterization of fusion proteins of two insecticidal proteins for control of insect pests. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 4837, 2018.

JOHNSON, M. T. J. Evolutionary ecology of plant defences against herbivores. *Functional Ecology*, v. 25, n. 2, p. 305-311, 2011.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server issue, p. W429-W432, 2007.

KIM, Y. H. et al. RNA interference: Applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 120, p. 109-117, 2015.

KLEIN, A.-M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KOS, M. et al. Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 11, p. 621-627, 2009.

KRAUCHENCO, S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, v. 57, n. Pt 9, p. 1316-8, 2001.

KUWAR, S. S. et al. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 59, p. 18-29, 2015.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 397, 2014.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LI, H. M. et al. Transcriptional signatures in response to wheat germ agglutinin and starvation in *Drosophila melanogaster* larval midgut. *Insect Molecular Biology*, v. 18, n. 1, p. 21-31, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. São Paulo: 2002. 368 ISBN 85-86714-14-3.

MAAG, D. et al. Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. *BioEssays*, v. 37, n. 2, p. 167-174, 2014.

MACEDO, M.; DE CASTRO, M.; FREIRE, M. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, v. 56, n. 2, p. 84-96, 2004.

MACEDO, M. et al. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2010.

MACEDO, M.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules*, v. 20, n. 2, 2015.

MACEDO, M. L. R. et al. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1571, n. 2, p. 83-88, 2002.

MAFFEI, M. E.; MITHOFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, v. 68, n. 22, p. 2946-2959, 2007.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 14, n. 2, p. 71-81, 2002.

MINOO SAJJADIAN, S.; HOSSEININAVEH, V. Destruction of peritrophic membrane and its effect on biological characteristics and activity of digestive enzymes in larvae of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*, v. 112, n. 2, p. 245-250, 2015.

MITHOFER, A.; BOLAND, W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, p. 431-450, 2012.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology*, v. 146, n. 3, p. 825-831, 2008.

MOONEY, KAILEN A. Insect-Plant Biology. Second Edition. By Louis M Schoonhoven, Joop J A van Loon, and Marcel Dicke. The Quarterly Review of Biology, v. 82, n. 1, p. 54-54, 2007.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 41, n. 3, p. 227-246, 2005.

NAGOSHI, R. N. et al. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. Annals of the Entomological Society of America, v. 100, n. 3, p. 394-402, 2007.

NATIONS, U. The United Nations on World Population in 2300. Population and Development Review, v. 30, n. 1, p. 181-187, 2004.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La β -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. Helvetica Chimica Acta, v. 31, p. 286-290, 1948.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2005.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. 2004. 275-285.

OLIVA, M. L. V. et al. Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: A mini review. Current Protein and Peptide Science, v. 12, p. 348-357, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. Process Biochemistry, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. 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.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. Crop Protection, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, C. T. et al. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). Journal of Insect Physiology, v. 81, p. 81-89, 2015.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Bioecologia e nutrição de insetos : base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 1164 ISBN 978-85-7383-452-9.

PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1996. 137.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. Lectins as plant defense proteins. Plant physiology, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

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

PROKOPY, R.; KOGAN, M. Chapter 139 - Integrated Pest Management. In: RESH, V. H. e CARDÉ, R. T. (Ed.). Encyclopedia of Insects (Second Edition). San Diego: Academic Press, 2009. p.523-528. ISBN 978-0-12-374144-8.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RATH, S. S.; PRASAD, B. C.; SINHA, B. R. R. P. Food utilization efficiency in fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) infected with *Nosema* sp. and its effect on reproductive potential and silk production. Journal of Invertebrate Pathology, v. 83, n. 1, p. 1-9, 2003.

RAWLINGS, N. D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Research, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. Ecological Applications, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RIET-CORREA, F. et al. Poisoning by *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk in sheep and cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 26, n. 3, p. 412-417, 2014.

ROSA, A. P. A. D. et al. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em linhagens de milho. Arquivos do Instituto Biológico, v. 79, p. 39-45, 2012.

RYPNIEWSKI, W. R. et al. *Fusarium oxysporum* trypsin at atomic resolution at 100 and 283 K: a study of ligand binding. Acta Crystallographica Section D, v. 57, n. 1, p. 8-19, 2001.

