

NEILIER RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR

**TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA E CINÉTICA DAS PROTEASES INTESTINAIS
DE LAGARTA DA SOJA: CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA BIOQUÍMICA A
INIBIDORES DE PROTEASES DE NATUREZA PROTEICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Coorientadores: Humberto Josué de O. Ramos
Elizabeth Pacheco Batista Fontes
Yaremis Beatriz Meriño Cabrera

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586t
2022

Silva Junior, Neilier Rodrigues, 1987-

Transcriptoma, proteoma e cinética das proteases intestinais de lagarta da soja: características da resposta bioquímica a inibidores de proteases de natureza proteica / Neilier Rodrigues Silva Junior. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (316 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.410>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteômica. 2. *Anticarsia gemmatalis*. 3. *Glycine max*. 4. Enzimas. 5. Pragas agrícolas - Controle. 6. Relação inseto-planta. I. Oliveira, Maria Goreti de Almeida, 1956-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.633

NEILIER RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR

**TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA E CINÉTICA DAS PROTEASES INTESTINAIS
DE LAGARTA DA SOJA: CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA BIOQUÍMICA A
INIBIDORES DE PROTEASES DE NATUREZA PROTEICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de junho de 2022.

Assentimento:



Neilier Rodrigues da Silva Júnior
Autor



Maria Goreti de Almeida Oliveira
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Eis que esta é a parte mais difícil da tese. Isso porque não há um modelo bioquímico, matemático ou estatístico que consiga mensurar o quão importante algumas pessoas foram (e são) na minha trajetória até aqui. Não que essas pessoas sejam difíceis de identificar, mas a dificuldade surge da minha limitação para explicar o valor delas em minha vida.

Agradeço à minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos dessa jornada e, em especial, à minha mãe – razão pela qual busco forças e inspiração para alcançar meus objetivos. À minha avó, que dizia sonhar em ver o neto formando e hoje o vê concluindo o doutorado. Agradeço à minha madrinha Angélica, ao tio Celso e aos meus afilhados Marcelo, Mateus e Helena pelo amor dado. À minha companheira de vida Ana Clara, que continuamente esteve ao meu lado, tornando-se imprescindível para que meus dias fossem sempre mais leves. Aos meus amigos de longa data e aos novos que Viçosa me deu. Esses são irmãos que escolhi.

Meu eterno agradecimento à Universidade Federal de Viçosa que me transformou como cidadão e pessoa, que me acolheu e fez do seu campus a minha casa. Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular: professores e professoras, técnicos e técnicas de laboratório, e secretários e secretárias pela dedicação e suporte de sempre. Aos membros do laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas pela fácil e prazerosa convivência – em especial à Yaremis e ao Rafael pelas parcerias.

Agradeço à minha orientadora pelo carinho maternal, direcionamento acadêmico, confiança e às oportunidades que me são dadas. Aos meus coorientadores pela dedicação, apoio e solicitude nestes anos de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Transcriptoma, proteoma e cinética das proteases intestinais de lagarta da soja: características da resposta bioquímica a inibidores de proteases de natureza proteica.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Yaremis Beatriz Meriño Cabrera.

Os inibidores de protease (IP) produzidos pelos vegetais têm um amplo espectro de proteases-alvo. No entanto, as pragas agrícolas encontraram formas de debelar os efeitos negativos dos IP de suas plantas hospedeiras. Para compreender os mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na interação inseto-planta, a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) e a soja (*Glycine max*) foram utilizadas como animal e planta modelo. Por meio de diferentes abordagens bioquímicas e biológicas, este trabalho apresentou as hidrolases intestinais da *A. gemmatalis* com elevada cobertura mediante à metodologia de 1DE-LC/MS proposta. Essa estratégia, apresentada de forma inédita, possibilitou a identificação de 98 hidrolases não redundantes, compreendendo isoformas importantes no mecanismo adaptativo do inseto a IP de plantas. As variações ocorridas nesse proteoma foram avaliadas expondo a lagarta a IP. Os resultados mostraram modulações fisiológicas que foram capazes de driblar os efeitos negativos dos inibidores. Houve aumento de isoformas responsáveis por atividades proteolíticas bem como aumento de proteínas relacionadas a processos de estresse. A presença de IP na dieta causou respostas nas atividades enzimáticas que revelaram uma melhor adaptação da lagarta ao IP natural da soja quando comparado a inibidores sintéticos. As análises de *docking* molecular mostraram a termodinâmica e os sítios de ligação envolvidos no complexo enzima-inibidor (EI), revelando características importantes para um IP eficiente. Usando esse conhecimento como base, um tripeptídeo (GORE2) foi racionalmente desenhado para atuar como inibidor de tripsinas-like de *A. gemmatalis*. O transcriptoma do intestino da lagarta mostrou que a presença do GORE2 e do SKTI, inibidor natural da soja, foram responsáveis por 1474 genes diferencialmente expressos, revelando importantes enzimas envolvidas na resposta do inseto. O GORE2 proposto mostrou-se mais eficiente que o SKTI ao provocar danos celulares no epitélio intestinal. Os danos mais intensos e extensos provocados pelo inibidor peptídico foram acompanhados por estresse oxidativo e pela baixa eficiência na resposta do inseto para se desintoxicar do estresse oxidativo por meio de enzimas antioxidantes. Esses resultados permitiram um melhor entendimento sobre o arsenal bioquímico e molecular do herbívoro para

propor um IP potente, abrindo caminho para novas abordagens no desenvolvimento de defensivos agrícolas ambientalmente corretos e eficientes no manejo de pragas.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*. Enzimologia. *Glycine max*. Manejo de pragas agrícolas. Proteômica.

ABSTRACT

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2022. **Transcriptome, proteome and kinetics of intestinal proteases of soybean caterpillar: characteristics of the biochemical response to protease inhibitors of protein nature.** Advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Yaremis Beatriz Meriño Cabrera.

Protease inhibitors (PIs) produced by plants have a broad spectrum of target proteases. However, agricultural pests have overcome the negative effects of PI on their host plants. To understand the molecular and physiological mechanisms involved in the insect-plant interaction, the soybean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) and soybean (*Glycine max*) were used as an animal and plant model. Through different biochemical and biological approaches, this work presented the intestinal hydrolases of *A. gemmatalis* with high coverage through the proposed 1DE-LC/MS method. This strategy, presented unprecedentedly, allowed the identification of 98 non-redundant hydrolases, comprising important isoforms in the adaptive mechanism of the insect to plant PI. The variations that occurred in this proteome were evaluated by challenging the caterpillar with PI. The results showed physiological modulations that aimed to circumvent the negative effects of inhibitors. There was an increase in isoforms responsible for proteolytic activities, as well as an increase in proteins related to stress processes. The presence of PI in the diet caused responses in the enzymatic activities that revealed a better adaptation of the caterpillar to the natural PI of soybean when compared to synthetic inhibitors. Molecular docking analyzes showed the thermodynamics and binding sites involved in the enzyme-inhibitor (EI) complex, shedding light on important features of an efficient IP. Using this knowledge as a basis, a tripeptide (GORE2) was rationally designed to act as a trypsin-like inhibitor of *A. gemmatalis*. The transcriptome of the caterpillar intestine showed that the GORE2 and SKTI, a natural soybean inhibitor, handled 1474 differentially expressed genes, revealing important enzymes involved in the insect's response. The proposed GORE2 proved to be more efficient than SKTI, in causing cellular damage to the intestinal epithelium. The most intense and extensive damage caused by the peptide inhibitor was accompanied by oxidative stress and the low efficiency in the insect's response to detoxify itself from oxidative stress through antioxidant enzymes. These results allowed a better understanding of the herbivore's biochemical and molecular arsenal to propose a potent IP,

opening the way for new approaches in the development of environmentally friendly and efficient pesticides in pest management.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*. Enzymology. *Glycine max*. Agricultural pest management. Proteomics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Soja.....	16
3.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae).....	18
3.3. Interação planta-praga	22
3.4. Proteases	27
3.5. Inibidores de proteases	28
3.6. Estresse oxidativo em insetos	31
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO I - Uso de inibidores de protease como alternativa promissora no controle de pragas	68
RESUMO	69
ABSTRACT	70
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. SERINO-PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASE VEGETAL.....	72
3. CONTRIBUIÇÕES DO NOSSO GRUPO DE PESQUISA	74
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81
RESUMO	99
ABSTRACT	100
1. INTRODUÇÃO.....	101
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1. Insetos e preparação da dieta artificial	103
2.2. Extração de proteína do intestino da lagarta e quantificação	103
2.3. Fracionamento de PEG.....	103

2.4. Géis <i>short-run</i>	104
2.5. Digestão em gel e espectrometria de massa para identificação de proteases	105
2.6. Anotação funcional da proteína identificada	106
2.7. Alinhamento de múltiplas sequências e reconstrução filogenética	106
2.8. Modelagem e <i>docking</i> molecular.....	107
3. RESULTADOS	107
3.1. Tratamento de amostras, SDS-PAGE e identificação	107
3.2. Múltiplas sequências de alinhamento e reconstrução filogenética.....	111
3.3. Previsão da estrutura terciária e avaliação dos modelos.....	114
3.4. <i>Docking</i> proteína-proteína	114
4. DISCUSSÃO.....	117
5. CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	125
TABELAS	145
CAPÍTULO III - Extensa reprogramação de isoformas proteicas e alterações histopatológicas no intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentado com inibidores de protease.....	152
RESUMO	153
ABSTRACT	154
1. INTRODUÇÃO.....	155
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	156
2.1. Insetos e preparo da dieta artificial contendo IPs.....	156
2.2. Análise proteômica por 2DE-LC/MS	156
2.3. Atividades proteolíticas do intestino médio da lagarta.....	159
2.4. Análises histológicas do intestino médio da lagarta.....	160
2.5. <i>Docking</i> proteína-ligante	160
3. RESULTADOS	160
3.1. Perfis de expressão proteica do intestino médio de lagarta na presença de inibidores de protease.....	160
3.2. Classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas.....	164
3.3. Abundâncias de protease em resposta a IPs adicionados nas dietas	167
3.4. Atividades de protease no intestino médio da lagarta na presença de IPs.....	169
3.5. Análises histológicas do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	171

3.6. <i>Docking</i> proteína-ligante	173
4. DISCUSSÃO	176
REFERÊNCIAS	180
CAPÍTULO IV – Transcriptoma, resposta ao estresse oxidativo e alterações histológicas da praga da soja <i>Anticarsia gemmatilis</i> a inibidores de protease natural e racionalmente desenhado	202
RESUMO	203
ABSTRACT	204
1. INTRODUÇÃO.....	205
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	206
2.1. Insetos e preparo da dieta artificial contendo IPs	206
2.2. Extração do RNA e sequenciamento	207
2.3. Análise de qualidade e montagem	207
2.4. Predição das ORFs e anotação funcional das proteínas	208
2.5. Análise dos transcritos diferencialmente expressos	209
2.6. Extração de proteínas do intestino da lagarta	209
2.7. Ensaio de enzimas antioxidantes e desintoxicantes.....	210
2.8. Análise estatística	210
2.9. Análises histológicas do intestino médio da lagarta.....	211
3. RESULTADOS	211
3.1. Análise de qualidade e montagem do transcriptoma de referência	211
3.2. Anotação funcional.....	211
3.3. Análise dos genes diferencialmente expressos (DEG).....	213
3.4. Atividade enzimática antioxidante	214
3.5. Histologia	215
4. DISCUSSÃO	216
5. CONCLUSÃO.....	223
REFERÊNCIAS	224
TABELAS	250
4. CONCLUSÕES GERAIS	254
APÊNDICE A - Capítulo de livro I	256

APÊNDICE B - Artigo I.....	272
APÊNDICE C - Artigo II.....	301

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os inibidores de protease (IP) são componentes fundamentais no controle da atividade proteolítica em sementes e órgãos de reserva de muitas culturas importantes como soja, batatas e feijão, podendo representar de 5 a 15% das proteínas totais (MAINKAR et al., 2021; SULTANA et al., 2022; SWATHI et al., 2021). O papel desses IP na defesa contra herbívoros e fitopatógenos passou a chamar atenção quando pesquisas mostraram que as concentrações de IP aumentavam além dos níveis necessários para controlar a hidrólise intracelular. Seria fisiologicamente desvantajoso a planta ter esse gasto bioenergético elevado para produzir IP em excesso. De fato, os IP já eram conhecidos como fatores antinutricionais, causando prejuízo ao desenvolvimento de herbívoros (HAM et al., 1945; KLOSE et al., 1946). No entanto, apenas na década de 1970 a relevância dos IP contra insetos-praga foi demonstrada por Green & Ryan (1972), quando evidenciaram que os IP são super expressos em folhas de tomateiro e batata injuriadas por besouros.

Desde então, diversos trabalhos têm se esforçado para compreender os mecanismos bioquímicos de sinalização da planta e como os IP são produzidos. Alguns avanços nesse sentido mostraram que, além da síntese local de IP, ocorrem transduções de sinais pelo floema que implicam a síntese de IP de forma sistêmica (NELSON et al., 1983). Além disso, alguns mensageiros foram identificados, como hormônios vegetais (PEÑA-CORTÉS et al., 1994), oligossacarídeos (HAHN et al., 1993), polipeptídeos (PEARCE et al., 1991) e sinalização elétrica (WILDON et al., 1992). Uma vez que a produção de IP pela planta frente ao ataque de insetos ficou evidente, tornou-se fundamental compreender como os insetos respondem à presença de IP na dieta.

Ainda na década de 1970, dois modelos ganharam atenção por proporem explicações para os efeitos negativos dos IP no desenvolvimento de herbívoros. O primeiro mecanismo propôs que os IP limitam a disponibilidade de aminoácidos essenciais necessários para a síntese de novas proteínas (ALMQUIST; MERRITT, 1951, 1953; NITSAN; ALUMOT, 1964; PEARCE; MCGINNIS; RYAN, 1979). Porém, o crescimento de animais foi prejudicado em presença de IP, mesmo quando aminoácidos livres eram acrescidos à dieta (LIENER et al., 1949; WESTFALL et al., 2016). Resultados semelhantes também foram observados quando lagartas de *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* expostas a IP tiveram o crescimento comprometido, mas sem redução da atividade de proteases no intestino (BROADWAY; DUFFEY, 1986). Isso mostrou que a ação dos IP vai além da simples inibição das proteases

intestinais. Foi quando Lyman & Lepkovsky (1957) propuseram um segundo mecanismo no qual o prejuízo no desenvolvimento resultava do estresse fisiológico causado pela super produção de hidrolases para compensar as enzimas inibidas.

Apesar de muitos trabalhos já terem sido realizados, os mecanismos adaptativos e como os insetos percebem os diferentes IP ainda são pouco conhecidos. O fato é que muitas pragas agrícolas têm a capacidade de adaptarem-se à ingestão de IP. Portanto, é fundamental compreender como se dão esses mecanismos adaptativos para tornar possível a formulação de defensivos agrícolas baseados em IP com capacidade de driblar o sistema de defesa do inseto. Para que isso ocorra, é essencial o conhecimento do proteoma enzimático do intestino da lagarta; ou seja, quais as enzimas alvo de IP.

Além disso, diversos fatores precisam ser considerados para entender a interação protease-IP, como a caracterização cinética, a estabilidade dos complexos enzima-inibidor (EI) e como o proteoma do inseto é modulado na presença do IP na dieta. Outro fator importante que deve ser considerado é a susceptibilidade à degradação proteolítica sofrida pelos IP no intestino do inseto, causando diminuição na eficiência inseticida. Pensando nisso, é importante que o IP tenha um número reduzido de sítios de clivagem. Além de limitar a hidrólise, um IP pequeno tem sua síntese menos dispendiosa - tanto sob o ponto de vista bioenergético para plantas transgênicas quanto para produto de pulverização.

As enzimas marcadoras do estresse oxidativo estão frequentemente associadas à resistência de insetos a pesticidas devido às suas capacidades desintoxicantes (BI; FELTON, 1995; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; KODRÍK et al., 2015). Portanto, sob o ponto de vista de adaptabilidade e resposta do inseto, é vantajoso que o desenho racional de um agroquímico vise causar estresse oxidativo, porém limitando a resposta do sistema de defesa do artrópode em relação às enzimas antioxidantes.

A maioria dos pesticidas afetam organismos não-alvo devido à sua baixa especificidade. Por isso, o uso intensivo de pesticidas traz consequências ambientais, como contaminação do lençol freático e comprometimento da biodiversidade local, além dos riscos à saúde humana (RANI et al., 2021; SILVA et al., 2021; ZHOU; LI, 2021). Nesse sentido, o uso de IP de origem proteica traz boas expectativas no manejo de pragas agrícolas. Além da especificidade entre o complexo EI, um inibidor de origem proteica tem baixa persistência no solo e é biodegradável, reduzindo os danos da contaminação ambiental (COTABARREN et al., 2020; EREMIA; LUPESCU; TCACENCO, 2011).

Devido ao interesse crescente em explorar IP com essas características para o manejo de insetos-praga, o foco deste trabalho foi compreender os efeitos bioquímicos e fisiológicos

de IP na lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), uma praga chave na sojicultura e utilizada como animal modelo. Por fim, apresentamos um IP promissor, racionalmente desenvolvido para o controle de lepidópteros que supera os desafios encontrados pelos pesticidas convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar as respostas bioquímicas e fisiológicas de inibidores de proteases de origem proteica em *Anticarsia gemmatalis* e avaliar os efeitos de um inibidor peptídico para composição de formulações bioinseticidas no manejo de pragas agrícolas.

2.2. *Objetivos específicos*

CAPÍTULO I: sistematizar os avanços nos mecanismos bioquímicos e desafios que envolvem a interação planta-praga, bem como a formulação de IP eficientes no manejo de insetos.

CAPÍTULO II: identificar as sequências das proteases pelo mapeamento proteômico do intestino da *Anticarsia gemmatalis* e analisar as ligações entre as enzimas-alvo e inibidores de protease por *docking* molecular.

CAPÍTULO III: avaliar as alterações do proteoma intestinal da *Anticarsia gemmatalis* e os danos celulares causados quando desafiada com inibidores de protease. Avaliar o efeito dos inibidores de protease na atividade enzimática do intestino da lagarta e compreender as interações proteína-ligante prováveis sob uma abordagem *in silico*.

CAPÍTULO IV: avaliar os efeitos de um tripeptídeo inibidor de protease para ser utilizado no manejo de Lepidoptera; avaliar os efeitos causados pelo tripeptídeo e pelo inibidor natural da soja sobre o transcriptoma, o estresse oxidativo e as alterações morfofuncionais causadas no intestino da *Anticarsia gemmatalis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soja

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, pertence à classe das Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydae, ordem Rosales, subordem Leguminosinae, família Leguminosae, subfamília Papilionaceae, tribo Phaseoleae, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* (Moench) e espécie *Glycine max* (L.) Merrill (LI et al., 2018). A planta apresenta um porte que varia entre 60 e 110 cm de altura, dependendo da cultivar e das condições ambientais. Os caules das principais cultivares são pouco ramificados e apresentam híspido, além de raízes com ramificações que partem de um eixo principal. As vagens contêm cerca de cinco grãos com tegumento amarelo. As folhas da soja são trifoliadas e suas flores realizam fecundação autógama, realizando fecundação cruzada numa taxa de aproximadamente 1% (AWASTHI, 2018; TUELHER et al., 2018).

Há aproximadamente 5000 anos, a soja selvagem (*Gycine soja* Sieb. & Zucc.) foi domesticada na China e a espécie resultante (*G. max*) se espalhou pelo mundo (WILSON, 2008). A domesticação de plantas é tida como um dos aspectos mais importantes para o desenvolvimento da agricultura (DIAMOND, 2002); esse evento contribuiu para que a soja se tornasse hoje a oleaginosa de maior importância no mundo, servindo também como uma importante fonte de proteína para a alimentação animal e humana (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011; NIWIŃSKA et al., 2020). Nesse sentido, o melhoramento precoce da soja baseou-se principalmente na seleção de sementes com melhores atributos ao longo do tempo. A partir do início do século XX, a hibridização artificial foi aplicada (ZHANG et al., 2022). A primeira cultivar moderna de soja desenvolvida por hibridização foi lançada em programas de melhoramento norte-americanos na década de 1940 (RINCKER et al., 2014; WOLFGANG; AN, 2017). Posteriormente, a hibridização artificial passou a ser amplamente incorporada no melhoramento de soja (ANDERSON et al., 2019; LI et al., 2001). Essa estratégia de manipulação da planta expandiu muito a base genética das linhagens desenvolvidas e melhorou significativamente a adaptação e a produção da soja (ANDERSON et al., 2019).

Em junho de 2022, 4165 cultivares estavam registradas no Registro Nacional de Cultivares para a espécie *Glycine max* (L.) Merrill. As grandes variedades genéticas da soja implicam diferenças tanto no ciclo vegetativo (período entre emergência da plântula e a floração) quanto no ciclo reprodutivo (período do início da floração e o fim do ciclo da cultura), além de resistência a fatores bióticos e abióticos (LI et al., 2018). As principais cultivares

plantadas comercialmente no Brasil têm os ciclos que podem ser classificados entre precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, que ocorrem entre 60 e 120 dias (HIROSHI; JOELSIO; LAZZAROTTO, 2014; HUNGRIA et al., 2014).

Diferentes combinações de fatores agroecológicos influenciam na produtividade da soja. Fatores abióticos como o fotoperíodo, a disponibilidade de água, a temperatura a época de semeadura e a incidência solar podem influenciar a produtividade (BEL et al., 2017; TUELHER et al., 2018). Por isso, a escolha da cultivar também é de grande importância. Cultivares semeadas em épocas inadequadas não expressam seu potencial de crescimento e, conseqüentemente, têm a produtividade limitada (AWASTHI, 2018).

A soja ocupa grandes áreas de plantio que visam os mercados interno e externo, sendo a principal commodity agrícola de importância econômica no Brasil (COLUSSI et al., 2022; HACISALIHOGU et al., 2016). Os principais países produtores desse grão são, em ordem de produtividade: Brasil, Estados Unidos e Argentina. Juntos, esses países correspondem a mais de 80% da oferta mundial (ALGHAMDI et al., 2018; KARGES et al., 2022; LAFLEN; MOLDENHAUER, 2022). Na safra 2020/2021, a produção brasileira de soja alcançou 135,409 milhões de toneladas, com o rendimento de 3517 kg ha⁻¹ (Companhia Nacional de Abastecimento/CONAB, 2021), enquanto a produção mundial foi 362,947 milhões de toneladas (USDA, 2021). Atualmente, os principais estados brasileiros são: Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, representando aproximadamente 70% da produção nacional.

Além disso, a cultura da soja contribui com cerca de 25% da produção mundial de óleo vegetal. Esse produto possui uma grande diversidade e apelo de mercado, podendo ser utilizada na alimentação humana, indústria têxtil, fabricação de tintas, cosméticos e biocombustíveis (BORTOLOTO et al., 2015; CHEN et al., 2012). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a indústria brasileira transforma anualmente cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico. Os resíduos provenientes da indústria do óleo de soja são majoritariamente direcionados para o uso na alimentação animal como fonte de aminoácidos por meio do farelo de soja - entrando na composição da ração de aves, caprinos, ovinos, bovinos entre outros (ALGHAMDI et al., 2018; HACISALIHOGU et al., 2016). O grão também é utilizado na fabricação de biscoitos, margarina, temperos e chocolates, além da crescente demanda por leite de soja e suco de frutas enriquecido com soja (DA GRAÇA et al., 2016; TUELHER et al., 2018).

Toda essa produtividade e diversidade de aplicações redonda da Revolução Verde - um dos eventos mais marcantes na agricultura dos séculos XX e XXI (EVENSON; GOLLIN, 2003;

HEDDEN, 2003; PATEL, 2013). O crescimento populacional associado aos avanços agrícolas devem impulsionar a produtividade da soja de forma cada vez mais acelerada (AINSWORTH et al., 2012; RAY et al., 2013). Como a maior parte da produção de soja ocorre na América do Sul e América do Norte, a expectativa é de que a África possa se tornar outra área dominante de produção de soja. Assim, é preciso desenvolver novas variedades para atender às futuras mudanças ambientais e criar um sistema agrícola mais sustentável (BISHOP et al., 2015; KUMAGAI et al., 2015; MOURTZINIS et al., 2015; RUIZ-VERA et al., 2013; TIAN et al., 2021).

Apesar de a produção de soja estar aumentando nas últimas décadas, ela tem sido limitada por fatores bióticos, como as pragas (ALGHAMDI et al., 2018). A cultura intensiva da soja associada ao mau uso de agroquímicos vem favorecendo a presença de diversas pragas resistentes (BEL et al., 2017).

3.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)

Diversos insetos são encontrados na cultura de soja e a *Anticarsia gemmatalis*, também conhecida como a lagarta da soja, se destaca pela grande densidade populacional (ONGARATTO et al., 2021; PLATA-RUEDA et al., 2020). Devido a isso, ela é considerada uma das principais pragas da soja e o principal inseto desfolhador da sojicultura, podendo implicar perda foliar de 100% em períodos de infestação na lavoura (MOSCARDI et al., 2012; PILON et al., 2017; PLATA-RUEDA et al., 2022; VIANNA et al., 2011). Esses insetos atacam desde a plântula à fase vegetativa e de floração durante a fase larval (LEVY et al., 2004) e está presente em todo o território brasileiro (BORTOLI et al., 2011; MASSAROLLI et al., 2018). A *A. gemmatalis* devora as folhas e provoca sérios danos durante seu desenvolvimento larval. A herbivoria ocorre tanto no limbo quanto nas nervuras das folhas (MERIÑO-CABRERA et al., 2018; PILON et al., 2013). A lagarta pode consumir, em média, 90 cm² de folhas a cada 24 h. Isso equivale ao dobro da própria massa corpórea por dia, dependendo do instar larval (MOREIRA et al., 2011; VIANNA et al., 2011).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo e possui picos populacionais a partir de janeiro (SILVA; COSTA; BOSS, 2003; VARGAS et al., 2017). O estágio de pupa (Fig. 1a) é encontrado na superfície do solo, podendo ficar em uma profundidade de até 2 cm durante sete dias, medindo de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; SANCHES et al., 2018). A mariposa

tem de 30 a 38 mm de envergadura (Fig. 1b), sem dimorfismo sexual e atinge um tempo de vida de aproximadamente quinze dias. Os ovos medem cerca de 1,5 mm de diâmetro (Fig. 1c) e são postos pela mariposa na face abaxial das folhas. A eclosão ocorre cerca de três dias após a postura dos ovos (MOSCARDI et al., 2012; SANCHES et al., 2018).

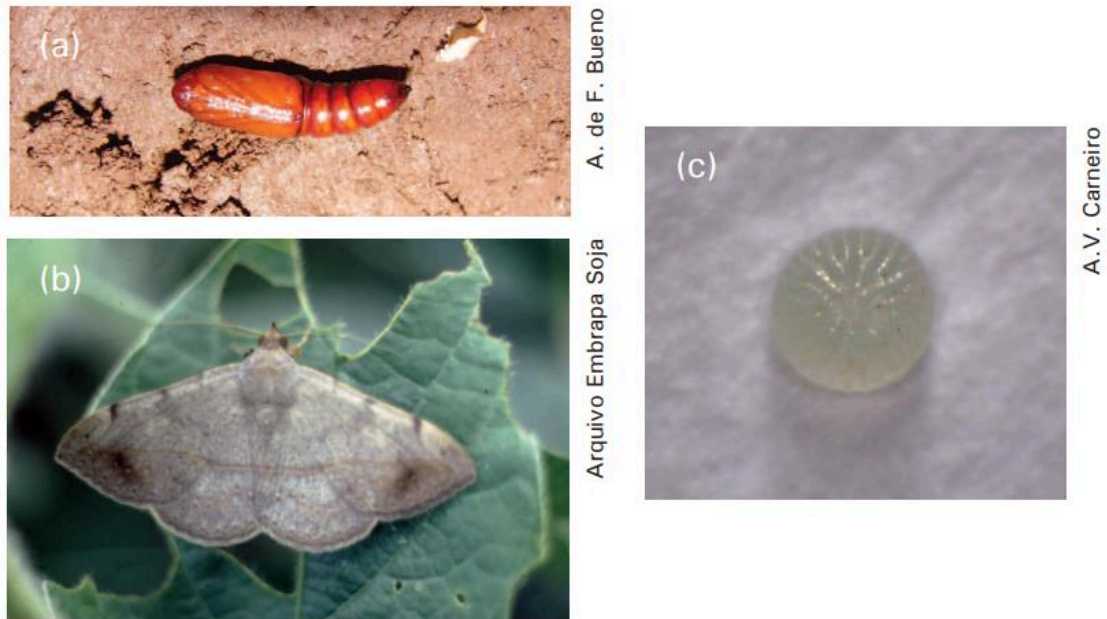


Figura 1. Pupa (a), adulto (b) e ovo (c) de *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em Moscardi et al. (2012).

As lagartas emergentes dos ovos recém eclodidos se desenvolvem até aproximadamente 1 cm com coloração verde (Fig. 2a), exibindo quatro pares de patas abdominais. A duração da fase larval chega a 25 dias, perpassando por seis instares, alcançando 48 mm de comprimento, quando apresenta maior voracidade na herbivoria (Fig. 2c). O fim da fase larval - estágio pre-pupa - dura, em média, dois dias, quando a lagarta chega a diminuir seu comprimento para 25 mm (SANCHES et al., 2018; VIANNA et al., 2011).

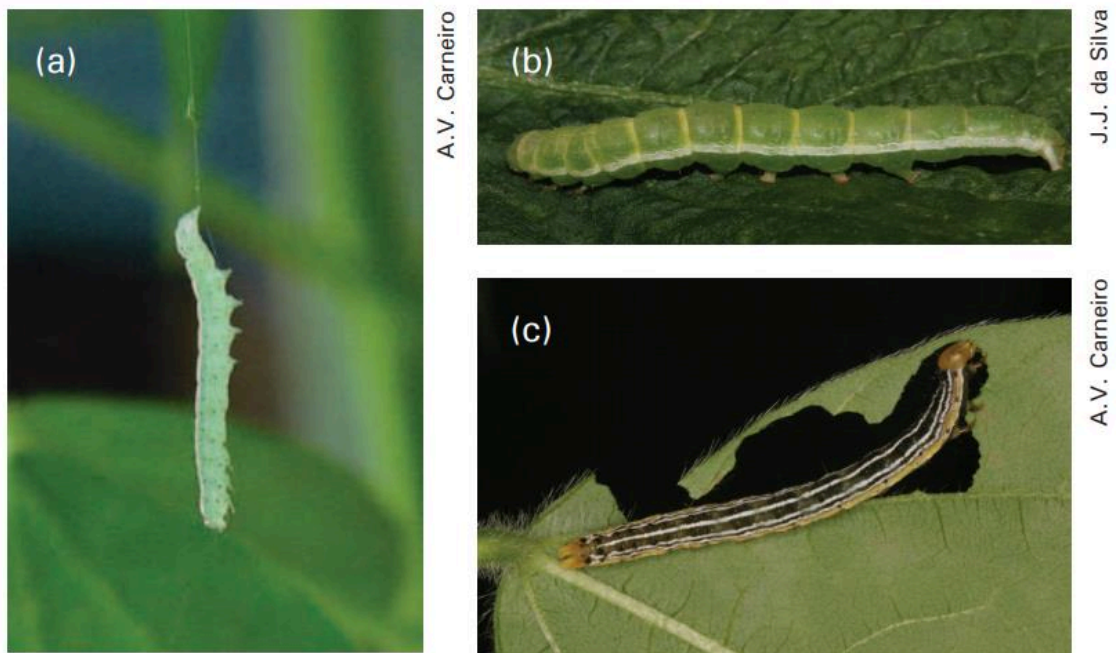


Figura 2. Lagarta pequena (a) e grande (b) com coloração verde e escura (c) de *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em Moscardi et al. (2012).

Uma única fêmea de *A. gemmatalis* deposita cerca de 400 ovos durante sua vida. Esse número pode chegar a 1200 ovos em condições otimizadas de laboratório, quando alimentada com folhas de soja (DE QUEIROZ et al., 2020; FOERSTER; BUTNARIU, 2004; GODFREY; WHITCOMB; STIMAC, 1989). A duração de cada ínstar larval pode variar dependendo da planta hospedeira e da temperatura (FIAZ et al., 2018; MILANO, 2008), podendo chegar a 33 dias em condições otimizadas. O tempo de vida do ovo ao adulto varia entre 15,1 e 19,4 dias (Fig. 3), quando alimentado com soja e em condições naturais de campo (MAGRINI; BOTELHO; SILVEIRA NETO, 1999).

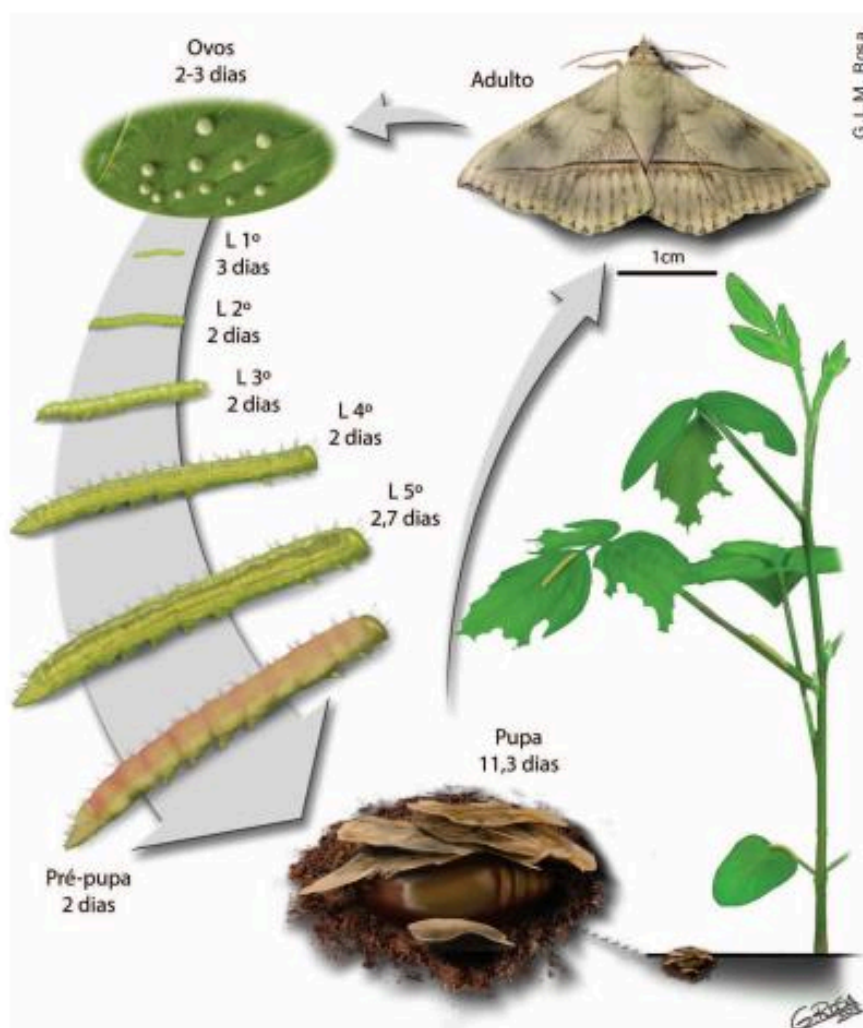


Figura 3. Ciclo de desenvolvimento da *Anticarsia gemmatilis*. Disponível em Moscardi et al. (2012).

O uso de métodos alternativos para o controle de pragas agrícolas como a *A. gemmatilis* tem sido uma tendência cada vez mais crescente, visando substituir defensivos químicos por biopesticidas menos poluentes e mais específicos (DARRAG; ALMUHANNA; HAKAMI, 2022; KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018). Apesar disso, os métodos de controle de pragas como a *A. gemmatilis* ainda se concentram na utilização de inseticidas nocivos ao meio ambiente (CHOE et al., 2022). O uso intensivo e indiscriminado de pesticidas tradicionais causa desequilíbrio na população de predadores naturais e, conseqüente, de toda a teia alimentar, além do impacto à saúde humana (WALSH et al., 2022). Esses desequilíbrios favorecem a seleção de pragas resistentes, exigindo cada vez mais o uso de produtos com doses mais elevadas (GUO et al., 2022; GUZMÁN-PLAZOLA et al., 2016; WALSH et al., 2022). Novas estratégias de proteção das plantas se concentram em minimizar o uso de pesticidas e aumentar suas

compatibilidades com agentes de controle ecologicamente corretos (BABIN et al., 2022; DARRAG; ALMUHANNA; HAKAMI, 2022; MAMUR; GÜNDÜZER; YAMAN, 2022)

A *A. gemmatalis* é adaptável a fatores abióticos como temperatura, fotoperíodo e alimento, com mecanismos de sobrevivência selecionados ao longo do processo evolutivo (KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018). A lagarta da soja também possui alta plasticidade fisiológica frente a estressores bióticos. Mudanças qualitativas e quantitativas ocorrem no intestino do inseto quando submetido a dietas contendo inibidores de proteases (IP) de plantas (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; DE ALMEIDA BARROS et al., 2021; SILVA-JÚNIOR et al., 2021). Esses IP são encontrados constitutivamente em várias partes da planta e podem ser proteínas, peptídeos ou metabólitos secundários (JONGSMA; BOLTER, 1997; PILON et al., 2017). Dentre as respostas mais comuns, pode-se destacar o aumento dos níveis de proteases específicas a fim de alcançar a taxa ideal da digestão proteica (PATARROYO-VARGAS et al., 2018; SILVA-JUNIOR et al., 2022); além de respostas qualitativas como a síntese de isoformas de proteases insensíveis ao IP ingerido (OLIVEIRA et al., 2005; SILVA-JUNIOR et al., 2022). Essa tentativa de suprir a deficiência de proteases ativas desvia aminoácidos destinados ao metabolismo celular para a produção de novas enzimas, o que compromete o desenvolvimento larval, podendo levá-la à morte (SILVA-JUNIOR; OLIVEIRA, 2021).

Com isso, as hidrolases intestinais têm sido foco dos programas de controle de pragas. Foi demonstrado que sua inibição por IP compromete o desenvolvimento e diminui a taxa de sobrevivência dos insetos (DE ALMEIDA BARROS et al., 2021; MOREIRA et al., 2011; PAIXÃO et al., 2013). Mendonça et al. (2011) verificaram que isoformas de cisteíno protease presentes no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* auxiliam no processo de digestão proteica do herbívoro, podendo ser um alvo auxiliar para o controle dessa praga agrícola. Portanto, o conhecimento das enzimas digestivas da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são fundamentais para o desenvolvimento de novos programas mais eficientes e ecologicamente corretos de controle dessa praga.

3.3. Interação planta-praga

As plantas são organismos sésseis que desenvolveram estratégias dinâmicas de defesa para melhorar sua sobrevivência e reprodução. Uma importante via de defesa de plantas a inseto consiste na produção de uma ampla variedade de IP, que afetam o desempenho e a resistência

dos insetos fitófagos (HABIB; FAZILI, 2007; JONGSMA; BOLTER, 1997; KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997; SOUZA CÂNDIDO et al., 2011). De uma forma mais ampla, os mecanismos de defesa das plantas podem ser divididos entre diretos ou indiretos. Na defesa direta ocorre a produção de compostos bioquímicos que visam prejudicar o herbívoro. Por outro lado, a defesa indireta consiste na liberação de compostos voláteis que atraem predadores naturais do herbívoro (DE LEO et al., 2002; FARMER; JOHNSON; RYAN, 1992; LAWRENCE; KOUNDAL, 2002). Para que essa resposta ocorra de forma eficiente e específica, é necessário que a planta identifique a lesão causada por meio de um elicitador (AMIL-RUIZ et al., 2011; SOUZA CÂNDIDO et al., 2011).

Sendo assim, a coevolução entre herbívoros e plantas favoreceu vegetais que reconhecessem o herbívoro agressor e armam uma maquinaria de resposta na tentativa de debelar a herbivoria. Frequentemente, a planta tem como alvo processos metabólicos importantes envolvidos na fisiologia dos insetos, como sistema digestivo, nervoso e endócrinos (IQBAL et al., 2021; KUMAR et al., 2020; SILVA-JUNIOR et al., 2022; ZOGLI et al., 2020). Assim, as plantas produzem moléculas de defesa especializadas contra esses processos (MALIK; KUMAR; NADARAJAH, 2020; SARMENTO et al., 2011; YADAV et al., 2020). Uma das formas de os insetos serem percebidos pelas plantas se dá pela presença de compostos específicos em suas secreções salivares, intestinais, pelos fluidos de oviposição e por danos mecânicos (CHEN; MAO, 2020; JONES; FELTON; TUMLINSON, 2021; REYMOND, 2013). Esses candidatos a indutores de resposta imune das plantas incluem conjugados ácido graxo-aminoácido, caeliferinas, proteínas e peptídeos (MUSSER et al., 2002; SHEN et al., 2022; TIAN et al., 2012). Alguns eliciadores ativam a via de sinalização do ácido jasmônico (JA), levando a defesas diretas e defesas indiretas (AMENT et al., 2004; MUSSER et al., 2002; PAUDEL et al., 2020). Devido a isso, pesquisas envolvendo a diversidade e a caracterização de elicitores de insetos tem se mostrado cada vez mais promissoras ao demonstrarem vias metabólicas chave envolvidas na interação planta-praga (MALIK; KUMAR; NADARAJAH, 2020; VENEGAS-MOLINA et al., 2020; ZEHRA et al., 2021).

Uma via de defesa de plantas ao ataque de insetos que merece destaque é a via das lipoxigenases (FARMER; RYAN, 1990; FEUSSNER; WASTERNAK, 2002; SHIVAJI et al., 2010). O dano mecânico desencadeia reações de hidrólise de lipídeos de membrana iniciada pelas lipoxigenases (LOX) (FEUSSNER; WASTERNAK, 2002; VISWANATH et al., 2020). As LOX formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que levam à formação de ácido jasmônico (JÁ), associado à ativação de genes que codificam para a síntese de IP (FARMER; RYAN, 1992; MELAN et al., 1993; SINGH et al., 2022). Esses IP comprometem o potencial hidrolítico

no intestino médio do inseto, diminuindo o aporte de aminoácidos biodisponíveis para a construção de novas proteínas pelo metabolismo (MECH; CHOUDHURY; BORA, 2021; MUKHTAROVA et al., 2020; SILVA-JUNIOR et al., 2022). Essa carência de aminoácidos essenciais implica deficiência nutritiva com consequente má formação do inseto, podendo levá-lo à morte (DE OLIVEIRA et al., 2020; MENDONÇA et al., 2020).

Os IP têm se mostrado ferramentas promissoras no controle de pragas agrícolas (COTABARREN et al., 2020; SINGH et al., 2020). Os insetos dispõem de uma ampla diversidade de respostas adaptativas descritas, mas boa parte dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que envolvem IP e as proteases do inseto necessitam ser elucidados (OPPERT et al., 2010; PANDEY; YADAV; SANYAL, 2022; PETEK et al., 2012). Esse conhecimento é uma ferramenta estratégica fundamental no controle sustentável de pragas (MISHRA; REDDY; PRASAD, 2020; PANDEY; YADAV; SANYAL, 2022; SUBAHARAN et al., 2021). No entanto, não há caracterização da identidade das proteases envolvidas no complexo protease-inibidor. Tampouco há uma descrição do mapeamento do centro ativo ou da estrutura primária dessas hidrolases, que é de extrema importância para que a cinética de inibição dessas proteases intestinais possa ser entendida frente a inibidores peptídicos das plantas.

As estratégias de controle de praga precisam considerar muitos aspectos da produção agrícola. Cronogramas intensivos de produção e eliminação de inimigos naturais por pesticidas químicos de amplo espectro em monoculturas de grande escala promovem o aumento populacional de pragas resistentes (DAVID, 2021; HADDI et al., 2020; HOROWITZ et al., 2020). Além disso, os ecossistemas agrícolas altamente simplificados podem favorecer insetos generalistas - espécies que podem se alimentar de múltiplas culturas -, facilitando o estabelecimento de espécies invasoras (CHEN et al., 2020; VAN LEEUWEN et al., 2020).

Assim, o estudo de mecanismos de resistência endógena das plantas a injúrias provocadas por insetos é uma tendência promissora para o desenvolvimento de ferramenta de controle de pragas. Embora os métodos de controle de pragas ainda se concentrem na utilização de defensivos agrícolas clássicos, novos métodos de controle populacional de insetos em cultivares baseados em agroquímicos ecologicamente corretos tem sido explorados (CHEN et al., 2020; HADDI et al., 2020; HOROWITZ et al., 2020). O elevado custo de desenvolvimento de novos pesticidas cujas formulações devem se adequar às pragas resistentes, aos prejuízos ambientais causados e à pressão do mercado consumidor contra práticas predatórias, têm estimulado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna (BUENO et al., 2021; DEGUINE et al., 2021). Nesse sentido, a busca por compostos de menor custo, mais específicos

e menos poluentes, como os biopesticidas, é uma prática cada vez mais frequente entre os órgãos de pesquisa (FLETCHER et al., 2020; KUMAR et al., 2021; LIU et al., 2021).

A preferência de um herbívoro por uma espécie vegetal, assim como sua performance na herbivoria, é influenciada por características da planta alvo, como a concentração de nutrientes, metabólitos secundários e barreiras mecânicas, como tricomas (TREMMELE; MÜLLER, 2013). Nesse sentido, insetos selecionam as plantas que lhes possibilitam uma melhor performance; contudo, compostos de defesas são produzidos nas diferentes espécies de plantas em resposta aos herbívoros (BÖTTNER et al., 2021; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Estes compostos podem ser constitutivos ou induzidos após o ataque do inseto (GÓMEZ et al., 2020; MARTEL et al., 2015).

As respostas bioquímicas específicas armadas pela planta requerem o reconhecimento dos diferentes danos causados pelos herbívoros. Esse recrutamento da maquinaria celular leva à ativação de genes por cascatas de sinalização celular. Muitas vezes, esse reconhecimento ocorre em poucos minutos (MAFFEI; MITHÖFER; BOLAND, 2007). Ao longo do processo coevolutivo, os insetos desenvolveram estratégias para contornar os mecanismos de defesa da planta, as quais incluem a metabolização e o sequestro de compostos tóxicos, mecanismos de fuga e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA et al., 2001).

A soja é responsiva aos estresses bióticos e abióticos ativando a via das lipoxigenases. A produção de IP e metabólitos secundários que ocorre ao final dessa via indica que o uso de IP no controle de insetos-praga é um alvo promissor (ALGHAMDI et al., 2018; GROVER et al., 2018). Baseado nisso, pesquisas têm revelado a eficiência de inibidores sintéticos de proteases contra *A. gemmatalis*. Dietas contendo IP do tipo benzamidinas comprometeram o desenvolvimento da lagarta da soja, implicando a morte do inseto ainda na fase larval (COURA et al., 2022; MARTINS PILON et al., 2009; PILON; OLIVEIRA; GUEDES, 2006). Nessa interação entre os IP e as proteases intestinais do artrópode, as principais enzimas envolvidas na digestão de *A. gemmatalis* na fase larval são as serino-proteases (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020). As tripsinas-like estão entre as principais serino-proteases envolvidas na fase inicial da digestão protéica de lepidópteros, clivando a porção carboxil de resíduos básicos, como L-arginina e L-lisina. As tripsinas isoladas do intestino médio de vários insetos exibem massa molecular entre 20 e 35 kDa e atividade ótima em pH alcalino (SILVA-JUNIOR et al., 2022; TERRA; FERREIRA, 1994).

Estudos com as serino-proteases parcialmente purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* mostraram a presença de enzimas com atividade de tripsinas-like ligadas a membrana do intestino do inseto (XAVIER et al., 2005) e no extrato solúvel do intestino

(OLIVEIRA et al., 2005; ZHANG; WANG, 2018). Pilon et al. (2017) caracterizaram as serino-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* e mostraram que as enzimas bacterianas contribuem significativamente para hidrólise total que ocorre no intestino médio da lagarta. O trabalho evidenciou ainda que as proteases produzidas pela microbiota se assemelharam àquelas presentes na fração solúvel e na fração insolúvel (proteases ligadas à membrana), ambas as frações produzidas pelo inseto. No entanto, é necessário compreender a cinética de inibição enzimática destas proteases intestinais do inseto e sua interação com os IP.

Pesquisas sobre a aplicabilidade de IPs em programas de controle visam, principalmente, a expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (CRISTIAN YIZARD LIZARDO CHAVEZ, 2016; DUNAEVSKY et al., 2005; HAQ; ATIF; KHAN, 2004; LUIZ; SILVA, 2015). Ashouri et al. (2017) realizaram extração e purificação de inibidores de cisteíno proteases de sementes de girassol e verificaram potencial desse inibidor frente a protease do intestino do besouro-da-batata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Chrysomelidae). Silva (2015) verificou que a concentração de inibidores de proteases em cultivares de soja susceptível (IAC PL1) e resistentes (IAC 17, IAC 18, IAC 19 e IAC 24) injuriadas por *A. gemmatalis* aumentou ao longo do tempo. Além destes estudos com inibidores das plantas estimulados pelos insetos, existem ainda aqueles com aplicação de inibidores sintéticos para avaliar o perfil das enzimas digestivas de diversas pragas (CRISTIAN YIZARD LIZARDO CHAVEZ, 2016; PAIXÃO et al., 2013; PILON et al., 2004, 2017).

Estudos sobre os mecanismos de resistência de insetos em resposta a defesa de plantas levaram a uma valorização da notável diversidade e plasticidade das proteases digestivas de insetos. Além do papel de digerir proteínas dos alimentos, essas proteases desempenham um papel na defesa contra inibidores de proteases de plantas (AHN; ZHU-SALZMAN, 2009). Pesquisas relacionadas às respostas de insetos alimentados com dietas contendo IPs de plantas têm indicado uma resposta bifásica caracterizada por uma alta regulação inicial de proteases digestivas específicas que precede de uma baixa regulação simultânea de proteases sensíveis ao IP e uma alta regulação de proteases insensíveis ao IP. Assim, no trato intestinal do inseto ocorrem mudanças quantitativas que incluem o aumento dos níveis de proteases específicas ou generalistas para alcançar a taxa ideal da digestão de proteínas. Ocorrendo, ainda, respostas qualitativas que incluem a síntese de isoformas de proteases “insensíveis”, que não são capazes de ligar-se ao IP ou que tenham a possibilidade de se ligar e degradar o IP (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004; SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006; ZHU-SALZMAN; LUTHE; FELTON, 2008). Estes estudos são necessários para a identificação de moléculas

fundamentais, que eventualmente ajudarão na compreensão de eventos complexos de sinalização, responsáveis pelo acompanhamento e coordenação de absorção de nutrientes e atividade proteolítica intestinal. Verifica-se, assim, um importante mecanismo de adaptação por parte dos insetos que deve ser detalhadamente estudada em nível molecular a fim de se conseguir desenvolver uma estratégia de controle mais eficaz.

3.4. *Proteases*

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas e são classificadas de acordo com Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB dentro da classe 3 (hidrolases), subclasse 4 (peptidases). Elas também são classificadas de acordo com três critérios: a) tipo de reação catalisada, b) natureza química do sítio catalítico e c) relação evolutiva de acordo com a estrutura (KUZELA; GOLDBERG, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais: exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação.

As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos: a) serino-proteases, b) aspartil-proteases, c) cisteíno-proteases e (d) metalo-proteases. As serino-proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspartil-proteases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um resíduo de aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO et al., 1998).

Proteases digestivas de insetos são caracterizadas em serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases (TERRA; FERREIRA, 1994). Uma espécie de inseto chega a possuir múltiplas proteases digestivas em seu intestino, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (AHN; ZHU-SALZMAN, 2009; LIU et al., 2004; ZHU-SALZMAN; LUTHE; FELTON, 2008).