SARMENTO, R. D. A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil Bioscience Journal, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SCOTT, J. G. et al. Towards the elements of successful insect RNAi. Journal of Insect Physiology, v. 59, n. 12, p. 1212-1221, 2013.

SCRIBER, J. M.; SLANSKY JR, F. The Nutritional Ecology of Immature Insects. Annual Review of Entomology, v. 26, n. 1, p. 183-211, 1981.

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 Biotechnol J, v. 8, n. 1, p. 65-75, 2010.

SHAH, K. R. et al. Characterization of a Kunitz-type serine protease inhibitor from *Solanum tuberosum* having lectin activity. International Journal of Biological Macromolecules, v. 83, p. 259-269, 2016.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. International Journal of Biological Macromolecules, v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The Plant Cell, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.

SHIFERAW, B. et al. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. Food Security, v. 3, n. 3, p. 307, 2011.

SHU, B. et al. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR analysis in larvae of *Spodoptera litura* exposed to azadirachtin stress conditions. Frontiers in Physiology, v. 9, p. 372, 2018.

SILVA, W. et al. Midgut proteins released by microapocrine secretion in *Spodoptera frugiperda*. Journal of Insect Physiology, v. 59, n. 1, p. 70-80, 2013.

SOUZA, T. P. et al. Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 196–197, p. 67-73, 2016.

STEVENS, J. A. et al. The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43, n. 2, p. 197-208, 2013.

STILLMARK, H. Uber Ricin, eines giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und anderson Euphorbiacen. 1888. University of Dorpat, Estonia

TEGEDER, M.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, v. 217, n. 1, p. 35-53, 2017.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.

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.

_____. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: GILBERT, L. I. (Ed.). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press, 2012. p.365-418. ISBN 978-0-12-384747-8.

TRONCOSO, M. F. et al. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 411, n. 1, p. 93-104, 2003.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2009.

VAN DAMME, E. J. et al. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate journal*, v. 20, n. 7-8, p. 449-460, 2003.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Novel concepts about the role of lectins in the plant cell. In: WU, A. M., *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*, 2011, Boston, MA. Springer US. p.271-294.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Major protein of resting rhizomes of *Calystegia sepium* (hedge bindweed) closely resembles plant RNAses but has no enzymatic activity. *Plant Physiology*, v. 122, n. 2, p. 433-446, February 1, 2000 2000.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Chapter 3 Plant Lectins. In: JEAN-CLAUDE, K. e MICHEL, D. (Ed.). *Advances in Botanical Research*: Academic Press, v. Volume 48, 2008a. p.107-209. ISBN 0065-2296.

_____. Plant Lectins. In: KADER, J.-C. e DELSENY, M. (Ed.). *Advances in Botanical Research*: Academic Press, v.48, 2008b. p.107-209. ISBN 0065-2296.

VANDENBORRE, G. et al. *Nicotiana tabacum* agglutinin is active against Lepidopteran pest insects. *Journal of Experimental Botany*, v. 61, n. 4, p. 1003-1014, March 1, 2010.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VELASQUES, J. et al. The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 14-25, 2017.

WAKEFIELD, M. E. et al. Effects of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in tomato leaves on larvae of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and the effect of GNA on the development of the endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin of Entomological Research*, v. 96, n. 1, p. 43-52, 2007.

WALDBAUER, G. P. The consumption and utilization of food by insects. In: J.W.L. BEAMENT, J. E. T. e WIGGLESWORTH, V. B. (Ed.). *Advances in Insect Physiology*: Academic Press, v.5, 1968. p.229-288. ISBN 0065-2806.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 54, n. 1, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-W410, 2007.

WU, J.; BALDWIN, I. T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics*, v. 44, n. 1, p. 1-24, 2010.

XIA, K. et al. Kinetic stability of proteins in beans and peas: Implications for protein digestibility, seed germination, and plant adaptation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 40, p. 7649-7657, 2016.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of Entomology*, v. 60, n. 1, p. 233-252, 2015/01/07 2015.

ZHU, F. et al. The plant ribosome-inactivating proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 146, 2018.

ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de cadastro no SisGen das espécies utilizadas nesta pesquisa.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A831224

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A831224**

Usuário: **UFMS**

CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**

Finalidade do Acesso:



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Talisia esculenta

Spodoptera frugiperda