As serino-proteases são a principal classe de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteras (TERRA; FERREIRA, 1994). Entre elas, tripsina e quimotripsina são as mais estudadas e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem além da digestão, ativação de proteínas específicas - como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas, no desenvolvimento e

produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (PAGE; DI CERA, 2008).

3.5. Inibidores de proteases

Estudos sobre inibidores de proteases presentes em plantas iniciaram-se a partir da década de 40, quando Kneen & Sandstedt (2002) encontraram um inibidor de α -amilase em grãos de vários cereais e, posteriormente, Kunitz (1945) purificou uma proteína termoestável da soja capaz de inibir a tripsina.

Os inibidores das serino-proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (LAWRENCE; KOUNDAL, 2002). O papel fisiológico desses inibidores nas plantas inclui: a) regulação das proteinases endógenas durante a dormência das sementes, b) imobilização das proteínas de reserva, c) proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos e d) proteínas de reserva (HAQ; ATIF; KHAN, 2004). São proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em famílias diferentes baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. Os IPs inibem as proteases do intestino do inseto, ligando fortemente ao centro ativo formando um complexo essencialmente irreversível. A incapacidade de utilizar a proteína ingerida e reciclar as enzimas digestivas resulta numa deficiência de aminoácido crítico, o que afeta o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do herbívoro (MACEDO et al., 2011).

O mecanismo de ação de um inibidor de proteases de planta baseia-se na inibição competitiva de uma protease via bloqueio de sua atividade proteolítica (MACEDO et al., 2011). A especificidade é uma característica marcante nos estudos das interações entre enzima-inibidor, sendo determinada pela dinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima.

A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo EI formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa (10^{-7} a 10^{-14} M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (LAWRENCE; KOUNDAL, 2002).

As duas famílias melhor caracterizadas de inibidores de serino-proteases são os inibidores de tripsina da soja, dos tipos Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). Nos grãos de

soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (BRANDON; BATES; FRIEDMAN, 1989), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (BRANDON; FRIEDMAN, 2002).

Os inibidores da família Bowman-Birk são proteínas globulares solúveis, caracterizadas por suas pequenas massas moleculares que variam de 8 a 10 kDa, com alto conteúdo de cisteína podendo apresentar sete pontes dissulfeto, o que confere grande estabilidade à sua estrutura, distribuídas em cerca de 70 a 90 resíduos de aminoácidos (KENNEDY, 1998; QI; SONG; CHI, 2005).

O primeiro inibidor que deu origem a família Bowman-Birk foi purificado de sementes de soja constituído de uma cadeia polipeptídica com dois sítios reativos, um para tripsina e outro para quimotripsina e formado de 71 resíduos de aminoácidos (ODANI; IKENAKA, 1973). No caso da tripsina há presença de Lys ou Arg na posição P1 e para a quimotripsina há presença de um grupo aromático ou um grupo hidrofóbico de cadeia longa (Lin et al., 1993). Os inibidores da família Kunitz são proteínas que apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas, em geral, com apenas um sítio reativo e massa molecular entre 18 e 24 kDa, correspondendo cerca de 180 resíduos de aminoácidos. Eles possuem, geralmente, quatro resíduos de cisteína, que formam duas pontes dissulfeto proporcionando estabilidade a estrutura protéica. A estrutura tridimensional desses inibidores é conhecida como família folha β sendo composta por 12 conformações beta anti-paralelas conectadas por longas alças. O inibidor pode ser dividido em três subdomínios, cada um contendo cerca de 60 resíduos de aminoácidos.

Cada subdomínio consiste de quatro folhas β conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como $A-\beta_1-A-\beta_2-A-\beta_3-A-\beta_4$, em que “A” refere-se às alças que conectam as folhas β . A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família Kunitz é dada pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfeto presentes na estrutura do inibidor. Os IPs da família Kunitz apresentam estruturalmente uma alça de ligação exposta, que é conservada em todos os representantes. Essa estrutura é denominada de conformação canônica. Esses inibidores que apresentam a conformação canônica formam complexos estáveis com as proteinases alvo, os quais se dissociam lentamente. A alça de ligação, embora frequentemente hidrofóbica, é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que flanqueiam o local do sítio reativo e o núcleo do inibidor.

Dentre os principais inibidores sintéticos de serino-proteases estão a benzamidina e a bis-benzamidina. A primeira é uma amina aromática, inibidor sintético competitivo da tripsina. Esta, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de

especificidade, sítio S1 da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico localizado no fundo do bolso do sítio S1, apresentando K_i de 16,6 μM .

A benzamidina é uma molécula modelo para os estudos de interações intermoleculares, por apresentar algumas características estruturais similares aos aminoácidos Arg e Lys. É totalmente protonada no pH fisiológico e também apresenta possibilidade de interações lipofílicas e um grupo amidina equivalente. Derivados da benzamidina são amplamente aplicados em estudos de afinidade de associações enzima-ligante, interações estéricas e, principalmente, eficiência catalítica. Por exemplo, é comprovada a influência de substituintes indutores de elétrons na posição *para* (1,4) do anel benzênico, com os doadores incrementando a associação do inibidor à tripsina e os grupos atraentes agindo em sentido contrário. Um desses derivados da benzamidina é o berenil, uma bis-benzamidina (PEREIRA, 2005).

O berenil é formado por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição 4 de cada anel. A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (PEREIRA, 2005). O berenil comporta-se como um inibidor parcialmente competitivo parabólico da tripsina, apresentando K_i de 1,79 μM (JUNQUEIRA; SILVA; MARES-GUIA, 1992; OLIVEIRA et al., 1993).

Dois novos tipos de inibidores de proteases foram descobertos em sementes, os quais são pequenos peptídeos cíclicos, e foram denominados como “cyclic knottins”. Eles pertencem a uma família diversa de peptídeos cíclicos que se encontram nas plantas das famílias Rubiaceae, Violaceae e Cucurbitaceae (CONNERS et al., 2007).

A sequência peptídica mais promissora é a denominada VhTI isolada a partir da *Veronica hederifolia*. De acordo com Connors et al. (2007), ela é uma potente inibidora de tripsina e tem uma estrutura “helix-turn-helix” o que permitiria modificações para desenhar inibidores específicos de proteases. A sequência da parte ativa da VhTI é composta de 27 resíduos de aminoácidos e contém quatro cisteínas, o que permite, rapidamente, sua polimerização formando pontes de dissulfeto.

3.6. Estresse oxidativo em insetos

O oxigênio é essencial para os processos da vida aeróbica, mas cerca de 1% a 3% ou mais do oxigênio utilizado para fins respiratórios é convertido em espécies reativas de oxigênio (ROS), como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$ por redução univalente de oxigênio (FRIDOVICH, 2004). Assim, as ROS são geradas por organismos vivos aeróbicos durante o curso do metabolismo celular normal. As ROS, quando geradas em concentrações baixas a moderadas, funcionam em vários processos celulares fisiológicos, mas em altas concentrações podem levar a efeitos adversos nos componentes celulares, como modificações de lipídios, proteínas e DNA (BARRY HALLIWELL; JOHN M. C. GUTTERIDGE, 1985).

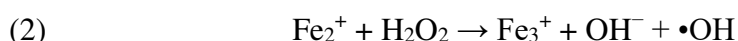
Os efeitos citotóxicos das ROS são geralmente neutralizados por um conjunto complexo de mecanismos de eliminação e desintoxicação enzimáticas e não enzimáticas, que evoluíram para combater os efeitos deletérios das ROS. Como tal, há sempre um equilíbrio dinâmico entre a produção de ROS e sua remoção por sistemas antioxidantes. No entanto, quando o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes muda a favor dos oxidantes, ocorre o fenômeno do “estresse oxidativo”, que contribui para muitas condições patológicas nos organismos aeróbicos.

Assim, ROS pode ser definido como um estado em que a oxidação excede os sistemas antioxidantes no organismo, secundária a uma perda de equilíbrio entre eles. Como mencionado anteriormente, tal desregulação da homeostase celular resulta em eventos como peroxidação lipídica, dano proteico, dano oxidativo ao DNA, e também fenômenos de adaptação fisiológica e desregulação da transdução de sinal intracelular.

As ROS podem ser categorizadas em dois grupos: radicais livres e não radicais. Os radicais livres são gerados quando as moléculas acabam tendo um ou mais elétrons desemparelhados que as tornam reativas em um esforço para obter estabilidade. Por outro lado, formas não radicais são geradas quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados.

O principal local para a produção do radical ânion superóxido é a mitocôndria. Durante a respiração aeróbica para geração de trifosfato de adenosina (ATP), os elétrons são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para redução do oxigênio à água. No entanto, durante esse processo, 1% a 3% de todos os elétrons vazam do sistema e produzem radicais de ânion superóxido (FRIDOVICH, 2004). Os radicais de ânion superóxido também são gerados durante a atividade fagocítica por leucócitos, monócitos e macrófagos que têm atividade microbicida. As enzimas superóxido dismutases (SOD) convertem o radical ânion

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio gerado pode se difundir facilmente através da membrana plasmática. O peróxido de hidrogênio também é gerado endogenamente pela xantina oxidase, aminoácido oxidase e NADPH oxidase (DUPUY et al., 1991; GRANGER, 1988) em peroxissomos. As reações de Haber-Weiss (1) e Fenton (2) também resultam na quebra de H_2O_2 em OH^- na presença de Fe^{2+} ou Cu^{2+} (THOMAS; DIONYSIOU; PILLAI, 2021):



Além disso, $O_2^{\cdot-}$ por si só também pode reagir com H_2O_2 e gerar OH^- (HABER et al., 1934; LIOCHEV; FRIDOVICH, 2002).

Existem vários oxidantes exógenos que impactam um organismo e levam à geração de ROS dentro de suas células. Um deles é a radiação ionizante. Na presença de oxigênio, a radiação ionizante pode converter radicais hidroxila, radicais ânion superóxido e outros radicais orgânicos em peróxido de hidrogênio e organoperóxidos. A reação dessas espécies de hidroperóxidos com íons metálicos redox ativos, como Fe e Cu via reações de Fenton, leva à indução de ROS (BIAGLOW; MITCHELL; HELD, 1992; CHIU et al., 1993).

A exposição ao ozônio pode levar à peroxidação lipídica, uma vez que a exposição de curto prazo causa liberação de mediadores inflamatórios como mieloperoxidase, proteínas catiônicas eosinofílicas e também lactato desidrogenase e albumina (HILTERMANN et al., 1999). Íons de metais pesados como ferro, cobre, cádmio, mercúrio, níquel, chumbo e arsênico também podem induzir a geração de ROS e levar a danos celulares.

Um importante mecanismo de geração de radicais livres catalisada por metal é através das reações do tipo Fenton descritas acima. Além das reações de Fenton e Haber-Weiss, certos íons metálicos podem interagir diretamente com moléculas celulares para gerar radicais livres, como radicais tiol, ou induzir vias de sinalização celular. Esses radicais também podem reagir com outras moléculas de tiol para gerar $O_2^{\cdot-}$. Além disso, $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 , o que causa geração adicional de radicais de oxigênio. Por fim e mais importante para o nosso propósito, os pesticidas. A extensa literatura sugere que as ROS são continuamente geradas a partir da exposição a contaminantes ambientais, como herbicidas e inseticidas (BAGCHI et al., 1995; LEDIRAC et al., 2005).

Os insetos estão expostos a vários estressores ambientais em uma variedade de habitats devido à sua capacidade de colonizar vários nichos ecológicos. Assim, os insetos, como outros organismos, estão sujeitos a ROS quando expostos a herbicidas e inseticidas (AHMAD, 1995)

e também durante a alimentação (especialmente insetos fitófagos e hematófagos) (BI; FELTON, 1995; SOUZA et al., 1997). Além disso, flutuações térmicas de baixa temperatura e exposição a UV também promovem ROS e levam a ROS em insetos (KARTHI; SANKARI; SHIVAKUMAR, 2014; LALOUETTE et al., 2011; MENG et al., 2009). Para combater os efeitos das ROS, os insetos desenvolveram um conjunto de mecanismos de defesa antioxidantes que envolvem componentes enzimáticos e não enzimáticos. No entanto, os mecanismos regulatórios por trás do desencadeamento e atividade sustentada dos sistemas antioxidantes são pouco conhecidos. Os neuro-hormônios de insetos são um dos principais candidatos que poderiam desempenhar tais papéis reguladores (PERIC-MATARUGA; NENADOVIC; IVANOVIC, 2006).

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Sami. Oxidative stress from environmental pollutants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 135–157, 1995. DOI: 10.1002/arch.940290205. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.940290205>. Acesso em: 2 fev. 2022.
- AHN, Ji Eun; ZHU-SALZMAN, Keyan. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 678–685, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.04.016.
- AINSWORTH, Elizabeth A.; YENDREK, Craig R.; SKONECZKA, Jeffrey A.; LONG, Stephen P. Accelerating yield potential in soybean: Potential targets for biotechnological improvement. **Plant, Cell and Environment**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 38–52, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02378.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689112/>. Acesso em: 30 maio. 2022.
- ALGHAMDI, Salem S.; KHAN, Muhammad A.; EL-HARTY, Ehab H.; AMMAR, Megahed H.; FAROOQ, Muhammad; MIGDADI, Hussein M. Comparative phytochemical profiling of different soybean (*Glycine max* (L.) Merr) genotypes using GC–MS. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 15–21, 2018. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.10.014.
- ALMQUIST, H. J.; MERRITT, J. B. Effect of soybean antitrypsin on experimental amino acid deficiency in the chick. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 450–453, 1951. DOI: 10.1016/0003-9861(51)90161-0.
- ALMQUIST, H. J.; MERRITT, J. B. Accentuation of Dietary Amino Acid Deficiency by Raw Soybean Growth Inhibitor. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 333–334, 1953. DOI: 10.3181/00379727-84-20637. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-84-20637>. Acesso em: 2 jun. 2022.
- AMENT, Kai; KANT, Merijn R.; SABELIS, Maurice W.; HARING, Michel A.; SCHUURINK, Robert C. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 135, n. 4, p. 2025–2037, 2004. DOI: 10.1104/pp.104.048694. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/135/4/2025/6112118>. Acesso em: 28 maio. 2022.

AMIL-RUIZ, Francisco; BLANCO-PORTALES, Rosario; MUÑOZ-BLANCO, Juan; CABALLERO, José L. The strawberry plant defense mechanism: A molecular review. **Plant and Cell Physiology**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 1873–1903, 2011. DOI: 10.1093/pcp/pcr136. Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article/52/11/1873/1832591>. Acesso em: 31 maio. 2022.

ANDERSON, Edwin J. et al. Soybean [Glycine max (L.) Merr.] breeding: History, improvement, production and future opportunities. **Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes**, [S. l.], v. 7, p. 431–516, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-23400-3_12. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-23400-3_12. Acesso em: 30 maio. 2022.

ASHOURI, Shabnam; FARSHBAF POUR ABAD, Reza; ZIHNIOGLU, Figen; KOCADAG, Ebru. Extraction and purification of protease inhibitor(s) from seeds of Helianthus annuus with effects on Leptinotarsa decemlineata digestive cysteine protease. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 9, p. 113–119, 2017. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.12.005.

AWASTHI, A. K. Studies on insect-pests of soybean (Glycine max) with special reference to seasonal incidence of lepidopteran defoliators Studies on insect-pests of soybean (Glycine max) with special reference to seasonal incidence of lepidopteran defoliators. [S. l.], v. 7, n. January, p. 1808–1811, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/330982283>. Acesso em: 28 maio. 2022.

BABIN, Aurélie; LEMAUF, Séverine; REBUF, Christian; POIRIÉ, Marylène; GATTI, Jean-Luc. Effects of Bacillus thuringiensis kurstaki bioinsecticide on two non-target Drosophila larval endoparasitoid wasps. **Entomologia Generalis**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1127/entomologia/2022/1452.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, [S. l.], v. 104, n. 1–3, p. 129–140, 1995. DOI: 10.1016/0300-483X(95)03156-A.

BARRY HALLIWELL; JOHN M. C. GUTTERIDGE. Free Radicals in Biology and Medicine Related papers Gamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapent aenoic acid as pot ent ial ant icancer dr... Undurt i Das Tumoricidal and Ant i-Angiogenic Act ions of Gamma-

Linolenic Acid and Its Derivatives. **Academia**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 331–334, 1985. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50287696/0748-5514_2885_2990140-020161113-11423-1hepthj-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1648699204&Signature=JmCAXj6CYPan96W0MzwNwsMq47eukoZpeLt3PHwoalE7BBBCbQsV0xng2Q4FrP6wRQ5DqUY~bFNWILVdrLTLZkI1xzV62P3I8ehzijWScP7gO. Acesso em: 2 fev. 2022.

BEL, Yolanda; SHEETS, Joel J.; TAN, Sek Yee; NARVA, Kenneth E.; ESCRICHE, Baltasar. Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis* (*Pseudoplusia*) includens. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 83, n. 11, 2017. DOI: 10.1128/AEM.00326-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.00326-17>. Acesso em: 28 maio. 2022.

BI, J. L.; FELTON, G. W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 1511–1530, 1995. DOI: 10.1007/BF02035149. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02035149>. Acesso em: 2 fev. 2022.

BIAGLOW, John E.; MITCHELL, James B.; HELD, Katherine. The importance of peroxide and superoxide in the X-ray response. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 665–669, 1992. DOI: 10.1016/0360-3016(92)90499-8.

BISHOP, Kristen A.; BETZELBERGER, Amy M.; LONG, Stephen P.; AINSWORTH, Elizabeth A. Is there potential to adapt soybean (*Glycine max* Merr.) to future [CO₂]? An analysis of the yield response of 18 genotypes in free-air CO₂ enrichment. **Plant Cell and Environment**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1765–1774, 2015. DOI: 10.1111/pce.12443. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25211487/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

BORTOLI, Sergio Antonio De; MURATA, Afonso Takao; BORTOLI, Caroline Placidi De; MAGALHÃES, Gustavo Oliveira De; DIBELLI, Wanderlei. Nutritional aspects and larvae preference of *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) on damaged and undamaged soybean cultivars. **Comunicata Scientiae**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 149–155, 2011. DOI: 10.14295/CS.V2I3.17. Disponível em: <https://www.comunicatascientiae.com.br/comunicata/article/view/17>. Acesso em: 28 maio.

2022.

BORTOLOTTO, Orcial Ceolin; POMARI-FERNANDES, Aline; BUENO, Regiane Cristina Oliveira de Freitas; BUENO, Adeney de Freitas; CRUZ, Ynaiara K. S. Da; SANZOVO, Alisson; FERREIRA, Rosenilda B. The use of soybean integrated pest management in Brazil: a review. **Agronomy Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 25, 2015. DOI: 10.33158/asb.2015v1i1p25. Disponível em: www.asbjournal.com Freely available online. Acesso em: 27 maio. 2021.

BÖTTNER, Laura; GRABE, Veit; GABLENZ, Saskia; BÖHME, Niklas; APPENROTH, Klaus J.; GERSHENZON, Jonathan; HUBER, Meret. Differential localization of flavonoid glucosides in an aquatic plant implicates different functions under abiotic stress. **Plant Cell and Environment**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 900–914, 2021. DOI: 10.1111/pce.13974. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pce.13974>. Acesso em: 6 abr. 2021.

BOWN, David P.; WILKINSON, Hillary S.; GATEHOUSE, John 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**, [S. l.], v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 278–290, 2004. DOI: 10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x>. Acesso em: 10 jun. 2022.

BRANDON, David L.; BATES, Anne H.; FRIEDMAN, Mendel. Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay of the Bowman-Birk Protease Inhibitor of Soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 1192–1196, 1989. DOI: 10.1021/jf00088a082. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00088a082>. Acesso em: 2 fev. 2022.

BRANDON, David L.; FRIEDMAN, Mendel. Immunoassays of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 50, n. 22, p. 6635–6642, 2002. DOI: 10.1021/jf020186g. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020186g>. Acesso em: 2 fev. 2022.

BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 827–833, 1986. DOI: 10.1016/0022-1910(86)90097-1. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191086900971>. Acesso em: 24 mar. 2022.

BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-020-00792-9>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CHEN, Bosheng; ZHANG, Nan; XIE, Sen; ZHANG, Xiancui; HE, Jintao; MUHAMMAD, Abrar; SUN, Chao; LU, Xingmeng; SHAO, Yongqi. Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides. **Environment International**, [S. l.], v. 143, p. 105886, 2020. DOI: 10.1016/j.envint.2020.105886.

CHEN, Chun Yu; MAO, Ying Bo. Research advances in plant-insect molecular interaction. **F1000Research**, [S. l.], v. 9, 2020. DOI: 10.12688/f1000research.21502.1. Disponível em: </pmc/articles/PMC7096218/>. Acesso em: 31 maio. 2022.

CHEN, Kuan I.; ERH, Mei Hui; SU, Nan Wei; LIU, Wen Hsiung; CHOU, Cheng Chun; CHENG, Kuan Chen. Soyfoods and soybean products: From traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 9–22, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4330-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4330-7>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CHIU, Song mao; XUE, Liang yan; FRIEDMAN, Libby R.; OLEINICK, Nancy L. Copper Ion-Mediated Sensitization of Nuclear Matrix Attachment Sites to Ionizing Radiation. **Biochemistry**, [S. l.], v. 32, n. 24, p. 6214–6219, 1993. DOI: 10.1021/bi00075a014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00075a014>. Acesso em: 2 fev. 2022.

CHOE, Ungyong; CHOE, Song Gun; PAK, Song Jin; MAENG, Hang Ryol; KIM, Chol; KANG, Kyong Ju; CHOE, Ungho; SHENG, Kuichuan. Production of *Bacillus Thuringiensis* Bioinsecticide Using *Penicillium* Fermentation Waste and Application in Agriculture. **SSRN Electronic Journal**, [S. l.], 2022. DOI: 10.2139/ssrn.4051211. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=4051211>. Acesso em: 30 maio. 2022.

COLUSSI, Joana; MORGAN, Eric L.; SCHNITKEY, Gary D.; PADULA, Antônio D. How Communication Affects the Adoption of Digital Technologies in Soybean Production: A

Survey in Brazil. **Agriculture (Switzerland)**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 611, 2022. DOI: 10.3390/agriculture12050611. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/12/5/611/htm>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CONNERS, Rebecca; KONAREV, Alexander V.; FORSYTH, Jane; LOVEGROVE, Alison; MARSH, Justin; JOSEPH-HORNE, Timothy; SHEWRY, Peter; BRADY, R. Leo. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica* (*Veronica hederifolia* L.). **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 38, p. 27760–27768, 2007. DOI: 10.1074/jbc.M703871200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820586729/fulltext>. Acesso em: 2 fev. 2022.

COTABARREN, Juliana; LUFRANO, Daniela; PARISI, Mónica Graciela; OBREGÓN, Walter David. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, [S. l.], v. 292, p. 110398, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945219315717>. Acesso em: 31 mar. 2021.

COURA, Roberta Ribeiro et al. Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 180, n. 3, p. 383–397, 2022. DOI: 10.1111/aab.12740. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12740>. Acesso em: 18 nov. 2021.

CRISTIAN YIZARD LIZARDO CHAVEZ. Efeito dos inibidores de proteases benzamidas nas respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da cochonilha *Coccus viridi*. [S. l.], p. 75, 2016. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/9098>. Acesso em: 29 jan. 2022.

DA GRAÇA, José P. et al. The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug, *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 131, p. 84–91, 2016. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.08.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942216301820>. Acesso em: 28 maio. 2022.

DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael;

FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; DE OLIVEIRA, Eugênio E.; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21631, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21631>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DARRAG, Hossam Moustafa; ALMUHANNA, Hani Taher; HAKAMI, Emadaldeen Hamad. Secondary Metabolites in Basil, Bio-Insecticide, Inhibition Effect, and In Silico Molecular Docking against Proteolytic Enzymes of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). **Plants**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1087, 2022. DOI: 10.3390/plants11081087. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/8/1087/htm>. Acesso em: 30 maio. 2022.

DAVID, Michael D. The potential of pro-insecticides for resistance management. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 8, p. 3631–3636, 2021. DOI: 10.1002/ps.6369. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6369>. Acesso em: 31 maio. 2022.

DE ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; DE OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V.; RAMOS, Humberto J. O.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6191>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L. R. PLANT-PIs: A database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 347–348, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.347. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/30/1/347/1332111>. Acesso em: 2 jun. 2021.

DE MENDONÇA, Eduardo Gomes; VISÔTTO, Liliane Evangelista; COSTA, Natália Cristina Santos; RIBEIRO, Fabrício Rainha; DE OLIVEIRA, Joel Antônio; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 446–454, 2011. DOI: 10.1590/s1413-70542011000300002. Disponível em:

[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542011000300002&script=sci_arttext&tlng=pt)

70542011000300002&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 25 mar. 2021.

DE OLIVEIRA, Giordani et al. Inhibitory effects of tripeptides to enzymatic activity and life cycle parameters of *Anticarsia gemmatalis*. **Phytoparasitica**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 823–831, 2020. DOI: 10.1007/s12600-020-00837-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12600-020-00837-0>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DE QUEIROZ, Ana Paula; COSTA, Cintia Oliveira; FAVETTI, Bruna Magda; SILVA, Gabriela Vieira; DE FREITAS BUENO, Adeney. Effects of parasitoid and host age on the parasitism of *Trichogramma pretiosum* on eggs of *Anticarsia gemmatalis*. **Revista Brasileira de Entomologia**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 2020, 2020. DOI: 10.1590/1806-9665-RBENT-2019-105. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbent/a/fpvdv6B7xCrJNCsVZjFW9YS/abstract/?lang=en>. Acesso em: 30 maio. 2022.

DEGUINE, Jean Philippe; AUBERTOT, Jean Noël; FLOR, Rica Joy; LESCOURRET, Françoise; WYCKHUYS, Kris A. G.; RATNADASS, Alain. Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 1–35, 2021. DOI: 10.1007/s13593-021-00689-w. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-021-00689-w>. Acesso em: 31 maio. 2022.

DIAMOND, Jared. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, [S. l.], v. 418, n. 6898, p. 700–707, 2002. DOI: 10.1038/nature01019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01019>. Acesso em: 30 maio. 2022.

DUNAEVSKY, Ya E.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K. S.; BELOZERSKY, M. A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. . jul. 2005, 4, p. 608–613.

DUPUY, C.; VIRION, A.; OHAYON, R.; KANIEWSKI, J.; DEME, D.; POMMIER, J. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 266, n. 6, p. 3739–3743, 1991. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)67857-9.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 3–8, 2005. DOI:

10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>. Acesso em: 6 maio. 2022.

EREMIA, Mihaela Carmen; LUPESCU, Irina; TCACENCO, Luminita. Bioactive compounds obtained by immobilisation of serine protease inhibitors. **International Journal of Nano and Biomaterials**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 335–343, 2011. DOI: 10.1504/IJNBM.2011.045884.

EVENSON, R. E.; GOLLIN, D. Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. **Science**, [S. l.], v. 300, n. 5620, p. 758–762, 2003. DOI: 10.1126/science.1078710. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1078710>. Acesso em: 30 maio. 2022.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 87, n. 19, p. 7713–7716, 1990. DOI: 10.1073/pnas.87.19.7713. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/87/19/7713>. Acesso em: 9 jun. 2021.

FARMER, Edward E.; JOHNSON, Russell R.; RYAN, Clarence A. **Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid** *Plant Physiology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1104/pp.98.3.995. Disponível em: <https://plantphysiol.org>. Acesso em: 25 mar. 2021.

FARMER, Edward E.; RYAN, Clarence A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 129–134, 1992. DOI: 10.2307/3869566. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3869566?origin=crossref>.

FEUSSNER, Ivo; WASTERNAK, Claus. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 275–297, 2002. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>. Acesso em: 28 maio. 2022.

FIAZ, Muhammad; MARTÍNEZ, Luis Carlos; PLATA-RUEDA, Angelica; GONÇALVES, Wagner Gonzaga; SHAREEF, Muhammad; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis*

(Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Chemosphere**, [S. l.], v. 212, p. 337–345, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.088.

FLETCHER, Stephen J.; REEVES, Philip T.; HOANG, Bao Tram; MITTER, Neena. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 11, p. 51, 2020. DOI: 10.3389/FPLS.2020.00051/BIBTEX.

FOERSTER, Luís A.; BUTNARIU, Alessandra R. Development, reproduction, and longevity of *Telenomus cyamophylax*, egg parasitoid of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, in relation to temperature. **Biological Control**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 1–4, 2004. DOI: 10.1016/S1049-9644(03)00133-6.

FRIDOVICH, Irwin. Mitochondria: Are they the seat of senescence? **Aging Cell**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 13–16, 2004. DOI: 10.1046/j.1474-9728.2003.00075.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1474-9728.2003.00075.x>. Acesso em: 2 fev. 2022.

FUGI, Cristina Gomes Quevedo; LOURENÇÃO, André Luiz; PARRA, José Roberto Postali. Biologia de *anticarsia gemmatalis* em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos. **Scientia Agricola**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 31–35, 2005. DOI: 10.1590/S0103-90162005000100006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/sa/a/f98vpfXTvbFMtt7GvLCr6jD/?format=html&lang=en>. Acesso em: 6 abr. 2021.

GODFREY, Kris E.; WHITCOMB, Willard H.; STIMAC, Jerry L. Arthropod Predators of Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), Eggs and Larvae. **Environmental Entomology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 118–123, 1989. DOI: 10.1093/ee/18.1.118. Disponível em: <https://academic.oup.com/ee/article/18/1/118/2393527>. Acesso em: 30 maio. 2022.

GÓMEZ, Jenny D. et al. Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 155, p. 196–212, 2020. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.07.010.

GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, New York, NY, v. 255, n. 6, p. 81–88, 1988. DOI: 10.1152/ajpheart.1988.255.6.h1269. Disponível em:

<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpheart.1988.255.6.H1269>. Acesso em: 2 fev. 2022.

GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. **Science**, [S. l.], v. 175, n. 4023, p. 776–777, 1972. DOI: 10.1126/science.175.4023.776. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/175/4023/776>. Acesso em: 5 jul. 2021.

GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40011-016-0732-0>. Acesso em: 28 maio. 2022.

GUO, Zhimin; GUO, Ziping; GAO, Jingyao; HUANG, Guoyu; WAN, Hu; HE, Shun; XIE, Yuanli; LI, Jianhong; MA, Kangsheng. Detection of insecticide susceptibility and target-site mutations in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Pest Management**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1080/09670874.2022.2050835. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670874.2022.2050835>. Acesso em: 30 maio. 2022.

GUZMÁN-PLAZOLA, Paulina; GUEVARA-GUTIÉRREZ, Rubén Darío; OLGUÍN-LÓPEZ, José Luis; MANCILLA-VILLA, Oscar Raúl. Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. **Idesia**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 69–80, 2016. DOI: 10.4067/S0718-34292016000300009.

HABER, F.; WEISS, J.; SEPH, J. O.; EISS, W. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences**, [S. l.], v. 147, n. 861, p. 332–351, 1934. DOI: 10.1098/rspa.1934.0221. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspa.1934.0221>. Acesso em: 2 fev. 2022.

HABIB, Huma; FAZILI, Khalid Majid. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 68–85, 2007. DOI: ISSN

1538-2273. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/8EB195410993>. Acesso em: 24 jun. 2020.

HACISALIHOGU, Gokhan; GUSTIN, Jeffery L.; LOUISMA, Jean; ARMSTRONG, Paul; PETER, Gary F.; WALKER, Alejandro R.; SETTLES, A. Mark. Enhanced single seed trait predictions in soybean (*Glycine max*) and robust calibration model transfer with near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1079–1086, 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05508. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b05508>. Acesso em: 28 maio. 2022.

HADDI, Khalid; TURCHEN, Leonardo M.; VITERI JUMBO, Luis O.; GUEDES, Raul N. C.; PEREIRA, Eliseu J. G.; AGUIAR, Raimundo W. S.; OLIVEIRA, Eugênio E. Rethinking biorational insecticides for pest management: unintended effects and consequences. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 76, n. 7, p. 2286–2293, 2020. DOI: 10.1002/ps.5837. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.5837>. Acesso em: 31 maio. 2022.

HAHN, Michael G.; CHEONG, Jong-Joo; ALBA, Rob; ENKERLI, Jürg; CÔTÉ, François. Oligosaccharide Elicitors: Structures and Recognition. [S. l.], p. 99–116, 1993. DOI: 10.1007/978-94-011-1737-1_32. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-1737-1_32. Acesso em: 2 jun. 2022.

HAM, W. E.; SANDSTEDT, R. M.; MUSSEHL, F. E. The proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal and its effect upon growth in chicks. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 161, n. 2, p. 635–642, 1945. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)41496-7.

HAQ, Soghra Khatun; ATIF, Shaikh Muhammad; KHAN, Rizwan Hasan. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 431, n. 1, p. 145–159, 2004. DOI: 10.1016/j.abb.2004.07.022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986104004126>. Acesso em: 29 jan. 2022.

HARTMAN, Glen L.; WEST, Ellen D.; HERMAN, Theresa K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 5–17, 2011. DOI: 10.1007/s12571-010-0108-x. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12571-010-0108-x>. Acesso em: 30 maio. 2022.

HEDDEN, Peter. The genes of the Green Revolution. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 5–9, 2003. DOI: 10.1016/S0168-9525(02)00009-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12493241/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

HILTERMANN, Jeroen T. N.; LAPPERRE, Therese S.; VAN BREE, Leendert; STEERENBERG, Peter A.; BRAHIM, Joey J.; SONT, Jaap K.; STERK, Peter J.; HIEMSTRA, Pieter S.; STOLK, Jan. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: A new noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 11–12, p. 1448–1454, 1999. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00191-4.

HIROSHI, Marcelo; JOELSIO, Hirakuri; LAZZAROTTO, José. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Soja Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **infoteca.cnptia.embrapa.br**, [S. l.], 2014. Disponível em: www.embrapa.br/soja. Acesso em: 26 jun. 2020.

HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; NETO, José Augusto Ramos; DE OLIVEIRA, Maria Cristina Neves; OLIVEIRA, Lenita Jacob. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 1453–1459, 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006001000001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006001000001&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 6 abr. 2021.

HOROWITZ, A. Rami; GHANIM, Murad; RODITAKIS, Emmanouil; NAUEN, Ralf; ISHAAYA, Isaac. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. **Journal of Pest Science**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 893–910, 2020. DOI: 10.1007/s10340-020-01210-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-020-01210-0>. Acesso em: 24 nov. 2021.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho; NAKATANI, André Shigueyoshi; DOS REIS-JUNIOR, Fábio Bueno; MORAIS, José Zucca; DE OLIVEIRA, Maria Cristina Neves; FERNANDES, Marcelo Ferreira. Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. **Field Crops Research**, [S. l.], v. 158, p. 43–54, 2014. DOI: 10.1016/j.fcr.2013.12.022.

IQBAL, Zahra; IQBAL, Mohammed Shariq; HASHEM, Abeer; ABD_ALLAH, Elsayed Fathi; ANSARI, Mohammad Israil. Plant Defense Responses to Biotic Stress and Its Interplay With Fluctuating Dark/Light Conditions. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 12, p. 297, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.631810.

JONES, Anne C.; FELTON, Gary W.; TUMLINSON, James H. The dual function of elicitors and effectors from insects: reviewing the ‘arms race’ against plant defenses. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], p. 1–19, 2021. DOI: 10.1007/s11103-021-01203-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-021-01203-2>. Acesso em: 31 maio. 2022.

JONGSMA, Maarten A.; BOLTER, Caroline. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 885–895, 1997. DOI: 10.1016/S0022-1910(97)00040-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191097000401>. Acesso em: 31 mar. 2021.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 873–887, 1992. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1342833>. Acesso em: 24 ago. 2021.

KARGES, Kathleen; BELLINGRATH-KIMURA, Sonoko D.; WATSON, Christine A.; STODDARD, Frederick L.; HALWANI, Mosab; RECKLING, Moritz. Agro-economic prospects for expanding soybean production beyond its current northerly limit in Europe. **European Journal of Agronomy**, [S. l.], v. 133, p. 126415, 2022. DOI: 10.1016/j.eja.2021.126415.

KARTHI, Sengodan; SANKARI, R.; SHIVAKUMAR, Muthugounder S. Ultraviolet-B light induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Spodoptera litura*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 135, p. 1–6, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.008.

KENNEDY, Ann R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *In*: AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION 1998, **Anais** [...]. : American Society for Nutrition, 1998. p. 1406S-1412S. DOI: 10.1093/ajcn/68.6.1406S. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/68/6/1406S/4666224>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KLOSE, A. A.; HILL, Barbara; FEVOLD, H. L. Presence of a Growth Inhibiting Substance in

Raw Soybeans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 10–12, 1946. DOI: 10.3181/00379727-62-15353. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-62-15353>. Acesso em: 2 jun. 2022.

KNEEN, Eric; SANDSTEDT, R. M. An amylase inhibitor from certain cereals. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 1247, 1943. DOI: 10.1021/ja01246a512. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01246a512>. Acesso em: 2 fev. 2022.

KODRÍK, Dalibor; BEDNÁŘOVÁ, Andrea; ZEMANOVÁ, Milada; KRISHNAN, Natraj. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 25788–25817, 2015. DOI: 10.3390/ijms161025788. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/25788/htm>. Acesso em: 2 jun. 2022.

KOIWA, Hisashi; BRESSAN, Ray A.; HASEGAWA, Paul M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 379–384, 1997. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01107-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138597011072>. Acesso em: 16 jun. 2021.

KRINSKI, Diones; FOERSTER, Luís Amilton; DESCHAMPS, Cicero. Efeito ovicida de óleos essenciais de 18 espécies Brasileiras de piper: Controlando *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) no estágio inicial de desenvolvimento. **Acta Scientiarum - Agronomy**, [S. l.], v. 40, n. 1, 2018. DOI: 10.4025/actasciagron.v40i1.35273. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/asagr/a/qwJkqBVb6LYLGT8bRxGrYpx/?lang=en&format=html>. Acesso em: 28 maio. 2022.

KUMAGAI, Etsushi; AOKI, Naohiro; MASUYA, Yusuke; SHIMONO, Hiroyuki. Phenotypic plasticity conditions the response of soybean seed yield to elevated atmospheric CO₂ concentration. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 169, n. 3, p. 2021–2029, 2015. DOI: 10.1104/pp.15.00980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373658/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

KUMAR, Jitendra; RAMLAL, Ayyagari; MALLICK, Dharmendra; MISHRA, Vachaspati. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. **Plants**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1185, 2021. DOI: 10.3390/plants10061185. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/6/1185/htm>. Acesso em: 31 maio. 2022.

KUMAR, Santosh; ABEDIN, Md. Minhajul; SINGH, Ashish Kumar; DAS, Saurav. Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. **Plant Phenolics in Sustainable Agriculture**, [S. l.], p. 517–532, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-4890-1_22. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-4890-1_22. Acesso em: 31 maio. 2022.

KUNITZ, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, [S. l.], v. 101, n. 2635, p. 668–669, 1945. DOI: 10.1126/science.101.2635.668. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.101.2635.668>. Acesso em: 2 fev. 2022.

KUZELA, Stefan; GOLDBERG, Alfred L. Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 244, p. 376–383, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799444028X>. Acesso em: 29 jan. 2022.

LAFLEN, J. M.; MOLDENHAUER, W. C. Soybean Production and Soil Erosion Problems-North America. **World Soybean Research Conference III: Proceedings**, [S. l.], p. 1166–1174, 2022. DOI: 10.1201/9780429267932-190. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429267932-190/soybean-production-soil-erosion-problems-north-america-laflen-moldenhauer>. Acesso em: 30 maio. 2022.

LALOUETTE, L.; WILLIAMS, C. M.; HERVANT, F.; SINCLAIR, B. J.; RENAULT, D. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 158, n. 2, p. 229–234, 2011. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.11.007.

LAWRENCE, Paulraj K.; KOUNDAL, Kripa Ram. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 93–109, 2002. DOI: 10.2225/vol5-issue1-fulltext-3. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582002000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=n. Acesso em: 2 fev. 2022.

LEDIRAC, Nathalie; ANTHERIEU, Sebastian; D'UBUY, Anne Dupuy; CARON, Jean Claude; RAHMANI, Roger. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: Key role of reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 86, n. 2, p. 444–452, 2005. DOI: 10.1093/toxsci/kfi192. Disponível em:

<https://academic.oup.com/toxsci/article/86/2/444/1653598>. Acesso em: 2 fev. 2022.

LEVY, Sheila M.; FALLEIROS, Ângela M. F.; MOSCARDI, Flávio; GREGÓRIO, Elisa A.; TOLEDO, Luis A. Estudo morfológico do intestino posterior em larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 427–431, 2004. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000400005.

LI, Zenglu; QIU, Lijuan; THOMPSON, Jeffery A.; WELSH, Molly M.; NELSON, Randall L. Molecular genetic analysis of U.S. and Chinese soybean ancestral lines. **Crop Science**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 1330–1336, 2001. DOI: 10.2135/cropsci2001.4141330x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2135/cropsci2001.4141330x>. Acesso em: 30 maio. 2022.

LI, Zhong feng; GUO, Yong; OU, Lin; HONG, Huilong; WANG, Jun; LIU, Zhang xiong; GUO, Bingfu; ZHANG, Lijuan; QIU, Lijuan. Identification of the dwarf gene GmDW1 in soybean (*Glycine max* L.) by combining mapping-by-sequencing and linkage analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 131, n. 5, p. 1001–1016, 2018. DOI: 10.1007/s00122-017-3044-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-017-3044-8>. Acesso em: 28 maio. 2022.

LIENER, I. E.; DEUEL, H. J.; FEVOLD, H. L. The effect of supplemental methionine on the nutritive value of diets containing concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **The Journal of nutrition**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 325–339, 1949. DOI: 10.1093/jn/39.3.325. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/39/3/325/4727716>. Acesso em: 2 jun. 2022.

LIN, Guangda; BODE, Wolfram; HUBER, Robert; CHI, Chengwu; ENGH, Richard A. The 0.25-nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 212, n. 2, p. 549–555, 1993. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17692.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17692.x>. Acesso em: 2 fev. 2022.

LIOCHEV, Stefan I.; FRIDOVICH, Irwin. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: An alternative view [1]. **Redox Report**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 55–57, 2002. DOI: 10.1179/135100002125000190. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/135100002125000190>. Acesso em: 2 fev. 2022.

LIU, Xiaoman; CAO, Aocheng; YAN, Dongdong; OUYANG, Canbin; WANG, Qiuxia; LI, Yuan. Overview of mechanisms and uses of biopesticides. **International Journal of Pest Management**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 65–72, 2021. DOI: 10.1080/09670874.2019.1664789. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670874.2019.1664789>. Acesso em: 31 maio. 2022.

LIU, Yilin; SALZMAN, Ron A.; PANKIW, Tanya; ZHU-SALZMAN, Keyan. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 1069–1077, 2004. DOI: 10.1016/j.ibmb.2004.06.010.

LUIZ, Paulo; SILVA, D. A. Resposta fitoquímica de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatilis* e desenvolvimento do inseto alimentado com cultivares resistentes e susceptíveis. [S. l.], p. 68, 2015. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/6470>. Acesso em: 29 jan. 2022.

LUO, Zhuxing; YANG, Jinhong; ZHANG, Jie; MENG, Gang; LU, Qingjun; YANG, Xi; ZHAO, Ping; LI, Youshan. Physicochemical Properties and Elimination of the Activity of Anti-Nutritional Serine Protease Inhibitors from Mulberry Leaves. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 1820, 2022. DOI: 10.3390/molecules27061820. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/6/1820/htm>. Acesso em: 2 jun. 2022.

LYMAN, R. L.; LEPKOVSKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. **The Journal of nutrition**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 269–284, 1957. DOI: 10.1093/jn/62.2.269. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/62/2/269/4777157>. Acesso em: 2 jun. 2022.

MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; FREIRE, Maria das Graças Machado; FRANCO, Octávio Luiz; MIGLIOLO, Ludovico; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 158, n. 2, p. 164–172, 2011. DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.11.005.

MAFFEI, Massimo E.; MITHÖFER, Axel; BOLAND, Wilhelm. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 68, n. 22–24, p. 2946–2959, 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.07.016. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942207004724>. Acesso em: 16 jun. 2021.

MAGRINI, Eliana Aparecida; BOTELHO, Paulo Sérgio Machado; SILVEIRA NETO, Sinval. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Scientia Agricola**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 547–555, 1999. DOI: 10.1590/s0103-90161999000300006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/sa/a/KFMXwcDDsMgryFnBbxryf8g/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 28 maio. 2022.

MAINKAR, Pawan S.; SHARMA, Manju; AGARWAL, Yamini; GUPTA, Vijay K.; KANSAL, Rekha. Potential and Perspective of Plant Proteinase Inhibitor Genes in Genetic Improvement of Economically Important Crops. **Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends**, [S. l.], p. 281–304, 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-2339-4_12. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-2339-4_12. Acesso em: 2 jun. 2022.

MALIK, Nurul Azmina Abdul; KUMAR, Ilakiya Sharanee; NADARAJAH, Kalaivani. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 963, 2020. DOI: 10.3390/ijms21030963. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/963/htm>. Acesso em: 31 maio. 2022.

MAMUR, Sevcan; GÜNDÜZER, Esra; YAMAN, Melek. Toxicological aspect of bioinsecticide pyrethrum extract and expressions of apoptotic gene levels in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 373–384, 2022. DOI: 10.1080/15376516.2022.2057266. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15376516.2022.2057266>. Acesso em: 30 maio. 2022.

MARTEL, Catherine et al. Tomato whole genome transcriptional response to *Tetranychus urticae* Identifies divergence of spider mite-induced responses between tomato and *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 343–361, 2015. DOI: 10.1094/MPMI-09-14-0291-FI. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0291-FI>. Acesso em: 9 jun. 2021.

MARTINS PILON, Anderson; GORETI ALMEIDA OLIVEIRA, Maria; MARTINS PILON, Franciny; CARVALHO GUEDES, Raul Narciso; OLIVEIRA, Joel Antônio; FAZOLLO,

Anderson. Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 744–748, 2009.

MASSAROLLI, Angélica; HOFFMANN, Ana Regina Lucena; FAVETTI, Bruna Magda; BUTNARIU, Alessandra Regina. Ichneumonids (Hymenoptera) and Tachinid Flies (Diptera) Associated to Lepidopterans in Soybean Crops. **Journal of Agricultural Science**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 167, 2018. DOI: 10.5539/jas.v10n7p167.

MECH, A.; CHOUDHURY, K. K.; BORA, D. S. Lipoxigenase - trypsin inhibitor activity axis induction in the host plants of muga silkworm, *Antheraea assamensis* Helfer by feeding. **Entomological Research**, [S. l.], v. 51, n. 10, p. 509–517, 2021. DOI: 10.1111/1748-5967.12543. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1748-5967.12543>. Acesso em: 31 maio. 2022.

MELAN, Melissa A.; DONG, Xinnian; ENDARA, Mirei E.; DAVIS, Keith R.; AUSUBEL, Frederick M.; PETERMAN, T. Kaye. An *Arabidopsis thaliana* lipoxigenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 101, n. 2, p. 441–450, 1993. DOI: 10.1104/pp.101.2.441. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/101/2/441/6065967>. Acesso em: 28 maio. 2022.

MENDONÇA, Eduardo G.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; DA SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Welligton G.; DE OLIVEIRA, Joel A.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21637, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637. Disponível em: *Anticarsia gemmatalis* represents a relevant factor for lowering soybean and other legume crop productivities. Protease inhibitors affect protein degradation and reduce the availability of amino acids, impairing the development and survival of insect pests. Acesso em: 27 maio. 2021.

MENG, Jian Yu; ZHANG, Chang Yu; ZHU, Fen; WANG, Xiao Ping; LEI, Chao Liang. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 588–592, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.03.003.

MERIÑO-CABRERA, Y.; ZANUNCIO, J. C.; DA SILVA, R. S.; SOLIS-VARGAS, M.; CORDEIRO, G.; RAINHA, F. R.; CAMPOS, W. G.; PICANÇO, M. C.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G. Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 236–243, 2018. DOI: 10.1111/aab.12416. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12416>. Acesso em: 9 jun. 2021.

MILANO, Patrícia. Influência da nutrição e temperatura na reprodução de representantes de Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae. **Tese**, Piracicaba, p. 76, 2008. DOI: 10.11606/T.11.2008.TDE-15072008-130840. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-15072008-130840/>. Acesso em: 28 maio. 2022.

MISHRA, Udit Nandan; REDDY, Manushree Venkataswamy; PRASAD, Doddananjappa Theertha. Plant serine protease inhibitor (SPI): A potent player with bactericidal, fungicidal, nematicidal and antiviral properties. **International Journal of Chemical Studies**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 2985–2993, 2020. DOI: 10.22271/chemi.2020.v8.i1at.8724. Disponível em: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1at.8724>. Acesso em: 24 jun. 2021.

MOREIRA, L. F.; CAMPOS, W. G.; RIBEIRO, F. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*). **Crop Protection**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1285–1290, 2011. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.05.023.

MOSCARDI, Flavio; BUENO, Adeney De Freitas; SOSA-GÓMEZ, Daniel Ricardo; ROGGIA, Samuel; HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; POMARI, Aline Farhat; CORSO, Ivan Carlos; YANO, Silvia Akimi Cavaguchi. **Artrópodes que atacam as folhas da soja**. [s.l.] : Brazil: Embrapa Soja, 2012.

MOURTZINIS, Spyridon et al. Climate-induced reduction in US-wide soybean yields underpinned by region-and in-season-specific responses. **Nature Plants**, [S. l.], v. 1, 2015. DOI: 10.1038/nplants.2014.26. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27246761/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

MUKHTAROVA, Lucia S.; LANTSOVA, Natalia V.; KHAIRUTDINOV, Bulat I.;

GRECHKIN, Alexander N. Lipoxygenase pathway in model bryophytes: 12-oxo-9(13),15-phytodienoic acid is a predominant oxylipin in *Physcomitrella patens*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 180, p. 112533, 2020. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112533.

MUSSER, Richard O.; HUM-MUSSER, Sue M.; EICHENSEER, Herb; PEIFFER, Michelle; ERVIN, Gary; MURPHY, J. Brad; FELTON, Gary W. Caterpillar saliva beats plant defences. **Nature**, [S. l.], v. 416, n. 6881, p. 599–600, 2002. DOI: 10.1038/416599a. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/416599a>. Acesso em: 28 maio. 2022.

NELSON, C. E.; WALKER-SIMMONS, M.; MAKUS, D.; ZUROSKE, G.; GRAHAM, J.; RYAN, C. A. Regulation of Synthesis and Accumulation of Proteinase Inhibitors in Leaves of Wounded Tomato Plants. *In*: [s.l: s.n.]. p. 103–122. DOI: 10.1021/bk-1983-0208.ch006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1983-0208.ch006>. Acesso em: 2 jun. 2022.

NITSAN, Z.; ALUMOT, E. Overcoming the Inhibition of Intestinal Proteolytic Activity Caused By Raw Soybean in Chicks of Different Ages. **The Journal of nutrition**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 179–184, 1964. DOI: 10.1093/jn/84.2.179. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/84/2/179/4777762>. Acesso em: 2 jun. 2022.

NIWIŃSKA, Barbara; WITASZEK, Kamil; NIEDBAŁA, Gniewko; PILARSKI, Krzysztof. Seeds of n-GM soybean varieties cultivated in poland and their processing products as high-protein feeds in cattle nutrition. **Agriculture (Switzerland)**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 174, 2020. DOI: 10.3390/agriculture10050174. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/10/5/174/htm>. Acesso em: 30 maio. 2022.

ODANI, Shoji; IKENAKA, Tokuji. Studies on soybean trypsin inhibitors: VIII. disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 697–715, 1973. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130295. Disponível em: <https://academic.oup.com/jb/article/74/4/697/2185138>. Acesso em: 2 fev. 2022.

OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495904003598>. Acesso em: 27 maio. 2021.

OLIVEIRA, M. G. D. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo- β -trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)74195-7.

ONGARATTO, Sabrina; BALDIN, Edson L. L.; HUNT, Thomas E.; MONTEZANO, Débora G.; ROBINSON, Emily A.; DOS SANTOS, Maria C. Effects of intraguild interactions on *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens* larval fitness and behavior in soybean. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 6, p. 2939–2947, 2021. DOI: 10.1002/ps.6330. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6330>. Acesso em: 29 out. 2021.

OPPERT, Brenda; ELPIDINA, Elena N.; TOUTGES, Michelle; MAZUMDAR-LEIGHTON, Sue. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 280–287, 2010. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.08.001.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. **Serine peptidases: Classification, structure and function** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. DOI: 10.1007/s00018-008-7565-9.

PAIXÃO, Gilson P.; LOURENÇÃO, André L.; SILVA, Camila R.; MENDONÇA, Eduardo G.; SILVA, Paulo L.; OLIVEIRA, Joel A.; ZANUNCIO, José C.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Biochemical responses of *anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 34, p. 8034–8038, 2013. DOI: 10.1021/jf4027603. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf4027603>. Acesso em: 25 mar. 2021.

PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 855–868, 2022. DOI: 10.1002/ps.6659. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6659>. Acesso em: 31 maio. 2022.

PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine- Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.

PATEL, Raj. The Long Green Revolution. **Journal of Peasant Studies**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 1–63, 2013. DOI: 10.1080/03066150.2012.719224. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03066150.2012.719224>. Acesso em: 30 maio. 2022.

PAUDEL, Sulav; LIN, Po An; HOOVER, Kelli; FELTON, Gary W.; RAJOTTE, Edwin G. Asymmetric Responses to Climate Change: Temperature Differentially Alters Herbivore Salivary Elicitor and Host Plant Responses to Herbivory. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 891–905, 2020. DOI: 10.1007/s10886-020-01201-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-020-01201-6>. Acesso em: 31 maio. 2022.

PEARCE, Gregory; MCGINNIS, James; RYAN, C. A. Utilization by Chicks of Half-Cystine from Native and Denatured Proteinase Inhibitor Protein from Potatoes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 160, n. 2, p. 180–184, 1979. DOI: 10.3181/00379727-160-40415. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-160-40415>. Acesso em: 2 jun. 2022.

PEARCE, Gregory; STRYDOM, Daniel; JOHNSON, Scott; RYAN, Clarence A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, [S. l.], v. 253, n. 5022, p. 895–898, 1991. DOI: 10.1126/science.253.5022.895. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.253.5022.895>. Acesso em: 2 jun. 2022.

PEÑA-CORTÉS, H.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.; PRAT, S.; WILLMITZER, L. Signals involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene of potato. **Biochemical Society symposium**, [S. l.], v. 60, p. 143–148, 1994. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/7639773>. Acesso em: 2 jun. 2022.

PEREIRA, Márcio Tadeu. AVALIAÇÃO TERMODINÂMICA COMPLETA DA INTERAÇÃO ENTRE A Beta-TRIPSINA E OS INIBIDORES BENZAMIDINA E BERENIL.

[S. l.], p. 121, 2005. Disponível em: <http://www.repositorio.cdtm.br:8080/jspui/handle/123456789/920>. Acesso em: 2 fev. 2022.

PERIC-MATARUGA, Vesna; NENADOVIC, Vera; IVANOVIC, Jelisaveta. Neurohormones in insect stress: A review. **Archives of Biological Sciences**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 1–12, 2006. DOI: 10.2298/abs0601006p. Disponível em: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0354-46640601006P>. Acesso em: 2 fev. 2022.

PETEK, Marko et al. A complex of genes involved in adaptation of *leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 153–181, 2012. DOI: 10.1002/arch.21017.

PILON, Anderson M.; OLIVEIRA, Maria Goreti A.; GUEDES, Raul Narciso C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 23–29, 2006. DOI: 10.1016/j.pestbp.2005.11.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004835750600023X>. Acesso em: 9 jun. 2021.

PILON, Anderson Martins; BIOQUÍMICA, Resposta; LAGARTA, D. A.; SOJA, D. A.; BIOQUÍMICA, Resposta; LAGARTA, D. A.; SOJA, D. A. Inibidor De Protease Benzamidina E Seus Efeitos No Desenvolvimento Pós-Embrionário Inibidor De Protease Benzamidina E Seus Efeitos No Desenvolvimento Pós-Embrionário. [S. l.], 2004. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/8787>. Acesso em: 29 jan. 2022.

PILON, F. M.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, [S. l.], v. 183, n. 6, p. 735–747, 2013. DOI: 10.1007/s00360-013-0744-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00360-013-0744-5>. Acesso em: 28 jun. 2021.

PILON, Franciny Martins; SILVA, Camila da Rocha; VISÔTTO, Liliane Evangelista; BARROS, Rafael de Almeida; DA SILVA JÚNIOR, Neilier Rodrigues; CAMPOS, Wellington Garcia; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Purification and characterization of trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatalis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. e21407, 2017. DOI: 10.1002/arch.21407. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21407>. Acesso em: 28 jun. 2021.

PLATA-RUEDA, Angelica; FIAZ, Muhammad; BRÜGGER, Bruno Pandelo; CAÑAS, Veronica; COELHO, Rogerio Pereira; ZANUNCIO, José Cola; MARTÍNEZ, Luis Carlos; SERRÃO, José Eduardo. Lemongrass essential oil and its components cause effects on survival, locomotion, ingestion, and histological changes of the midgut in *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. **Toxin Reviews**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 208–217, 2022. DOI: 10.1080/15569543.2020.1861468. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15569543.2020.1861468>. Acesso em: 30 maio. 2022.

PLATA-RUEDA, Angelica; MENEZES, Carlos Henrique Martins De; CUNHA, Weslei dos Santos; ALVARENGA, Thaiany Moreira; BARBOSA, Bruno Franklin; ZANUNCIO, José Cola; MARTÍNEZ, Luis Carlos; SERRÃO, José Eduardo. Side-effects caused by chlorpyrifos in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, [S. l.], v. 259, p. 127530, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127530.

QI, Rui Feng; SONG, Zhan Wu; CHI, Cheng Wu. **Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* John Wiley & Sons, Ltd, , 2005. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x>. Acesso em: 28 jun. 2021.

RANI, Lata; THAPA, Komal; KANOJIA, Neha; SHARMA, Neelam; SINGH, Sukhbir; GREWAL, Ajmer Singh; SRIVASTAV, Arun Lal; KAUSHAL, Jyotsna. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 283, p. 124657, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124657.

RAO, Mala B.; TANKSALE, Aparna M.; GHATGE, Mohini S.; DESHPANDE, Vasanti V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998. DOI: 10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>. Acesso em: 29 jan. 2022.

RAY, Deepak K.; MUELLER, Nathaniel D.; WEST, Paul C.; FOLEY, Jonathan A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8,

n. 6, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066428. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23840465/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

REYMOND, Philippe. Perception, signaling and molecular basis of oviposition-mediated plant responses. **Planta**, [S. l.], v. 238, n. 2, p. 247–258, 2013. DOI: 10.1007/s00425-013-1908-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-013-1908-y>. Acesso em: 28 maio. 2022.

RINCKER, Keith et al. Genetic Improvement of U.S. Soybean in Maturity Groups II, III, and IV. **Crop Science**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 1419–1432, 2014. DOI: 10.2135/cropsci2013.10.0665.

RUIZ-VERA, Ursula M.; SIEBERS, Matthew; GRAY, Sharon B.; DRAG, David W.; ROSENTHAL, David M.; KIMBALL, Bruce A.; ORT, Donald R.; BERNACCHI, Carl J. Global warming can negate the expected CO₂ stimulation in photosynthesis and productivity for soybean grown in the midwestern United States. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 162, n. 1, p. 410–423, 2013. DOI: 10.1104/pp.112.211938. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23512883/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

SANCHES, Márcio Martinello; BENITO, Norton; SOSA-GÓMEZ, Daniel R.; EFIGÊNIA, Cláudia; SILVA, Pereira. Boletim AgMNPV-ChinNPV co-infecção. [S. l.], 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.15821.95203. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/325533873>. Acesso em: 28 maio. 2022.

SARMENTO, Renato Almeida et al. A herbivore that manipulates plant defence. **Ecology Letters**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 229–236, 2011. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01575.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1461-0248.2010.01575.x>. Acesso em: 9 jun. 2021.

SHEN, Wenzhong; ZHANG, Xue; LIU, Jiuer; TAO, Kehan; LI, Chong; XIAO, Shi; ZHANG, Wenqing; LI, Jian Feng. Plant elicitor peptide signalling confers rice resistance to piercing-sucking insect herbivores and pathogens. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 991–1005, 2022. DOI: 10.1111/pbi.13781. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9055822/](https://pmc/articles/PMC9055822/). Acesso em: 31 maio. 2022.

SHIVAJI, Renuka; CAMAS, Alberto; ANKALA, Arunkanth; ENGELBERTH, Jurgen; TUMLINSON, James H.; WILLIAMS, W. Paul; WILKINSON, Jeff R.; LUTHE, Dawn Sywassink. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced

Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 179–191, 2010. DOI: 10.1007/s10886-010-9752-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-010-9752-z>. Acesso em: 16 jun. 2021.

SILVA-JÚNIOR, Neilier R.; CABRERA, Yaremis M.; BARBOSA, Samuel L.; BARROS, Rafael de A.; BARROS, Edvaldo; VITAL, Camilo E.; RAMOS, Humberto J. O.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. e21792, 2021. DOI: 10.1002/arch.21792. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21792>. Acesso em: 13 maio. 2021.

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues; MERIÑO CABRERA, Yaremis Beatriz; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Use of Protease Inhibitors as a Promising Alternative for Pest Control. **Natural Products as Enzyme Inhibitors**, Singapore, p. 137–151, 2022. DOI: 10.1007/978-981-19-0932-0_6. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-19-0932-0_6. Acesso em: 9 maio. 2022.

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues; OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida. Cinética De Inibição Das Proteases Digestivas De *Anticarsia Gemmatalis*. [S. l.], p. 79–95, 2021. DOI: 10.37885/210203132.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; DE SÁ, M. F. G.; SAMUELS, R. I.; ISEJIMA, E. M.; BIFANO, T. D.; ALMEIDA, J. S. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 47, n. 11, p. 1283–1290, 2001. DOI: 10.1016/S0022-1910(01)00115-9.

SILVA, Mauro Tadeu Braga Da; COSTA, Ervandil Corrêa; BOSS, Adriano. Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 601–605, 2003. DOI: 10.1590/s0103-84782003000400002.

SILVA, Vera et al. Collection of human and environmental data on pesticide use in Europe and Argentina: Field study protocol for the SPRINT project. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 11 November, p. e0259748, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0259748. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0259748>. Acesso em: 3 jun.

2022.

SINGH, Priyanka; ARIF, Yamshi; MISZCZUK, Edyta; BAJGUZ, Andrzej; HAYAT, Shamsul. Specific Roles of Lipoxygenases in Development and Responses to Stress in Plants. **Plants**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 979, 2022. DOI: 10.3390/plants11070979. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/7/979/htm>. Acesso em: 31 maio. 2022.

SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, Molecular Biology Research Laboratory, Department of Zoology, Deshbandhu College, University of Delhi, Kalkaji, New Delhi, India. DOI - 10.1111/1744-7917.12641 SRC - Pubmed ID2 - 30230264 FG - 0, v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12641>. Acesso em: 27 maio. 2021.

SOUZA, Aurélio Vicente G.; PETRETSKI, Jorge Hudson; DEMASI, Marilene; BECHARA, E. J. H.; OLIVEIRA, Pedro L. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 1–2, p. 209–214, 1997. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00293-6.

SOUZA CÂNDIDO, Elizabete; PINTO, Michelle Flaviane Soares; PELEGRINI, Patrícia Barbosa; LIMA, Thais Bergamin; SILVA, Osmar Nascimento; POGUE, Robert; GROSSI-DE-SÁ, Maria Fátima; FRANCO, Octavio Luiz. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 3290–3305, 2011. DOI: 10.1096/fj.11-184291. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.11-184291>. Acesso em: 31 maio. 2022.

SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok P.; GUPTA, Vidya S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Plant Molecular Biology Group, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Pune, India. DOI - 10.2478/s11658-006-0012-8 SRC - Pubmed ID2 - 16847755 FG - 0, v. 11, n. 1, p. 132–154, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11658-006-0012-8/html>. Acesso em: 27 maio. 2021.

SUBAHARAN, Kesavan; BAKTHAVATSALAM, N.; VENUGOPAL, Vibina;

RAGHAVENDRA, Anjanappa. Chemoecological Responses of Plants. **Molecular Approaches for Sustainable Insect Pest Management**, [S. l.], p. 333–342, 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-3591-5_10. Disponível em:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-3591-5_10. Acesso em: 31 maio. 2022.

SULTANA, Mst Shamira; MILLWOOD, Reginald J.; MAZAREI, Mitra; STEWART, C. Neal. Proteinase inhibitors in legume herbivore defense: from natural to genetically engineered protectants. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 293–305, 2022. DOI: 10.1007/s00299-021-02800-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-021-02800-7>. Acesso em: 2 jun. 2022.

SWATHI, Marri; LOKYA, Vadthya; GUJJARLAPUDI, Mariyamma; VERMA, Shreya; KISKU, Pallabi; KUMAR, Nukapangu Sravan; PADMASREE, Kollipara. Proteinase Inhibitors. **Molecular Approaches for Sustainable Insect Pest Management**, [S. l.], p. 209–252, 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-3591-5_7. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-3591-5_7. Acesso em: 2 jun. 2022.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305049194901414>.

THOMAS, Nishanth; DIONYSIOU, Dionysios D.; PILLAI, Suresh C. Heterogeneous Fenton catalysts: A review of recent advances. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 404, p. 124082, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124082.

TIAN, Donglan; PEIFFER, Michelle; SHOEMAKER, Erica; TOOKER, John; HAUBRUGE, Eric; FRANCIS, Frederic; LUTHE, Dawn S.; FELTON, Gary W. Salivary glucose oxidase from caterpillars mediates the induction of rapid and delayed-induced defenses in the tomato plant. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. e36168, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036168. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036168>. Acesso em: 28 maio. 2022.

TIAN, Zhixi; WANG, Jia Wei; LI, Jiayang; HAN, Bin. Designing future crops: challenges and strategies for sustainable agriculture. **Plant Journal**, [S. l.], v. 105, n. 5, p. 1165–1178, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15107. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33258137/>. Acesso

em: 30 maio. 2022.

TREMMELE, Martin; MÜLLER, Caroline. The consequences of alternating diet on performance and food preferences of a specialist leaf beetle. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 59, n. 8, p. 840–847, 2013. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2013.05.009.

TUELHER, Edmar S.; DA SILVA, Éder H.; RODRIGUES, Hígor S.; HIROSE, Edson; GUEDES, Raul Narciso C.; OLIVEIRA, Eugênio E. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 849–859, 2018. DOI: 10.1007/s10340-017-0949-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-017-0949-6>. Acesso em: 28 maio. 2022.

VAN LEEUWEN, Thomas; DERMAUW, Wannes; MAVRIDIS, Konstantinos; VONTAS, John. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. **Current Opinion in Insect Science**, [S. l.], v. 39, p. 69–76, 2020. DOI: 10.1016/j.cois.2020.03.006.

VARGAS, Camila C.; REDAELLI, Luiza R.; SANT’ANA, Josué; MORAIS, Rosana M.; PADILHA, Priscila. Influência da idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo de *Trichogramma pretiosum*. **Iheringia - Serie Zoologia**, [S. l.], v. 107, 2017. DOI: 10.1590/1678-4766e2017015. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/isz/a/FV5MQ5PNCQfHnxWYwV45sjM/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 30 maio. 2022.

VENEGAS-MOLINA, Jhon; PROIETTI, Silvia; POLLIER, Jacob; OROZCO-FREIRE, Wilson; RAMIREZ-VILLACIS, Darío; LEON-REYES, Antonio. Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and *Arabidopsis* after treatment with elicitor molecules. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-67074-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-67074-7>. Acesso em: 31 maio. 2022.

VIANNA, U. R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J. C.; ALENCAR, J. R. C. C. De; ZINGER, F. D. Espécies E/Ou Linhagens De *Trichogramma* Spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Para O Controle De *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 81–87, 2011. DOI: 10.1590/1808-1657v78p0812011.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572011000100081&tlng=pt. Acesso em: 28 maio. 2022.

VISWANATH, Kotapati Kasi; VARAKUMAR, Panditi; PAMURU, Ramachandra Reddy; BASHA, Shiak Jeelan; MEHTA, Sahil; RAO, Ampasala Dinakara. Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. **Journal of Plant Biology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 83–95, 2020. DOI: 10.1007/s12374-020-09241-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-020-09241-x>. Acesso em: 31 maio. 2022.

WALSH, T. K.; HECKEL, D. G.; WU, Yidong; DOWNES, S.; GORDON, K. H. J.; OAKESHOTT, J. G. Determinants of Insecticide Resistance Evolution: Comparative Analysis among Heliothines. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 67, p. 387–406, 2022. DOI: 10.1146/annurev-ento-080421-071655. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-080421-071655>. Acesso em: 30 maio. 2022.

WESTFALL, R. J.; BOSSHARDT, D. K.; BARNES, R. H. Influence of Crude Trypsin Inhibitor on Utilization of Hydrolyzed Protein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 498–500, 1948. DOI: 10.3181/00379727-68-16531. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-68-16531>. Acesso em: 2 jun. 2022.

WILDON, D. C.; THAIN, J. F.; MINCHIN, P. E. H.; GUBB, I. R.; REILLY, A. J.; SKIPPER, Y. D.; DOHERTY, H. M.; O'DONNELL, P. J.; BOWLES, D. J. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. **Nature**, [S. l.], v. 360, n. 6399, p. 62–65, 1992. DOI: 10.1038/360062a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/360062a0>. Acesso em: 2 jun. 2022.

WILSON, Richard F. Soybean: Market Driven Research Needs. **Genetics and Genomics of Soybean**, [S. l.], p. 3–15, 2008. DOI: 10.1007/978-0-387-72299-3_1. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72299-3_1. Acesso em: 30 maio. 2022.

WOLFGANG, Goettel; AN, Yong qiang Charles. Genetic separation of southern and northern soybean breeding programs in North America and their associated allelic variation at four maturity loci. **Molecular Breeding**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1007/s11032-016-0611-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-016-0611-7>. Acesso

em: 30 maio. 2022.

XAVIER, Luciana Pereira; OLIVEIRA, Maria Goreti Almeida; GUEDES, Raul Narciso Carvalho; SANTOS, Agenor Valadares; DE SIMONE, Salvatore Giovanni. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 147–153, 2005. DOI: 10.14411/eje.2005.023. Disponível em: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2005.023.html>. Acesso em: 19 abr. 2021.

YADAV, Vivek; WANG, Zhongyuan; WEI, Chunhua; AMO, Aduragbemi; AHMED, Bilal; YANG, Xiaozhen; ZHANG, Xian. Phenylpropanoid pathway engineering: An emerging approach towards plant defense. **Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 312, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9040312. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/4/312/htm>. Acesso em: 31 maio. 2022.

ZEHRA, Andleeb; RAYTEKAR, Namita Anant; MEENA, Mukesh; SWAPNIL, Prashant. Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. **Current Research in Microbial Sciences**, [S. l.], v. 2, p. 100054, 2021. DOI: 10.1016/j.crmicr.2021.100054.

ZHANG, Min et al. Progress in soybean functional genomics over the past decade. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 256–282, 2022. DOI: 10.1111/pbi.13682. Disponível em: </pmc/articles/PMC8753368/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

ZHANG, Shichen; WANG, Dechun. Advances in pest-resistant varieties of soybean. [S. l.], p. 145–174, 2018. DOI: 10.19103/as.2017.0034.21. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.4324/9781351114400-10/advances-pest-resistant-varieties-soybean-shichen-zhang-dechun-wang-michigan-state-university-usa>. Acesso em: 28 maio. 2022.

ZHOU, Bin; LI, Xin. The monitoring of chemical pesticides pollution on ecological environment by GIS. **Environmental Technology and Innovation**, [S. l.], v. 23, p. 101506, 2021. DOI: 10.1016/j.eti.2021.101506.

ZHU-SALZMAN, Keyan; LUTHE, Dawn S.; FELTON, Gary W. Arthropod-inducible proteins: Broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 146, n. 3, p. 852–858, 2008. DOI: 10.1104/pp.107.112177. Disponível em:

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.112177. Acesso em: 16 jun. 2021.

ZOGLI, Prince; PINGAULT, Lise; GROVER, Sajjan; LOUIS, Joe. Ento(o)mics: the intersection of ‘omic’ approaches to decipher plant defense against sap-sucking insect pests. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 56, p. 153–161, 2020. DOI: 10.1016/j.pbi.2020.06.002.

CAPÍTULO I - Uso de inibidores de protease como alternativa promissora no controle de pragas

CAPÍTULO DE LIVRO I - Use of protease inhibitors as a promising alternative for pest control - Publicado no livro *Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective*. Ed. Springer Nature - https://doi.org/10.1007/978-981-19-0932-0_6

Uso de inibidores de protease como alternativa promissora no controle de pragas

RESUMO

As proteases são responsáveis por diversos processos essenciais à vida e controlar sua atividade é naturalmente importante em muitos eventos metabólicos específicos. Quando um inseto fitófago se alimenta, a maquinaria de resposta da planta leva à produção de inibidores de protease (IPs), que pode ocorrer local ou sistemicamente. Ao atingir o intestino do inseto, os IPs se ligam a proteases específicas e comprometem a digestibilidade do herbívoro, reduzindo a absorção de aminoácidos da dieta. O equilíbrio nutricional prejudicado afeta o desenvolvimento do inseto e pode levar à morte. Nesse sentido, os IPs têm ganhado destaque como alternativas no controle de insetos-praga, minimizando os efeitos tóxicos sobre outros animais e o meio ambiente. Por outro lado, os insetos expressam múltiplas isoformas de importantes enzimas digestivas para contornar o efeito tóxico dos IPs vegetais. Nosso grupo de pesquisa se dedica a compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na interação planta-praga do ponto de vista enzimático, proteômico e da biologia molecular. Por conta desses esforços, dezenas de artigos foram gerados, além de um IP patenteado para uso como defensivo agrícola ecologicamente correto. Este capítulo fornece uma visão geral atualizada dos avanços na pesquisa de IP aplicada ao controle de pragas de insetos.

Palavras-chave: controle de insetos-praga, inibidores de peptídeos, interação planta-praga, proteína

Use of protease inhibitors as a promising alternative for pest control

ABSTRACT

Proteases are responsible for several processes essential to life and controlling their activity is naturally important in many specific metabolic events. When a phytophagous insect feeds, the response machinery of the plant leads to the production of protease inhibitors (PIs), which can occur locally or systemically. Upon reaching the insect's intestine, PIs bind to specific proteases and compromise the insect's digestibility, reducing the absorption of dietary amino acids. The impaired nutritional balance affects the insect's development and can lead to death. In this sense, PIs have gained prominence as alternatives in the control of pest insects, minimizing the toxic effects on other animals and the environment. On the other hand, insects express multiple isoforms of important digestive enzymes to circumvent the toxic effect of plant PIs. Our research group is dedicated to understanding the biochemical mechanisms involved in plant-pest interaction from an enzymatic, proteomic and molecular biology point of view. Because of these efforts, dozens of articles were generated, besides PI patented for use as ecologically correct agricultural defensives. This chapter provides an updated overview of advances in PI research applied to insect pest control.

Key-words: insect pest control, peptides inhibitors, plant pest interaction, protein

1. INTRODUÇÃO

As proteases lidam com vários processos essenciais à vida. Este grupo diversificado de enzimas pode clivar ligações peptídicas para controlar finamente o catabolismo de proteínas, degradar seletivamente proteínas danificadas ou promover a hidrólise em massa de proteínas da dieta. Avanços em enzimologia e proteômica nas últimas décadas mostraram que as proteases são essenciais não apenas para fornecer aminoácidos livres à célula, mas também para modular processos importantes, como a remoção de segmentos específicos em zimogênios (DONEPUDI; GRÜTTER, 2002; GORELICK; OTANI, 1999; PLAINKUM et al., 2003; STROUD; KOSSIAKOFF; CHAMBERS, 1977) e proteínas imaturas (PENG et al. 1989; MURAMATSU et al., 1993; KHAN et al., 1998) ou a remoção de um peptídeo sinal quando a proteína já está no compartimento celular apropriado (HUSSAIN et al., 1982; NOVAK et al., 1988; FRIEDMANN et al., 2004; LEMBERG 2011).

A atividade proteolítica também está ligada à necessidade de controlar eventos metabólicos específicos, como o processamento final das proteínas antes que elas desempenhem seu papel na célula (GRAU et al., 2005; GUTTENTAG et al., 2003; LUM; BLOBEL, 1997; MANOLARIDIS et al., 2013), removendo seletivamente proteínas quando elas não são mais úteis ou reciclando aminoácidos necessários para sintetizar novas cadeias polipeptídicas (BOCHTLER et al., 1999; CIECHANOVER, 1994). Além dos processos intra e intercelulares, as proteases mediam várias interações moleculares que ocorrem entre diferentes organismos em um determinado ambiente. Parasitos intracelulares, por exemplo, secretam proteases que auxiliam suas interações e sobrevivência na célula hospedeira (ALVES; COLLI, 2007; KNOX, 2007; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008). Da mesma forma, a hidrólise de proteínas vegetais no intestino de insetos herbívoros são processos extracelulares que visam fornecer aminoácidos livres que serão absorvidos para posteriormente compor novas proteínas (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020).

Durante o processo evolutivo, os insetos ganharam sistemas complexos de proteases, um processo essencial para obter um melhor benefício nutricional (SILVA-JÚNIOR et al., 2021). Se, por um lado, um arsenal de proteases favorece a herbivoria, a coevolução selecionou plantas com estratégias para superar os efeitos adversos das proteases de insetos (MERIÑO-CABRERA et al., 2018; PILON et al., 2017a; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Plantas desafiadas por um patógeno ou predador, por exemplo, produzem inibidores de protease (IP) que se ligam a enzimas proteolíticas e previnem ou limitam sua atividade (HABIB; FAZILI,

2007; RYAN, 1990); essa deficiência digestiva implica em menor quantidade de aminoácidos livres para serem absorvidos e utilizados como matéria-prima na síntese de proteínas necessárias ao bom desenvolvimento do inseto. Já está bem estabelecido que uma grande variedade de organismos usa IPs não apenas para controlar funções proteolíticas endógenas, mas também para garantir sua proteção contra herbivoria ou infecção. Nesse sentido, os IPs atuam pelo complexo conjunto de interações moleculares que ocorrem entre diferentes organismos em um ecossistema, atuando como reguladores de eventos proteolíticos. Portanto, não surpreende que os IPs estejam sendo propostos como ferramenta para o controle de herbívoros e patógenos (CLEMENTE et al., 2019).

Com base nisso, estratégias de controle de pragas usando IPs foram desenvolvidas para controlar nematoides (TURRÀ et al., 2009), vírus (MASOUD et al., 1993), bactérias (MISHRA; REDDY; PRASAD, 2020) e insetos fitófagos (SENTHILKUMAR; CHENG; YEH, 2010). Os efeitos dos IPs dietéticos sobre a fecundidade e crescimento de insetos herbívoros têm sido descritos para várias espécies (DANTZGER et al., 2015; JAMAL et al., 2015; SINGH et al., 2020; TELANG et al., 2003; THOMAS et al., 1995), e a implicação de proteases extracelulares em processos patogênicos tem sido documentada em vários casos (ARMSTRONG, 2006; DUNAEVSKY et al., 2005; SANTOS; BRAGA-SILVA, 2012). Para isso, foi proposto o uso de IPs de origem proteica para serem expressos por meio de transgênicos para proteger plantas de pragas agrícolas (DE LEO et al., 2002; GATEHOUSE et al., 1993; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Hoje, a expressão de IPs por plantas geneticamente modificadas é uma realidade no controle de herbívoros e parasitas de plantas (KHALF et al., 2010; RAHBÉ et al., 2003; RIGLIETTI; RUGGIERO; CRECCHIO, 2008; SENTHILKUMAR; CHENG; YEH, 2010). Portanto, essa proteção adicional concedida a plantas economicamente importantes tem um forte apelo da indústria alimentícia, de biocombustíveis, têxtil e de toda a cadeia produtiva que as envolve.

2. SERINO-PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASE VEGETAL

De acordo com o sistema de classificação enzimática criado em 1956 (KNIGHT, 1962), as serino-proteases (EC 3.4.21) pertencem à classe das hidrolases, uma subclasse de hidrolases que atuam nas ligações peptídicas. O nome da família deriva do resíduo nucleofílico Ser no sítio ativo da enzima, que ataca o grupo peptídeo carbonila do substrato para formar um intermediário tetraédrico acil-enzima (COX; NELSON, 2008; HEDSTROM, 2002). Ao final da hidrólise da ligação peptídica, o mecanismo de reação orgânica completo das serino-

proteases envolve a tríade catalítica composta por Ser, His e Asp (BLOW; BIRKTOFT; HARTLEY, 1969; HENDERSON, 1971; MATTHEWS et al., 1967).

As serino-proteases são as peptidases mais bem estudadas e são consideradas as principais responsáveis pela digestão de proteínas no intestino de importantes insetos-praga, como os pertencentes às ordens Lepidoptera (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; MERIÑO-CABRERA et al., 2018; PILON et al., 2017b; ZHAO et al., 2019; ZHAO; EE, 2018) e Coleoptera (ALARCÓN et al., 2002; MARSHALL et al., 2008; MOCHIZUKI, 1998). Neste ponto, as enzimas das famílias tripsina-*like*, quimotripsina-*like* e elastase-*like* se destacam como principais representantes. Devido a esta importância, vários inibidores de serina protease de plantas têm sido descritos e caracterizados.

Os inibidores de proteases de origem proteica são classificados em 99 famílias de acordo com a homologia existente na sequência de aminoácidos de seus representantes, pelo menos na unidade inibitória. Também pode haver subfamílias quando há evidência de uma divergência evolutiva muito antiga dentro da família. Os IPs também são agrupados em clãs, que representam um grupo de inibidores em uma ou mais famílias que mostram evidências de uma relação evolutiva de suas estruturas terciárias semelhantes (RAWLINGS et al., 2018).

Nesse contexto, os inibidores de protease de planta (IPP) são geralmente pequenas proteínas encontradas nos tecidos de armazenamento das plantas, como a raiz, mas também nas folhas (DE LEO et al., 2002). Em sementes, tubérculos e outros tecidos de armazenamento de plantas, os inibidores de tripsina representam cerca de 10% do conteúdo total de proteínas (MANDAL et al., 2002). Esses altos níveis de IPP estão associados à resistência das plantas a insetos e patógenos (DUNSE et al., 2010; KIM et al., 2009). Embora altos níveis de IPP sejam frequentemente encontrados em Leguminosae, Solanaceae e Gramineae (BRZIN; KIDRIČ, 1996; SIN; CHYE, 2004; XU et al., 2001), a expressão desses IPP depende do estágio de desenvolvimento da planta, tecido, presença de estressores, e pode apresentar diferentes isoformas em um mesmo tecido (SELS et al., 2008).

Duas famílias de IP de plantas muito bem estudadas são Kunitz e Bowman-Birk. Os membros da família Kunitz têm em sua estrutura primária alguns resíduos conservados, como os quatro resíduos de cisteína que formam as duas ligações dissulfeto intracadeia (POUVREAU et al., 2003), além de serem proteínas monoméricas contendo de 150 a 200 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 20 kDa (NORIOKA et al., 1988). Cada molécula contém um

sítio de ligação único que interage fortemente com a protease contra a qual o inibidor é direcionado (SALIER, 1990).

Por outro lado, os IP de plantas Bowman-Birk são cadeias polipeptídicas de aproximadamente 8 kDa que podem formar oligômeros, variando de 54 a 133 resíduos de aminoácidos (BIRK 1985; KENNEDY 1998). Uma unidade básica Bowman-Birk contém uma alta proporção de resíduos de cisteína e forma várias ligações dissulfeto intracadeia, levando a uma conformação rigidamente dobrada (LOSSO, 2008). A unidade monomérica contém duas alças de ligação com sítios reativos na enzima. Portanto, cada inibidor pode inibir até duas proteases com diferentes especificidades inibitórias (QI; SONG; CHI, 2005).

Embora os IP de plantas sejam muito bem documentados como compostos defensivos, os danos causados a insetos e patógenos vão muito além de apenas diminuir a atividade das proteases digestivas. Os mecanismos moleculares não são totalmente conhecidos, mas estudos de metaboloma, transcriptoma, proteoma e histologia têm demonstrado diversos efeitos sobre a fisiologia de insetos submetidos a IPP (BAYÉS et al., 2006; BOBBARALA, 2009; CINGEL et al., 2017; QUILIS et al., 2007, 2014; RADANOVIC; ANAUATE, 2013; SABOTIČ; KOS, 2012; SHAMSI et al., 2018; SHAO et al., 2016; VALUEVA; MOSOLOV, 2004).

3. CONTRIBUIÇÕES DO NOSSO GRUPO DE PESQUISA

O uso de IPs como defensivos agrícolas foi sugerido já em 1947, quando Mikel and Standish (1947) observaram que uma dieta à base de soja limitou o desenvolvimento de alguns insetos. Apenas 25 anos depois, Green and Ryan (1972) demonstraram que danos às folhas de beladona induzem a síntese de IP, sugerindo o papel protetor desse composto. Nas décadas seguintes, a importância econômica e ambiental do desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle ecologicamente correto de pragas agrícolas aumentou o interesse no desenvolvimento de IP para esse fim. No entanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos na interação entre a fisiologia do inseto e os IPs não eram bem conhecidos.

Diante desse cenário, nosso grupo de pesquisa se concentrou em compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na interação planta-praga do ponto de vista da bioquímica e da biologia molecular, explorando técnicas de enzimologia, proteômica, metabolômica e transcriptômica. Para validar o mecanismo bioquímico de resposta da planta a insetos-praga pela via da Lipoxigenase (figura 1), utilizamos como modelo a interação soja (*Glycine max*) e lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). A soja foi escolhida por sua importância na produção

agrícola no Brasil, e *A. gemmatalis* foi escolhida porque, além de ser uma praga-chave da soja, é um inseto de fácil reprodução e bom rendimento de material biológico para estudos envolvendo análises bioquímicas que requerem purificação e caracterização das enzimas envolvidas no inseto. processo de interação da planta.

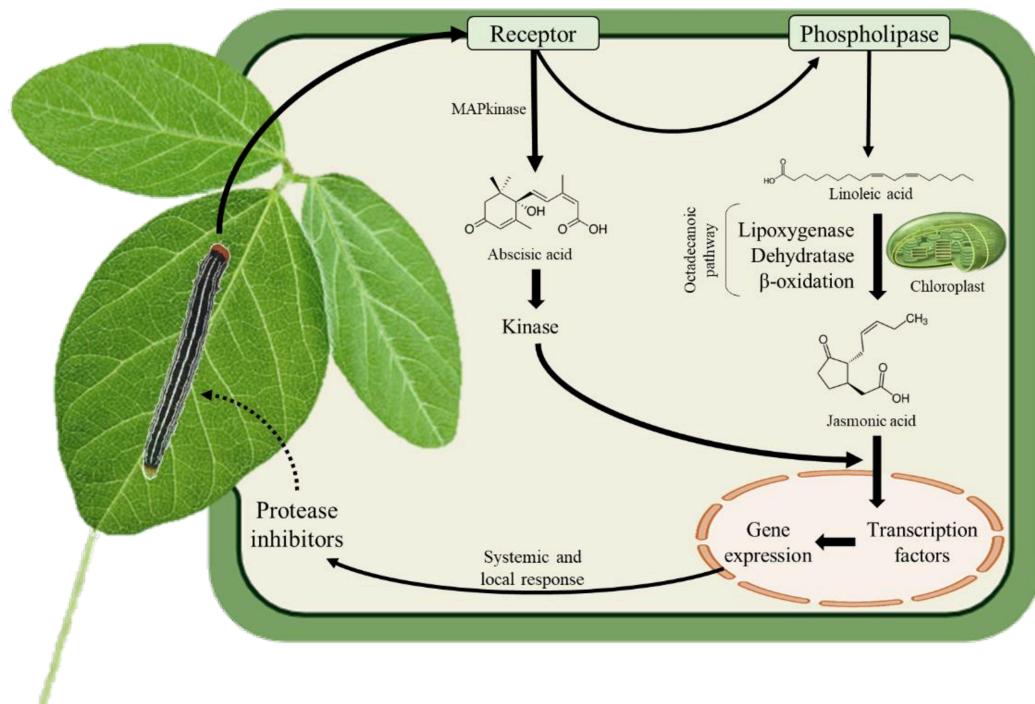


Figura 1. Via da lipoxigenase. O dano mecânico causado pela herbivoria ativa uma cascata de mensageiros intracelulares e leva à formação de ácido jasmônico. Esse hormônio vegetal ativa fatores de transcrição que terminam com a produção de inibidores de proteases, comprometendo a digestibilidade do inseto.

O estudo da interação planta-inseto requer uma compreensão completa do artrópode e da planta sob condições devidamente controladas. Nesse sentido, a determinação do perfil enzimático nos diferentes ínstares larvais de *A. gemmatalis* foi um passo importante para determinar as proteases responsáveis pelo processo digestivo da lagarta ao longo de seu desenvolvimento. Por isso, da Silva Júnior et al. (2020) mostraram que o perfil proteolítico no intestino de *A. gemmatalis* se altera durante o desenvolvimento larval, com predominância da atividade da cisteína protease no terceiro ínstar e da serina protease no quarto e quinto ínstares, sugerindo modulação na expressão gênica acompanhada por diferentes demandas de nutrientes ao longo deste estágio. Estudos anteriores envolvendo Lepidoptera focaram na fisiologia e bioquímica do inseto apenas no quinto ínstar, pois este é o momento de maior voracidade da

lagarta. No entanto, alguns estudos mostram alterações no perfil morfológico no intestino de alguns insetos durante o desenvolvimento (CHOUGULE et al., 2005; KIPGEN; AGGARWAL, 2014; ZHAO et al., 2019). Este conjunto de dados sugere que tanto cisteína quanto serina proteases são alvos importantes para o desenvolvimento de IPs, visando comprometer o desenvolvimento larval em diferentes ínstares.

Os insetos expressam um arsenal de isoformas para enzimas digestivas, tendo como importante consequência a tentativa de contornar os efeitos negativos dos IPs (CRAVA et al., 2013; KOTKAR et al., 2009; LOMATE; HIVRALE, 2011). Portanto, o conhecimento das estruturas primárias e terciárias das proteínas é de fundamental importância. Pensando nisso, Silva-Júnior et al. (2021) descreveram o perfil proteômico do intestino de *A. gemmatalis*, mostrando um grande número de enzimas funcionais, suas sequências e modificações pós-traducionais (PTM) por meio de técnicas proteômicas. A descrição de um perfil proteômico de enzimas é um desafio devido às baixas concentrações dessas hidrolases em relação a outras proteínas abundantes presentes na amostra. No entanto, a conciliação de várias metodologias proteômicas permitiu uma alta cobertura do proteoma intestinal da lagarta como mostra o fluxo de trabalho na figura 2. Além disso, pesquisas do nosso grupo mostraram que as energias e os pontos de interação entre enzimas e inibidores por *docking* molecular são importantes informações para o projeto racional de IPs (DE ALMEIDA BARROS et al., 2021; MERIÑO-CABRERA et al., 2019, 2020; SILVA-JÚNIOR et al., 2021).

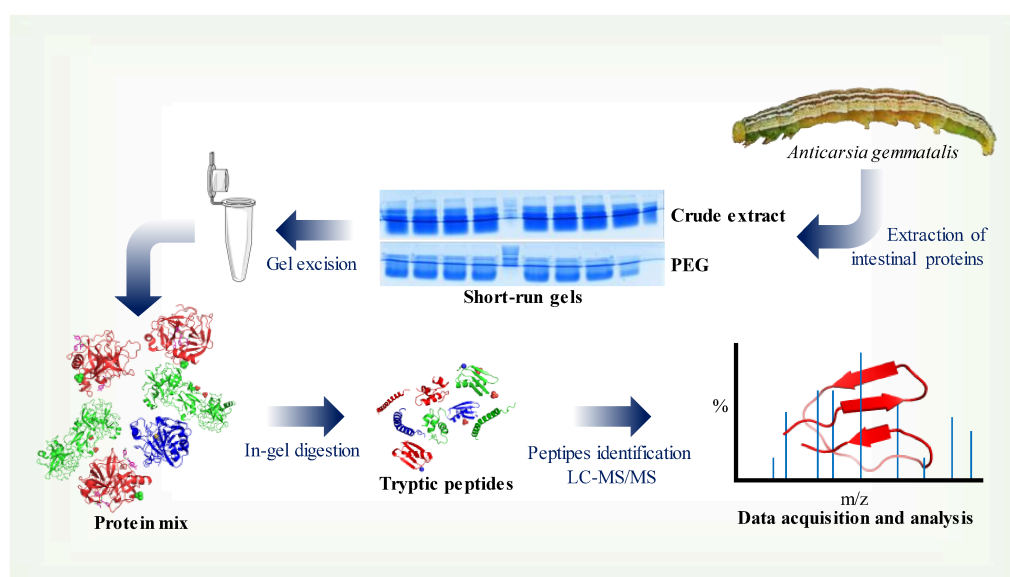


Figura 2. O intestino extraído de *Anticarsia gemmatalis* foi fracionado com polietilenoglicol para remoção de proteínas abundantes. O extrato bruto e o resultado da precipitação com PEG foram submetidos a SDS-PAGE de curta duração. As proteínas presentes no gel foram identificadas por espectrometria de massa.

Um conhecimento mais profundo da cinética enzimática das proteases digestivas de *A. gemmatalis* permite uma melhor compreensão dos centros ativos, dos mecanismos de reação dessas enzimas e dos IPs que precisam ser aplicados como inibidores do complexo arsenal de proteases digestivas do inseto. Nesse sentido, tripsinas ligadas à membrana intestinal da lagarta da soja foram parcialmente purificadas e identificadas por espectrometria de massa (REIS et al., 2012). Além disso, nosso grupo de pesquisa também avaliou a contribuição de bactérias endossimbióticas na produção de enzimas proteolíticas no intestino de *A. gemmatalis* (PILON et al., 2013). As principais tripsinas desses isolados bacterianos foram purificadas e caracterizadas cineticamente (PILON et al., 2017b) e esse conjunto de dados permitiu inferir que bactérias endossimbiontes sintetizam tripsina, contribuindo para a digestibilidade do inseto.

Esses trabalhos desenvolvidos por nosso grupo trouxeram um olhar para o inseto e sua enzimologia intestinal de *A. gemmatalis* em condições normais, ou seja, livre de tratamentos com IP. No entanto, o desenvolvimento de IPs, peptídeos ou miméticos de peptídeos orgânicos com atividade inibitória requer uma compreensão completa do complexo enzima-inibidor. Os estudos de cinética de inibição são ferramentas para a compreensão do sistema enzimático multimecanístico. Assim, realizamos a caracterização cinética da inibição das tripsina-like do inseto contra IP natural de soja (SKTI e SBBI) e IP sintético (Benzamidina e Berenil) para entender a inibição do ponto de vista da estrutura/função fisiológica (PATARROYO-VARGAS et al., 2020; SILVA-JUNIOR; OLIVEIRA, 2021). Nosso estudo mostrou, pela primeira vez, a adaptação de enzimas do tripsina-like no intestino de *A. gemmatalis* contra diferentes inibidores. O efeito do IP também foi evidenciado quando a lagarta foi desafiada com Benzamidina (PILON et al., 2018), Berenil (MOREIRA et al., 2011; PAIXÃO et al., 2013), peptídeos sintéticos (DE ALMEIDA BARROS et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2020; PATARROYO-VARGAS et al., 2018), SKTI, SBBI (MENDONÇA et al., 2020), ILTI e ApTI (MERIÑO-CABRERA et al., 2020).

Se por um lado, o estudo aprofundado do inseto-praga é importante, é necessário entender a fisiologia da planta alvo e seus sistemas de resposta ao herbívoro. Com isso em mente, realizamos ensaios biológicos associados à análise do metaboloma em dois genótipos de soja contrastando a resistência à herbivoria em resposta a *A. gemmatalis* (GOMEZ et al., 2018). Essa abordagem permitiu mostrar perfis de flavonoides do extrato de folhas de soja e identificar de forma eficiente alguns novos compostos relacionados à resistência. Com os perfis metabólicos, foi possível reconstruir as vias biossintéticas dos flavonoides, revelando flavonoides glicoconjugados regulados positivamente no genótipo de soja resistente. Essas

diferenças de abundância entre os genótipos sugerem que eles lidam com a resistência à herbivoria nessas variedades e abrem as portas para um vasto campo de investigação visando aumentar a resistência da soja contra insetos. Ainda na perspectiva de como a planta percebe e reage aos danos causados pelo herbívoro, mostramos que a resposta aos flavonoides também ocorre quando a planta sofre danos mecânicos artificiais (JÚNIOR et al., 2021). Além disso, a deleção de genes em sementes de soja que codificam proteínas importantes para a defesa da planta, como a enzima lipoxigenase e IP SKTI, não interfere na capacidade da planta de responder a feridas pela via da lipoxigenase (DA SILVA FORTUNATO et al., 2007). Esses resultados têm apelo industrial e prático, pois essas proteínas são indesejáveis na semente, mas fundamentais na defesa da planta contra pragas agrícolas.

Dada a realidade das mudanças climáticas, é importante prever como a interação planta-inseto responde às variações ambientais. Faustino et al. (2021b) mostraram que a soja submetida à seca reduz a herbivoria e a sobrevivência de *A. gemmatalis*. O grupo se baseou na expressão gênica, cinética enzimática e análise metabolômica para concluir que o sinal de seca por si só não é suficiente para promover o aumento da resistência ao ataque de insetos.

Esses resultados gerados pelo nosso grupo de pesquisa na última década permitiram identificar as enzimas alvo e mapear os sítios ativos, permitindo o desenvolvimento de potentes IPs peptídicos a serem pulverizados, usados como modelos para produção de peptídeos miméticos, ou mesmo como modelo para transgênicos no controle de pragas agrícolas. Desenvolvemos inibidores de proteínas promissores para o controle de pragas agrícolas. Parte dessas contribuições estão compiladas didaticamente na Figura 3.

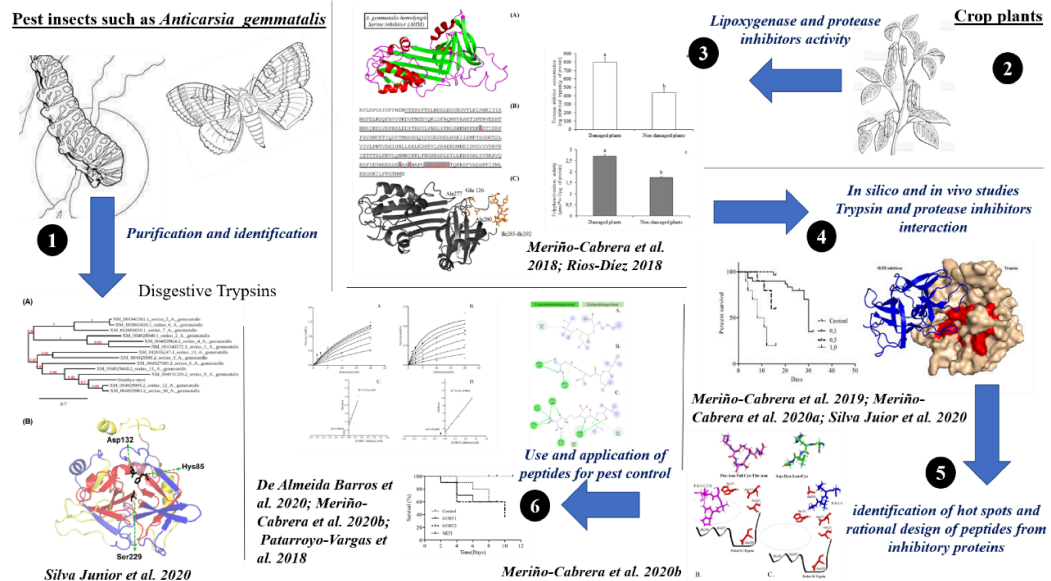


Figura 3. Algumas pesquisas realizadas em nosso grupo caracterizam-se pelo estudo da interação inseto-plantas. A *Anticarsia gemmatalis* e a soja são os principais modelos de estudo de nossos trabalhos. Em insetos-praga, a atividade de enzimas do sistema digestório de lagartas foi avaliada e caracterizada. A atividade de proteases foi determinada em extratos brutos do intestino e em amostras enriquecidas como isoformas de tripsina de purificação por afinidade, bem como eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa (1). Paralelamente, uma via metabólica de defesa foi avaliada nas plantas hospedeiras desses insetos praga, que é a via da lipoxigenase, que ativa a expressão de inibidores de protease, bem como a purificação e análise de estabilidade desses inibidores (2). A partir dos resultados de vários estudos de interação inseto-plantas, passamos a avaliar a interação de inibidores de proteínas e tripsinas através de estudos *in silico* (modelagem de proteínas, *docking* proteína-proteína e simulações por dinâmica molecular) que permitem prever o efeito inibitório e sua capacidade da ligação da tripsina complementando o estudo experimental (*in vitro* e *in vivo*) (3). A partir desses estudos e análises de uma região conhecida como interface (sítio de interação proteína-proteína) vários peptídeos (depósitos de patentes) foram propostos com aplicação de bioinseticidas em *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera cosmioides* (4) corroborados por testes *in vitro* e *in vivo* (5).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação agrícola *ex-vivo* de inibidores de protease ainda é limitada devido ao grande tamanho molecular, o que os torna instáveis no ambiente. Acreditamos que peptídeos de andaime menores projetados de acordo com o sítio ativo de importantes proteases digestivas e domínios reativos de inibidores de proteases podem superar esse gargalo. Além disso, novos peptídeos projetados têm uma vantagem sobre IPs vegetais que não estão co-evoluindo com insetos, o que pode evitar adaptações.

Para neutralizar o complexo conjunto de proteases que os insetos possuem em seu intestino médio, expô-los a IPs para diferentes classes de proteases poderia superar os

mecanismos adaptativos de forma mais eficiente. Apesar de todos os gargalos, os IPs podem ser úteis no manejo integrado de pragas como uma abordagem alternativa/complementar se bem explorados.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN, F. J.; MARTÍNEZ, T. F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 265–274, 2002. DOI: 10.1016/S0965-1748(01)00087-X.

ALVES, Maria Júlia M.; COLLI, Walter. Trypanosoma cruzi: Adhesion to the host cell and intracellular survival. *In: IUBMB LIFE 2007, Anais [...].* : John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 274–279. DOI: 10.1080/15216540701200084. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1080/15216540701200084>. Acesso em: 18 jun. 2021.

ARMSTRONG, Peter B. **Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction** *Immunobiology* Elsevier GmbH, , 2006. DOI: 10.1016/j.imbio.2006.01.002.

BAYÉS, Alex; DE LA VEGA, Mónica Rodríguez; VENDRELL, Josep; AVILES, Francesc X.; JONGSMA, Maarten A.; BEEKWILDER, Jules. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 654–664, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.05.010.

BIRK, YEHUDITH. **The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans** *International Journal of Peptide and Protein Research* John Wiley & Sons, Ltd, , 1985. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1985.tb02155.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3011.1985.tb02155.x>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J. J.; HARTLEY, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**, [S. l.], v. 221, n. 5178, p. 337–340, 1969. DOI: 10.1038/221337a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/221337a0>. Acesso em: 24 jun. 2021.

BOBBARALA, Varaprasad. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. **Indian Journal of Science and Technology**,

[S. l.], v. 2, n. 4, p. 87–90, 2009. DOI: 10.17485/ijst/2009/v2i4.15. Disponível em: <http://www.indjst.orgindianj.sci.technol>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BOCHTLER, Matthias; DITZEL, Lars; GROLL, Michael; HARTMANN, Claudia; HUBER, Robert. The proteasome. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, [S. l.], v. 28, p. 295–317, 1999. DOI: 10.1146/annurev.biophys.28.1.295. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biophys.28.1.295>. Acesso em: 18 jun. 2021.

BRZIN, Jože; KIDRIČ, Marjetka. Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 421–468, 1996. DOI: 10.1080/02648725.1996.10647936. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbgr20>. Acesso em: 28 jun. 2021.

CHOUGULE, Nanasahab P.; GIRI, Ashok P.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 355–367, 2005. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.01.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805000226>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CIECHANOVER, Aaron. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway** Cell Press, , 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90396-4.

CINGEL, Aleksandar; SAVIĆ, Jelena; LAZAREVIĆ, Jelica; ĆOSIĆ, Tatjana; RASPOR, Martin; SMIGOČKI, Ann; NINKOVIĆ, Slavica. Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development. **Insect Science**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 768–780, 2017. DOI: 10.1111/1744-7917.12364. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12364>. Acesso em: 28 jun. 2021.

CLEMENTE, Marina; CORIGLIANO, Mariana G.; PARIANI, Sebastián A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, Edwin F.; SANDER, Valeria A.; RAMOS-DUARTE, Víctor A. **Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2019. DOI: 10.3390/ijms20061345. Disponível em: www.mdpi.com/journal/ijms. Acesso em: 18 jun. 2021.

COX, Michael; NELSON, David L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7th. ed. [s.l.] : W. H. Freeman and Company, 2008. v. 1 Disponível em: <http://www.amazon.co.uk/Lehninger-Principles-Biochemistry-Michael-Cox/dp/0716743396>. Acesso em: 25 jun. 2021.

CRAVA, Cristina M.; BEL, Yolanda; JAKUBOWSKA, Agata K.; FERRÉ, Juan; ESCRICHE, Baltasar. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: Activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 924–935, 2013. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.07.009.

DA SILVA FORTUNATO, Frederico; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti; BRUMANO, Maria Helena Nasser; SILVA, Carlos Henrique Osório; GUEDES, Raul Narciso Carvalho; MOREIRA, Maurílio Alves. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 241–247, 2007. DOI: 10.1007/s10340-007-0179-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-007-0179-4>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; DE OLIVEIRA, Eugênio E.; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21631, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21631>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lúgia Rodrigues. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.

DE ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; DE OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V.; RAMOS, Humberto J. O.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**,

[*S. l.*], v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6191>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L. R. PLANT-PIs: A database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Research**, [*S. l.*], v. 30, n. 1, p. 347–348, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.347. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/30/1/347/1332111>. Acesso em: 2 jun. 2021.

DE OLIVEIRA, Giordani et al. Inhibitory effects of tripeptides to enzymatic activity and life cycle parameters of *Anticarsia gemmatalis*. **Phytoparasitica**, [*S. l.*], v. 48, n. 5, p. 823–831, 2020. DOI: 10.1007/s12600-020-00837-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12600-020-00837-0>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DONEPUDI, Mrudula; GRÜTTER, Markus G. Structure and zymogen activation of caspases. **Biophysical Chemistry**, [*S. l.*], v. 101–102, p. 145–153, 2002. DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00151-5.

DUNAEVSKY, Ya E.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K. S.; BELOZERSKY, M. A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. . jul. 2005, 4, p. 608–613.

DUNSE, K. M.; STEVENS, J. A.; LAY, F. T.; GASPAR, Y. M.; HEATH, R. L.; ANDERSON, M. A. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 107, n. 34, p. 15011–15015, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009241107. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009241107. Acesso em: 28 jun. 2021.

FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, [*S. l.*], v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847221002240>. Acesso em: 26 jul. 2021.

FRIEDMANN, Elena; LEMBERG, Marius K.; WEIHOFEN, Andreas; DEV, Kumlesh K.; DENGLER, Uwe; ROVELLI, Giorgio; MARTOGLIO, Bruno. Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of

catalytic domains compared with presenilins. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 49, p. 50790–50798, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M407898200.

GATEHOUSE, Angharad M. R. et al. Approaches to insect resistance using transgenic plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 342, n. 1301, p. 279–286, 1993. DOI: 10.1098/rstb.1993.0158. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.1993.0158>. Acesso em: 22 jun. 2021.

GOMEZ, Jenny D.; VITAL, Camilo E.; OLIVEIRA, Maria G. A.; RAMOS, Humberto J. O. Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. e0205010, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0205010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205010>. Acesso em: 6 abr. 2021.

GORELICK, Fred S.; OTANI, Taiichi. Mechanisms of intracellular zymogen activation. **Bailliere's Best Practice in Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 227–240, 1999. DOI: 10.1053/bega.1999.0021.

GRAU, Sandra et al. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 17, p. 6021–6026, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0501823102. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501823102. Acesso em: 18 jun. 2021.

GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. **Science**, [S. l.], v. 175, n. 4023, p. 776–777, 1972. DOI: 10.1126/science.175.4023.776. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/175/4023/776>. Acesso em: 5 jul. 2021.

GUTTENTAG, Susan; ROBINSON, Lauren; ZHANG, Peggy; BRASCH, Frank; BÜHLING, Frank; BEERS, Michael. Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 69–79, 2003. DOI: 10.1165/rcmb.2002-0111OC. Disponível em: www.atsjournals.org. Acesso em: 18 jun. 2021.

HABIB, Huma; FAZILI, Khalid Majid. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 68–85, 2007. DOI: ISSN

1538-2273. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/8EB195410993>. Acesso em: 24 jun. 2020.

HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr000033x>. Acesso em: 24 jun. 2021.

HENDERSON, R. Catalytic activity of -chymotrypsin in which histidine-57 has been methylated. **The Biochemical journal**, [S. l.], v. 124, n. 1, p. 13–18, 1971. DOI: 10.1042/bj1240013. Disponível em: </biochemj/article/124/1/13/17272/Catalytic-activity-of-chymotrypsin-in-which>. Acesso em: 24 jun. 2021.

HUSSAIN, Musaddeq; OZAWA, Yuji; ICHIHARA, Shigeyuki; MIZUSHIMA, Shoji. Signal Peptide Digestion in Escherichia coli Effect of Protease Inhibitors on Hydrolysis of the Cleaved Signal Peptide of the Major Outer-Membrane Lipoprotein. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 129, n. 1, p. 233–239, 1982. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb07044.x. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1982.tb07044.x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhash K.; SINGH, Dushyant; AHMED, Wareed. A Kunitz-type serine protease inhibitor from Butea monosperma seed and its influence on developmental physiology of Helicoverpa armigera. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 311–316, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.12.003.

JÚNIOR, Neilier Rodrigues da Silva; BARROS, Rafael Almeida; MERIÑO-CABRERA, Yaremis Beatriz; OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida. Does Mechanical Damage on Soybean Induces the Production of Flavonoids? In: **Current Approaches in Science and Technology Research Vol. 3**. [s.l.] : Book Publisher International (a part of SCIENCEDOMAIN International), 2021. p. 56–66. DOI: 10.9734/bpi/castr/v3/2325f. Disponível em: <https://stm.bookpi.org/CASTR-V3/article/view/1412>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KENNEDY, Ann R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. In: AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION 1998, **Anais [...]**. : American Society for Nutrition, 1998. p. 1406S-1412S. DOI: 10.1093/ajcn/68.6.1406S. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/68/6/1406S/4666224>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KHALF, Moustafa; GOULET, Charles; VORSTER, Juan; BRUNELLE, France; ANGUENOT, Raphaël; FLISS, Ismaïl; MICHAUD, Dominique. Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 155–169, 2010. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00471.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-7652.2009.00471.x>. Acesso em: 2 jul. 2021.

KHAN, Amir R.; JAMES, Michael N. G. **Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes** *Protein Science* Blackwell Publishing Ltd, , 1998. DOI: 10.1002/pro.5560070401. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.5560070401>. Acesso em: 18 jun. 2021.

KIM, Jin Young; PARK, Seong Cheol; HWANG, Indeok; CHEONG, Hyeonsook; NAH, Jae Woon; HAHM, Kyung Soo; PARK, Yoonkyung. **Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity** *International Journal of Molecular Sciences* Molecular Diversity Preservation International, , 2009. DOI: 10.3390/ijms10062860. Disponível em: www.mdpi.com/journal/ijms. Acesso em: 28 jun. 2021.

KIPGEN, Lunminlal; AGGARWAL, Kamal K. Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 172–178, 2014. DOI: 10.1017/S1742758414000368. Disponível em: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1742758414000368. Acesso em: 28 maio. 2022.

KNIGHT, S. G. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. **AIBS Bulletin**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 39, 1962. DOI: 10.2307/1293065. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.2307/1293065>.

KNOX, D. P. **Proteinase inhibitors and helminth parasite infection** *Parasite Immunology* John Wiley & Sons, Ltd, , 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2006.00913.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3024.2006.00913.x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

KOTKAR, Hemlata M.; SARATE, Priya J.; TAMHANE, Vijayanti A.; GUPTA, Vidya S.; GIRI, Ashok P. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various

host plants. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 663–670, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.05.004.

L.S. SANTOS, Andre; A. BRAGA-SILVA, Lys. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 155–162, 2012. DOI: 10.2174/138955713804484802. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1389-5575&volume=13&issue=1&spage=155>. Acesso em: 22 jun. 2021.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. **Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*** **Cellular and Molecular Life Sciences** Springer, , 2008. DOI: 10.1007/s00018-008-7556-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-008-7556-x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

LEMBERG, Marius K. **Intramembrane proteolysis in regulated protein trafficking** **Traffic** John Wiley & Sons, Ltd, , 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01219.x. Disponível em: www.traffic.dk. Acesso em: 18 jun. 2021.

LOMATE, Purushottam R.; HIVRALE, Vandana K. Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. **Arthropod-Plant Interactions**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 359–368, 2011. DOI: 10.1007/s11829-011-9140-9.

LOSSO, Jack N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 94–118, 2008. DOI: 10.1080/10408390601177589. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390601177589>. Acesso em: 28 jun. 2021.

LUM, Lawrence; BLOBEL, Carl P. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 191, n. 1, p. 131–145, 1997. DOI: 10.1006/dbio.1997.8609.

MANDAL, Surekha; KUNDU, Pallob; ROY, Biswajit; MANDAL, Radha K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 277, n. 40, p. 37161–37168, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M205280200.

MANOLARIDIS, Ioannis et al. Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. **Nature**, [S. l.], v. 504, n. 7479, p. 301–305, 2013. DOI: 10.1038/nature12754. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature12754>. Acesso em: 18 jun. 2021.

MARSHALL, S. D. G.; GATEHOUSE, L. N.; BECHER, S. A.; CHRISTELLER, J. T.; GATEHOUSE, H. S.; HURST, M. R. H.; BOUCIAS, D. G.; JACKSON, T. A. Serine proteases identified from a *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae) midgut EST library and their expression through insect development. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 247–259, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2008.00798.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2008.00798.x>. Acesso em: 25 jun. 2021.

MASOUD, Sameer A.; JOHNSON, Lowell B.; WHITE, Frank F.; REECK, Gerald R. Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 655–663, 1993. DOI: 10.1007/BF00014548. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00014548>. Acesso em: 23 jun. 2021.

MATTHEWS, B. W.; SIGLER, P. B.; HENDERSON, R.; BLOW, D. M. Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin. **Nature**, [S. l.], v. 214, n. 5089, p. 652–656, 1967. DOI: 10.1038/214652a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/214652a0>. Acesso em: 24 jun. 2021.

MENDONÇA, Eduardo G.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; DA SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Welligton G.; DE OLIVEIRA, Joel A.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21637, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/arch.21637>. *Anticarsia gemmatalis* represents a relevant factor for lowering soybean and other legume crop productivities. Protease inhibitors affect protein degradation and reduce the availability of amino acids, impairing the development and survival of insect pests. Acesso em: 27 maio. 2021.

MERIÑO-CABRERA, Y.; ZANUNCIO, J. C.; DA SILVA, R. S.; SOLIS-VARGAS, M.; CORDEIRO, G.; RAINHA, F. R.; CAMPOS, W. G.; PICANÇO, M. C.; DE ALMEIDA

OLIVEIRA, M. G. Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 236–243, 2018. DOI: 10.1111/aab.12416. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12416>. Acesso em: 9 jun. 2021.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago A.; CASTRO, José G. S.; BARBOSA, Samuel L.; MACEDO, Maria L. R.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatalis* trypsins by *Adenantha pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. e21687, 2020. DOI: 10.1002/arch.21687. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21687>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. DOI: 10.1111/aab.12539. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12539>. Acesso em: 27 maio. 2021.

MIKEL, C. E.; STANDISH, J. **Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum* (Herbst)** *Minn., Agric. Exp. Stn., Tech. Bull.* [s.l: s.n.]. Disponível em: https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/204112/mn1000_agexpstn_tb_178.pdf?sequence=1. Acesso em: 30 jun. 2021.

MISHRA, Udit Nandan; REDDY, Manushree Venkataswamy; PRASAD, Doddananjappa Theertha. Plant serine protease inhibitor (SPI): A potent player with bactericidal, fungicidal, nematicidal and antiviral properties. **International Journal of Chemical Studies**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 2985–2993, 2020. DOI: 10.22271/chemi.2020.v8.i1at.8724. Disponível em: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1at.8724>. Acesso em: 24 jun. 2021.

MOCHIZUKI, Atsushi. Characteristics of digestive proteases in the gut of some insect orders. **Applied Entomology and Zoology**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 401–407, 1998. DOI: 10.1303/aez.33.401.

MOREIRA, L. F.; CAMPOS, W. G.; RIBEIRO, F. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G.

A. Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). **Crop Protection**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1285–1290, 2011. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.05.023.

MURAMATSU, Masayoshi; FUKAZAWA, Chikafusa. A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, a novel proteolytic enzyme. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 215, n. 1, p. 123–132, 1993. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18014.x. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18014.x>. Acesso em: 18 jun. 2021.

NORIOKA, Naoko; HARA, Saburo; IKENAKA, Tokuji; ABE, Jiro. Distribution of the Kunitz and the Bowman–Birk Family Proteinase Inhibitors in Leguminous Seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 1245–1252, 1988. DOI: 10.1080/00021369.1988.10868815. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article/52/5/1245/5967771>. Acesso em: 28 jun. 2021.

NOVAK, P.; DEV, I. K. Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 170, n. 11, p. 5067–5075, 1988. DOI: 10.1128/jb.170.11.5067-5075.1988. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jb>. Acesso em: 18 jun. 2021.

PAIXÃO, Gilson P.; LOURENÇÃO, André L.; SILVA, Camila R.; MENDONÇA, Eduardo G.; SILVA, Paulo L.; OLIVEIRA, Joel A.; ZANUNCIO, José C.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Biochemical responses of *anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 34, p. 8034–8038, 2013. DOI: 10.1021/jf4027603. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf4027603>. Acesso em: 25 mar. 2021.

PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; CORDEIRO, Gláucia; DA SILVA, Carolina R.; DA SILVA, Camila R.; MENDONÇA, Eduardo G.; VISÔTTO, Liliane E.; ZANUNCIO, José C.; CAMPOS, Wellington G.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 92, n. suppl 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477. Disponível em: www.scielo.br/aabc%7Cwww.fb.com/aabcjournalAnAcadBrasCienc. Acesso em: 31 mar. 2021.

PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine- Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.

PENG, C.; HO, B. K.; CHANG, T. W.; CHANG, N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 2550–2556, 1989. DOI: 10.1128/jvi.63.6.2550-2556.1989. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jvi>. Acesso em: 18 jun. 2021.

PILON, Alan C.; VALLI, Marilia; DAMETTO, Alessandra C.; PINTO, Meri Emili F.; FREIRE, Rafael T.; CASTRO-GAMBOA, Ian; ANDRICOPULO, Adriano D.; BOLZANI, Vanderlan S. NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, Nuclei of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products (NuBBE), Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Sao Paulo State University - UNESP, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil. DOI - 10.1038/s41598-017-07451-x SRC - Pubme, v. 7, n. 1, p. 7215, 2017. a. DOI: 10.1038/s41598-017-07451-x. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=28775335&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

PILON, Anderson M.; CAMPOS, Wellington Garcia; SILVA, Carolina R.; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Camila R.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820180159> www.scielo.br/aabc www.fb.com/aabcjournal. Acesso em: 28 jun. 2021.

PILON, F. M.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A. Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, [S. l.],

v. 183, n. 6, p. 735–747, 2013. DOI: 10.1007/s00360-013-0744-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00360-013-0744-5>. Acesso em: 28 jun. 2021.

PILON, Franciny Martins; SILVA, Camila da Rocha; VISÔTTO, Liliâne Evangelista; BARROS, Rafael de Almeida; DA SILVA JÚNIOR, Neilier Rodrigues; CAMPOS, Wellington Garcia; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Purification and characterization of trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatalis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. e21407, 2017. b. DOI: 10.1002/arch.21407. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21407>. Acesso em: 28 jun. 2021.

PLAINKUM, Parit; FUCHS, Stephen M.; WIYAKRUTTA, Suthep; RAINES, Ronald T. Creation of a zymogen. **Nature Structural Biology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 115–119, 2003. DOI: 10.1038/nsb884. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsb884>. Acesso em: 2 jul. 2021.

POUVREAU, Laurice; GRUPPEN, Harry; VAN KONINGSVELD, Gerrit A.; VAN DEN BROEK, Lambertus A. M.; VORAGEN, Alphons G. J. The most abundant protease inhibitor in potato tuber (cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 51, n. 17, p. 5001–5005, 2003. DOI: 10.1021/jf0212486. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0212486>. Acesso em: 28 jun. 2021.

QI, Rui Feng; SONG, Zhan Wu; CHI, Cheng Wu. **Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* John Wiley & Sons, Ltd, , 2005. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x>. Acesso em: 28 jun. 2021.

QUILIS, Jordi; LÓPEZ-GARCÍA, Belén; MEYNARD, Donaldo; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 367–377, 2014. DOI: 10.1111/pbi.12143. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12143>. Acesso em: 28 jun. 2021.

QUILIS, Jordi; MEYNARD, Donaldo; VILA, Laura; AVILÉS, Francesc X.; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides

pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 537–553, 2007. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x>. Acesso em: 28 jun. 2021.

RADANOVIC, Márcia; ANAUATE, Maria. P4–254: A phenomenological study of realistic picture copy in a case of advanced semantic dementia. **Alzheimer's & Dementia**, [S. l.], v. 9, n. 4S_Part_20, p. P799–P799, 2013. DOI: 10.1016/j.jalz.2013.05.1647. Disponível em: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2013.05.1647>. Acesso em: 28 jun. 2021.

RAHBÉ, Yvan; DERAISON, Céline; BONADÉ-BOTTINO, Michel; GIRARD, Cécile; NARDON, Christiane; JOUANIN, Lise. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. **Plant Science**, [S. l.], v. 164, n. 4, p. 441–450, 2003. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00402-8.

RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J.; THOMAS, Paul D.; HUANG, Xiaosong; BATEMAN, Alex; FINN, Robert D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. D1, p. D624–D632, 2018. DOI: 10.1093/nar/gkx1134. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/merops/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

REIS, Denise Torres Cruz; DOS MARES-GUIA, Thiago Rennó; DE OLIVEIRA, Jamil Silvano; SANTOS, Alexandre Martins Costa; SANTORO, Marcelo Matos; OLIVEIRA, Maria Goreti Almeida. Purification of a membrane-bound trypsin-like enzyme from the gut of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 263–270, 2012. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v34i3.9239. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/9239>. Acesso em: 28 jun. 2021.

RIGLIETTI, Antonio; RUGGIERO, Pacifico; CRECCHIO, Carmine. Investigating the influence of transgenic tobacco plants codifying a protease inhibitor on soil microbial community. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 2928–2936, 2008. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.07.027.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SABOTIČ, Jerica; KOS, Janko. **Microbial and fungal protease inhibitors - Current and potential applications** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer, , 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3834-x. Disponível em: <http://www.proteolysis.org/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SALIER, Jean Philippe. **Inter- α -trypsin inhibitor: emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily** *Trends in Biochemical Sciences* Elsevier Current Trends, , 1990. DOI: 10.1016/0968-0004(90)90282-G.

SELS, Jan; MATHYS, Janick; DE CONINCK, Barbara M. A.; CAMMUE, Bruno P. A.; DE BOLLE, Miguel F. C. **Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides** *Plant Physiology and Biochemistry* Elsevier Masson, , 2008. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.

SENTHILKUMAR, Rajendran; CHENG, Chiu Ping; YEH, Kai Wun. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 65–75, 2010. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00466.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-7652.2009.00466.x>. Acesso em: 23 jun. 2021.

SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; AHMAD, Afaque; SAMAL, Roopa Rani; KUMAR, Sarita; FATIMA, Sadaf. **Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor** *Acta Ecologica Sinica* Science Press, , 2018. DOI: 10.1016/J.CHNAES.2018.01.002.

SHAO, Jun; ZHAO, Mingzhi; TONG, Mancy; WEI, Jia; WISE, Michelle R.; STONE, Peter; CHAMLEY, Lawrence; CHEN, Qi. Increased levels of HMGB1 in trophoblastic debris may contribute to preeclampsia. **Reproduction**, [S. l.], v. 152, n. 6, p. 775–784, 2016. DOI: 10.1530/REP-16-0083. Disponível em: www.reproduction-online.org. Acesso em: 28 jun.

2021.

SILVA-JÚNIOR, Neilier R.; CABRERA, Yaremis M.; BARBOSA, Samuel L.; BARROS, Rafael de A.; BARROS, Edvaldo; VITAL, Camilo E.; RAMOS, Humberto J. O.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. e21792, 2021. DOI: 10.1002/arch.21792. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21792>. Acesso em: 13 maio. 2021.

SILVA-JUNIOR, Neilier Rodrigues; OLIVEIRA, Maria Goreti de Almeida. Cinética De Inibição Das Proteases Digestivas De *Anticarsia Gemmatalis*. [S. l.], p. 79–95, 2021. DOI: 10.37885/210203132.

SIN, Suk Fong; CHYE, Mee Len. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. **Planta**, [S. l.], v. 219, n. 6, p. 1010–1022, 2004. DOI: 10.1007/s00425-004-1306-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-004-1306-6>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, Molecular Biology Research Laboratory, Department of Zoology, Deshbandhu College, University of Delhi, Kalkaji, New Delhi, India. DOI - 10.1111/1744-7917.12641 SRC - Pubmed ID2 - 30230264 FG - 0, v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12641>. Acesso em: 27 maio. 2021.

STROUD, R. M.; KOSSIAKOFF, A. A.; CHAMBERS, J. L. **Mechanisms of zymogen activation. Annual review of biophysics and bioengineering** Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , , 1977. DOI: 10.1146/annurev.bb.06.060177.001141. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bb.06.060177.001141>. Acesso em: 2 jul. 2021.

TELANG, Manasi et al. Bitter gourd proteinase inhibitors: Potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 643–652, 2003. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00239-5.

THOMAS, John C.; ADAMS, Deanna G.; KEPPELNE, Veronique D.; WASMANN, Catherine C.; BROWN, Judith K.; KANOST, Michael R.; BOHNERT, Hans J. Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 758–762, 1995. DOI: 10.1007/BF00232917. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00232917>. Acesso em: 22 jun. 2021.

TURRÀ, David; BELLIN, Diana; LORITO, Matteo; GEBHARDT, Christiane. Genotype-dependent expression of specific members of potato protease inhibitor gene families in different tissues and in response to wounding and nematode infection. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 166, n. 7, p. 762–774, 2009. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.10.005.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. **Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms** *Biochemistry (Moscow)* Springer, , 2004. DOI: 10.1007/s10541-005-0015-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10541-005-0015-5>. Acesso em: 28 jun. 2021.

XU, Zeng Fu; QI, Wen Qing; OUYANG, Xue Zhi; YEUNG, Edward; CHYE, Mee Len. A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 727–738, 2001. DOI: 10.1023/A:1013623628857.

ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory effect of protease inhibitors on larval midgut protease activities and the performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 10, n. JAN, p. 1–9, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01963/full>. Acesso em: 30 jun. 2021.

ZHAO, Jian; EE, Kah Yaw. Protease inhibitors. *In: Encyclopedia of Food Chemistry*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 253–259. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21749-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120913022501055>. Acesso em: 2 jun. 2021.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-010814-020816>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CAPÍTULO II - Perfil de proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* e sua ligação a inibidores

ARTIGO I - Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors - Publicado na revista *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Ed. Wiley - <https://doi.org/10.1002/arch.21792>

Perfil de proteases intestinais de *Anticarsia gemmatalis* e sua ligação a inibidores

RESUMO

Embora a importância das hidrolases intestinais seja reconhecida, há pouca informação sobre o proteoma intestinal de lepidópteros como *Anticarsia gemmatalis*. Assim, realizamos a análise proteômica do intestino de *A. gemmatalis* para caracterizar as proteases por LC/MS. Examinamos as interações de proteínas identificadas com inibidores de protease (IP) usando *docking* molecular. Encontramos 54 unigenes expressos para protease intestinal, sugerindo múltiplas isoformas importantes. O arsenal hidrolítico apresentado permite uma compreensão mais abrangente da alimentação de insetos. A análise de *docking* mostrou que o IP de soja (SKTI) pode se ligar eficientemente às sequências de tripsina e, portanto, a resistência do inseto não parece envolver a alteração das sequências do sítio de ligação do IP. Além disso, um SERPIN (inibidor de serino protease) foi identificada e a análise de interação mostrou que o sítio de ligação do inibidor está em contato com o sítio catalítico da tripsina, possivelmente atuando como regulador. Além disso, esta SERPIN e as sequências de IP identificadas podem ser alvos para o controle da atividade proteolítica no intestino da lagarta e servir de suporte para o desenho racional de uma molécula com maior estabilidade, menos propensa à clivagem por proteases e viável para o controle de pragas de insetos, como *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: controle de pragas, *docking* molecular, hidrolase intestinal, inibidor de protease, perfil LC/MS, proteômica.

Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors

ABSTRACT

Although the importance of intestinal hydrolases is recognized, there is little information on the intestinal proteome of lepidopterans such as *Anticarsia gemmatalis*. Thus, we carried out the proteomic analysis of the *A. gemmatalis* intestine in order to characterize the proteases by LC/MS. We examined the interactions of proteins identified with protease inhibitors (PI) using molecular docking. We found 54 expressed unigenes for intestinal protease, suggesting multiple important isoforms. The hydrolytic arsenal featured allows for a more comprehensive understanding of insect feeding. The docking analysis showed that the soybean PI (SKTI) could bind efficiently with the trypsin sequences and, therefore, insect resistance does not seem to involve changing the sequences of the PI binding site. In addition, a SERPIN (serine protease inhibitors) was identified and the interaction analysis showed the inhibitor binding site is in contact with the catalytic site of trypsin, possibly acting as a regulator. In addition, this SERPIN and the identified PI sequences can be targets for the control of proteolytic activity in the caterpillar intestine and serve as a support for the rational design of a molecule with greater stability, less prone to cleavage by proteases and viable for the control of insect pests such as *A. gemmatalis*.

Key words: intestinal hydrolase, LC/MS profile, molecular docking, pest control, protease inhibitor, proteomics.

1. INTRODUÇÃO

Insetos da ordem Lepidoptera estão entre os que mais afetam negativamente a produtividade agrícola no mundo (LI et al., 2020; ROMANAZZI et al., 2020). A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal praga desfolhadora da soja (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabaceae), causando severos danos nas fases reprodutiva e vegetativa da planta (DE CASTRO et al., 2013; LIMA et al., 2020a; WALKER et al., 2000).

Diante desse desafio, o controle de pragas agrícolas tem se concentrado no uso de inseticidas sintéticos nas últimas décadas (BADRAN et al., 2016; BEL et al., 2019). No entanto, seu uso excessivo e indiscriminado trouxe diversos problemas ambientais, contaminando as águas subterrâneas e comprometendo a cadeia alimentar com consequências para a saúde humana (CAMPOS et al., 2019; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; SOUSA et al., 2020). Além da toxicidade desses agrotóxicos para indivíduos não-alvo, insetos-praga resistentes têm sido selecionados, chamando a atenção para a busca urgente de alternativas de controle (COELHO et al., 2020; TAVARES et al., 2010). Os programas de Manejo Integrado de pragas (MIP) surgiram nesse contexto para reduzir o uso de agroquímicos sintéticos e os danos ambientais causados por eles (PANIZZI, 2013).

Mais recentemente, bioinseticidas como a toxina *Bacillus thuringiensis* (Bt) (BADRAN et al., 2016; BEL et al., 2019), metabólitos secundários (fitoquímicos) (GOMEZ et al., 2018; GÓMEZ et al., 2020; LOURENÇO et al., 2018) e inibidores de protease (IP) específicos para pragas-alvo têm ganhado destaque como alternativas no controle de insetos, minimizando efeitos tóxicos em outros animais e no meio ambiente (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; MERIÑO-CABRERA et al., 2018; PILON et al., 2017). Os IPs são produzidos naturalmente como estratégia de resposta para as plantas, desenvolvidos ao longo do processo evolutivo (COTABARREN et al., 2020; SINGH et al., 2020). Quando a planta é submetida à herbivoria, sua maquinaria de resposta leva à produção de IP pela via da lipoxigenase (FEUSSNER; WASTERACK, 2002; GARDNER, 1991; LIMA DE CARVALHO et al., 1999; RYAN, 1990; THAKUR; UDAYASHANKAR, 2019), levando à formação do ácido jasmônico. Esse hormônio vegetal ativa genes responsáveis pela produção de IP, que pode ocorrer local ou sistemicamente. Ao atingir o intestino do inseto, os IPs se ligam a proteases específicas e comprometem a digestibilidade do inseto, reduzindo a absorção de aminoácidos essenciais da dieta. Consequentemente, o equilíbrio nutricional prejudicado afeta o desenvolvimento do inseto, o que pode levar à morte (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Os inibidores endógenos de serino-proteases são amplamente encontrados em tecidos animais. As SERPINs formam uma grande classe de inibidores de proteases, sendo principalmente intracelulares e sofrendo uma mudança única na forma quando inibem as proteases alvo (SANRATTANA; MAAS; DE MAAT, 2019). Em animais, esses IPs regulam processos como coagulação, inflamação e imunidade (LUCAS et al., 2018). Até agora, as SERPINs de artrópodes conhecidas estão envolvidas na imunidade dos insetos (ABRAHAM et al., 2005). No entanto, alguns inibidores de insetos SERPIN podem se ligar a enzimas hidrolíticas e bloquear o acesso do substrato à região do centro ativo (TOUBARRO et al., 2013). Portanto, essas moléculas podem ser alvo de estudos moleculares como uma nova alternativa no controle de pragas.

Os insetos expressam múltiplas isoformas de importantes enzimas digestivas. Essa redundância funcional visa contornar o efeito tóxico dos IPs da planta (LOMATE; HIVRALE, 2011), além de ter um papel importante na adaptação do inseto à variação protéica da dieta (CRAVA et al., 2013; KOTKAR et al., 2009). Nesse sentido, conhecer quais isoformas de proteases estão presentes no intestino do inseto praga é fundamental para que IPs eficientes possam ser propostos racionalmente. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar e descrever as proteases do intestino de *A. gemmatalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Insetos e preparação da dieta artificial*

As lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas do Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil e mantidas sob condições controladas de 25 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h. As lagartas foram alimentadas após a eclosão dos ovos até atingirem o quinto instar de desenvolvimento larval em uma dieta artificial composta por 15,6 g de levedura de cerveja, 25 g de gérmen de trigo, 31,2 g de feijão, 25 g de proteína de soja, 12,5 g de caseína, 2,5 mL de solução de vitaminas (1,2% ácido ascórbico, 0,03% pantotenato de cálcio, 0,015% niacina, 0,008%, riboflavina, 0,004% tiamina e 0,004% HCl) e 10 g de ágar (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976).

2.2. *Extração de proteína do intestino da lagarta e quantificação*

Os intestinos de lagartas no quinto ínstar foram dissecadas e colocadas em 1 mL de solução de ácido clorídrico 10^{-3} M a 4 °C, sempre mantendo a proporção de cinco intestinos por 1 mL de solução. A lise celular foi realizada para obter o extrato proteico contendo as enzimas protolíticas resultantes de três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, seguido de maceração em TissueLyser II (Qiagen). O extrato foi centrifugado a 10000 g por 30 min a 4 °C, e os pellets foram descartados. Os sobrenadantes contendo o material solúvel foram separados e armazenados a -20 °C.

2.3. *Fracionamento de PEG*

Parte do extrato bruto do intestino de lagartas no quinto ínstar foi fracionado com polietilenoglicol (PEG) para separação das proteínas de baixa e alta abundância antes da análise de 1DE-LC/MS (Figura 1). Para isso, foram adicionados 10 mL do extrato bruto em 10 mL de solução aquosa de PEG4000 a 30%. A solução foi misturada em vórtex por 30 s, mantida em gelo por 30 min e centrifugada a 3200 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante, contendo proteínas de baixa abundância, foi coletado e armazenado a -20 °C até análise posterior. O pellet foi ressuspensão com 10 mL de ácido tricloroacético a 20% (TCA). Posteriormente, foi centrifugado a 6000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado e o pellet foi ressuspensão e lavado por dois ciclos com 80% de acetona em gelo e centrifugado a 6000 g por 10 min a 4 °C. Por fim, o pellet foi lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. As diferentes

frações foram usadas em corridas eletroforéticas. As concentrações de proteínas das amostras de extrato bruto e precipitação com PEG foram quantificadas pelo ensaio de Bradford (1976). Uma curva padrão foi preparada com concentrações crescentes de albumina sérica bovina (BSA) entre 0 e 15 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

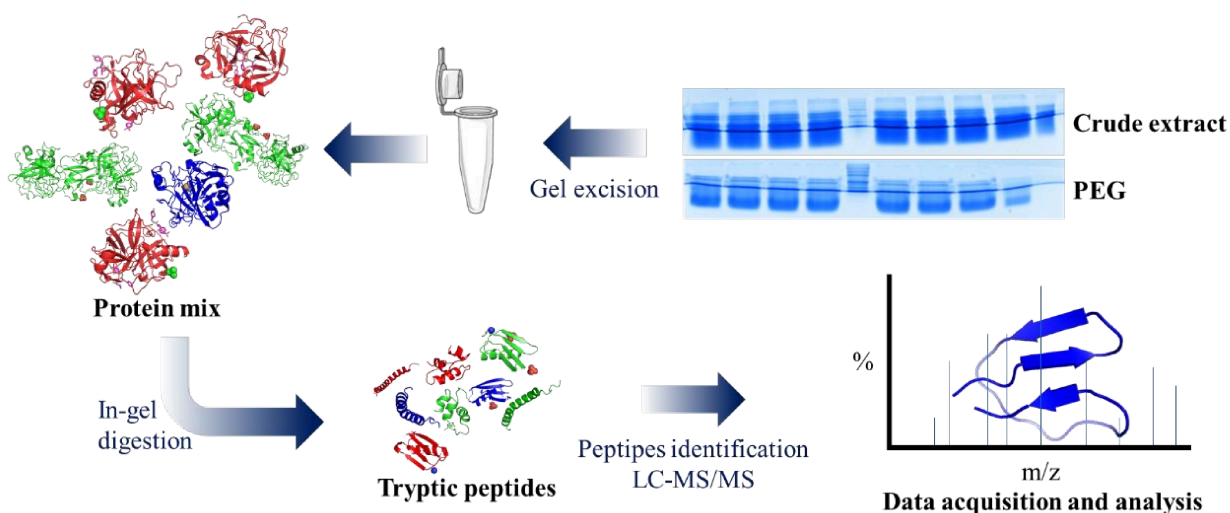


Figura 1. Workflow mostrando a estratégia utilizada para caracterização do proteoma intestinal dos cartilágeos por 1DE-LC/MS. Os géis contendo amostras de extrato bruto e tratados com PEG. As regiões de gel coradas foram excisadas e agrupadas em três, constituindo uma repetição. Cada repetição foi digerida separadamente e os peptídeos tripticos identificados por LC-MS/MS.

2.4. Géis short-run

Proteínas de baixa e alta abundância foram aplicadas nos géis de poliácridamida unidimensional (1DE) antes da digestão triptica (Figura 1). A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes de acordo com o método de Laemmli (1970). O gel de separação utilizado tinha 1,5 mm de espessura e tinha uma concentração de 10% de poliácridamida tamponada em Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Cada canal recebeu 50 μg de proteínas totais, oriundas de amostras previamente fervidas com tampão de amostra composto por Tris-HCl 277,8 mM, pH 6,8, glicerol 44,4% e SDS 4,4%. A corrida eletroforética ocorreu a 200 V até que as proteínas entrassem 1,0 cm no gel de separação e a corrida foi interrompida. O gel foi fixado em solução aquosa de metanol 10% e ácido acético 5% por 2 h com agitação. A coloração foi realizada na solução de coomassie G250 por 48 h.

2.5. Digestão em gel e espectrometria de massa para identificação de proteases

As regiões dos géis contendo proteínas foram excisadas e procedeu-se às etapas de digestão trípica, conforme mostrado na Figura 1. As fatias do gel extirpado foram descoloridas em bicarbonato de amônio 50 mM e metanol 50% (v/v), seguido de adição de acetonitrila para desidratação. As proteínas foram então reduzidas pela adição de 200 mM de solução de ditioneitol (DTT) em 100 mM de bicarbonato de amônio por 30 min de incubação a 56 °C, seguido de alquilação com 200 mM de solução de iodoacetamida contendo 100 mM de bicarbonato de amônio por 30 min em ambiente temperatura. Os pedaços de gel contendo proteínas foram lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM, desidratados com acetonitrila e secos por centrifugação a vácuo. Os géis foram reidratados usando solução de digestão com tripsina durante a noite (20 h) a 37 °C. Os peptídeos digeridos foram extraídos usando um tampão de extração (50% de acetonitrila, 5% de ácidos fórmicos) e secos usando centrifugação a vácuo. As amostras foram dessalinizadas usando C18 ZipTips (Millipore) e secas por centrifugação a vácuo.

Os peptídeos foram dissolvidos em 20 µL de ácido fórmico a 0,1% e analisados usando um sistema UPLC nanoAcquity (Waters) equipado com uma armadilha (nanoAcquity UPLC 2G-V/MTrap 5 µm Symmetry C18 180 µm x 20 mm) e uma coluna analítica (nanoAcquity UPLC 1,7 µm BEH130 100 µm x 100 mm) operando a uma vazão de 0,3 µL min⁻¹. O solvente utilizado foi: (A) ácido fórmico 0,1% em água e (B) ácido fórmico 0,1% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B: 0/2; 1/2; 300/30; 305/85; 310/85; 315/2; 320/2. Os peptídeos eluídos foram injetados automaticamente em um espectrômetro de massa Q-ToF MAXIS 3G (Bruker Daltonics) usando uma agulha de ionização nanoESI (CaptiveSpray), gás seco 3 L min⁻¹, a 150 °C, 2.000 V.

A varredura dos íons do espectrômetro de massas foi realizada entre 300 e 1.500 m/z no modo positivo, e os dados foram adquiridos através de análise por cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS/MS). O espectrômetro de massa operou no modo auto-MSn. A aquisição dos dados do instrumento LC/MS foi controlada usando o software Hystar (Bruker Daltonics) e os espectros foram processados com o software Data Analysis (Bruker) usando as configurações padrão para proteômica. Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7.0 com licença de cliente local, conectado a um servidor remoto para identificação de proteínas. Os parâmetros utilizados no programa foram: um banco de dados de ESTs traduzidos do intestino médio de *A. gemmatalis*, contendo contigs de DNA de sequências de RNA transcritas (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/308354); oxidação de metionina como uma

modificação variável da carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa; uma clivagem perdida, estados de carga de 2⁺, 3⁺ e 4⁺; enzima de clivagem tripsina-*like* e um erro de massa de 50 ppm. Para identificação de proteínas, consideramos uma taxa de falsa descoberta (FDR) inferior a 1,0%, juntamente com pelo menos três peptídeos únicos.

2.6. Anotação funcional da proteína identificada

A lista filtrada de ORFs identificadas por LC/MS do banco de dados de ESTs de *A. gemmatalis* foi exportada do pacote Peaks como um arquivo fasta e usada como entrada para uma pesquisa de homologia contra o banco de dados de genes *Bombyx mori*. As sequências de DNA exportadas foram alinhadas usando a ferramenta blastn do Lepbase (o banco de dados do genoma de lepidópteros, <http://blast.lepbase.org/>) usando parâmetros de pesquisa padrão. Selecionamos todos os genes que codificam para hidrolase e IP. Posteriormente, as saídas que obtiveram maior pontuação foram peneiradas manualmente para garantir melhor precisão e cancelar redundâncias nas identificações. Os nomes e classificações funcionais das proteínas homólogas descritas para *B. mori* foram extraídos de UniProt e Lepbase.

2.7. Alinhamento de múltiplas sequências e reconstrução filogenética

Para explorar a diversidade de sequências e analisar a variabilidade de sequências, especialmente para tripsina ativa e regulatória, os limites de consenso do domínio central de tripsina nas sequências, incluídas nas análises filogenéticas, foram determinados a partir de sequências completas identificadas na parte anterior. Para isso, foram combinadas as saídas do Pfam (FINN et al., 2016) e do ScanProsite (DE CASTRO et al., 2006) ferramentas de busca de previsão de domínio de proteína. As sequências de resíduo de aminoácidos de tripsina foram alinhadas com a estrutura tridimensional resolvida usando PROMALS3D (PEI; KIM; GRISHIN, 2008), um programa de alinhamento de sequência múltipla que incorpora informações estruturais para melhorar a precisão do alinhamento.

A reconstrução filogenética implementada para a análise de várias tripsinas de *A. gemmatalis* foi realizada pelo PhyML, um programa baseado em máxima verossimilhança (ML) que otimiza uma árvore de junção de vizinhos de sementes usando um algoritmo simples de escalada, implementado no servidor Phylogeny.fr (http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/alacarte.cgi) (DEREEPER et al., 2010). A árvore de proteínas foi visualizada e otimizada com a ferramenta TreeDyn também implementada no servidor Phylogeny para web. O programa ConSurf (LIMA et al., 2020a) foi empregado para

estimar a conservação de resíduos de aminoácidos de tripsina de *A. gemmatalis*. Para este propósito, a saída de alinhamento de múltiplas sequências de todas as sequências de aminoácidos homólogas de tripsina analisadas neste estudo foi usada como entrada para o programa para projetar os graus de conservação de resíduos na estrutura tridimensional conhecida da tripsina *A. gemmatalis* 2 (XM_004928940.1).

2.8. Modelagem e docking molecular

Além das hidrolases identificadas pela análise do proteoma intestinal de *A. gemmatalis*, foi identificado um inibidor de serino-protease (SERPIN) e seu potencial de inibição de tripsinas foi avaliado por meio de análise de interação usando modelagem proteica e *docking* molecular. O Inibidor de Tripsina Soybean Kunitz (SKTI) foi usado como proteína de controle para comparar a força e o tipo de interação da SERPIN endógena. As estruturas tridimensionais foram previstas para as 13 sequências tripsina-*like* e as duas proteínas inibidoras (SERPIN e SKTI) usando o servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015). Esta técnica tem aproximadamente 80% de precisão se o backbone estiver correto (KELLEY et al., 2015). A qualidade dos modelos foi medida pela avaliação da geometria e estereoquímica, distribuição de energia e outras características dos modelos 3D usando o pacote de análise PROSA (Protein Structure Analysis) do servidor web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) e analisar Ramachandran Plot.

O encaixe entre tripsinas e inibidores foi realizado por meio do programa CLUSPRO (KOZAKOV et al., 2013, 2017), ficando no total de 26 sistemas ancorados. O modo de ligação entre inibidores e proteínas foi visualizado e analisado usando o programa PyMOL (Sistema de Gráficos Moleculares, Versão 2.0 Schrödinger, LLC). A conservação de aminoácidos de inibidores envolvidos em potenciais interações com as tripsinas foi realizada utilizando o servidor WebLogo (CROOKS et al., 2004).

3. RESULTADOS

3.1. Tratamento de amostras, SDS-PAGE e identificação

Foi possível verificar diferença nos padrões protéicos entre o extrato bruto (A) e após a precipitação com PEG (B) (Figura 2), mostrando que o tratamento da amostra com PEG foi eficiente. Além disso, a eficiência do fracionamento do PEG também pode ser verificada nos

cromatogramas (Figura 3). Os cromatogramas obtidos para as amostras de extrato bruto (Figura 3A) e precipitadas com PEG (Figura 3B) apresentaram perfis diferentes.

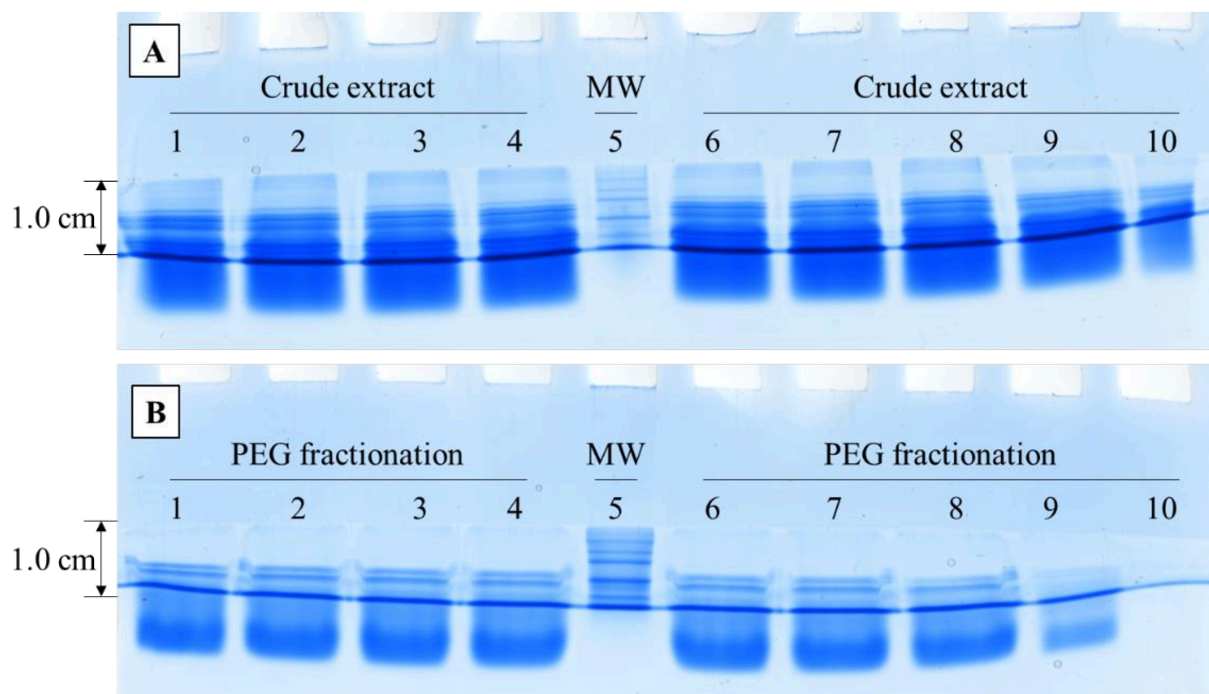


Figura 2. Análise de proteínas por uma estratégia SDS-PAGE de curto prazo de intestinos de *Anticarsia gemmatalis*. Na canaleta 5, padrão de peso molecular. Nas canaletas 1-4 e 6-10, proteínas do extrato bruto (A) e fracionamento com PEG (B).

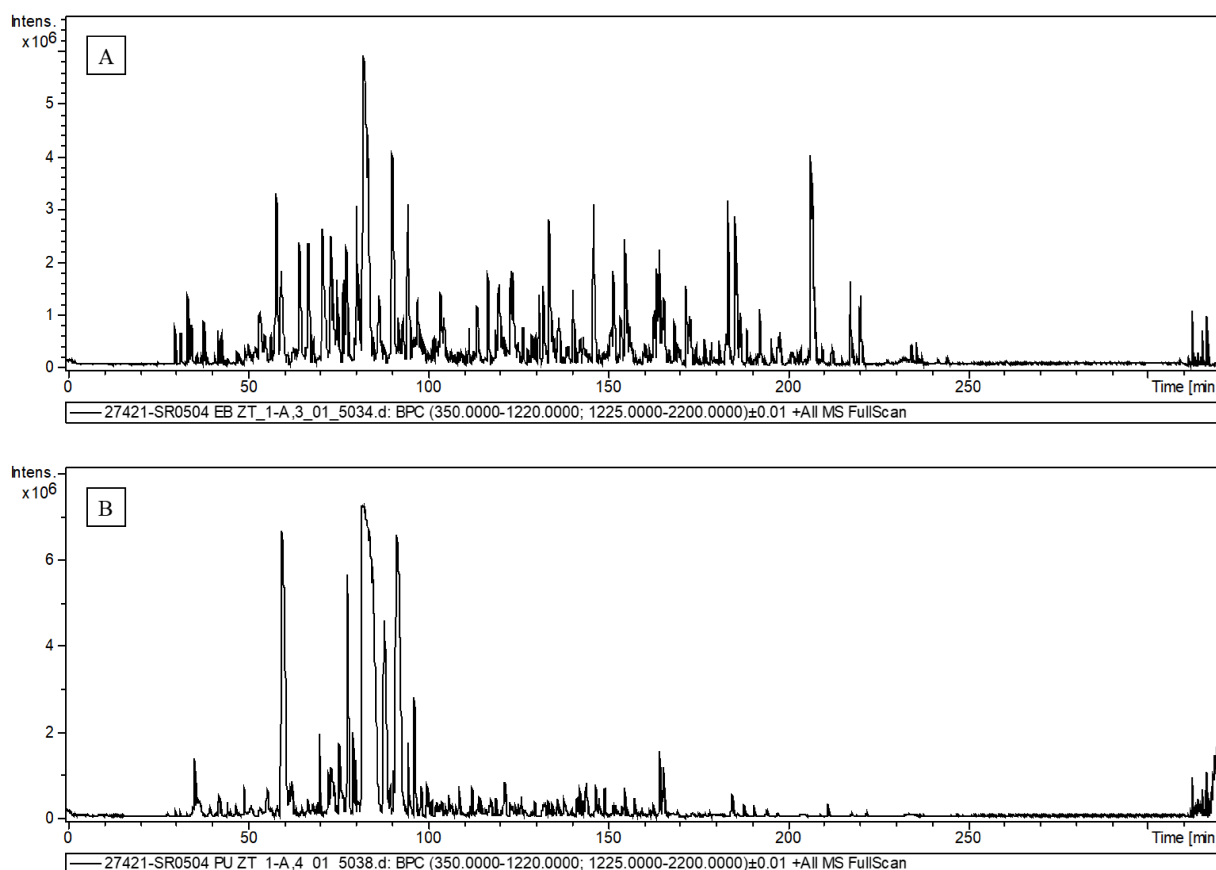


Figura 3. Cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos da plataforma LC-MS/MS de amostras complexas de extrato bruto (A) e após fracionamento com PEG (B).

A análise de ambas as amostras foi realizada separadamente por LC/MS, que revelou um total de 572 ORFs usando transcritos de *A. gemmatalis* como referência. Quando comparado ao banco *Bombyx mori*, foram identificadas 219 proteínas homólogas não redundantes. Dezessete e cinco isoformas foram identificadas para tripsina e quimotripsina, respectivamente (Tabela 1). Identificamos 43 serino-proteases (EC 3.4.12 e 3.4.16), correspondendo a 79% das proteases identificadas e caracterizadas. Ao todo, identificamos 98 hidrolases (EC 3), 6 IP e 13 proteínas não caracterizadas (Figura 4). Das 98 hidrolases identificadas, 54 correspondem a peptidases (EC 3.4).

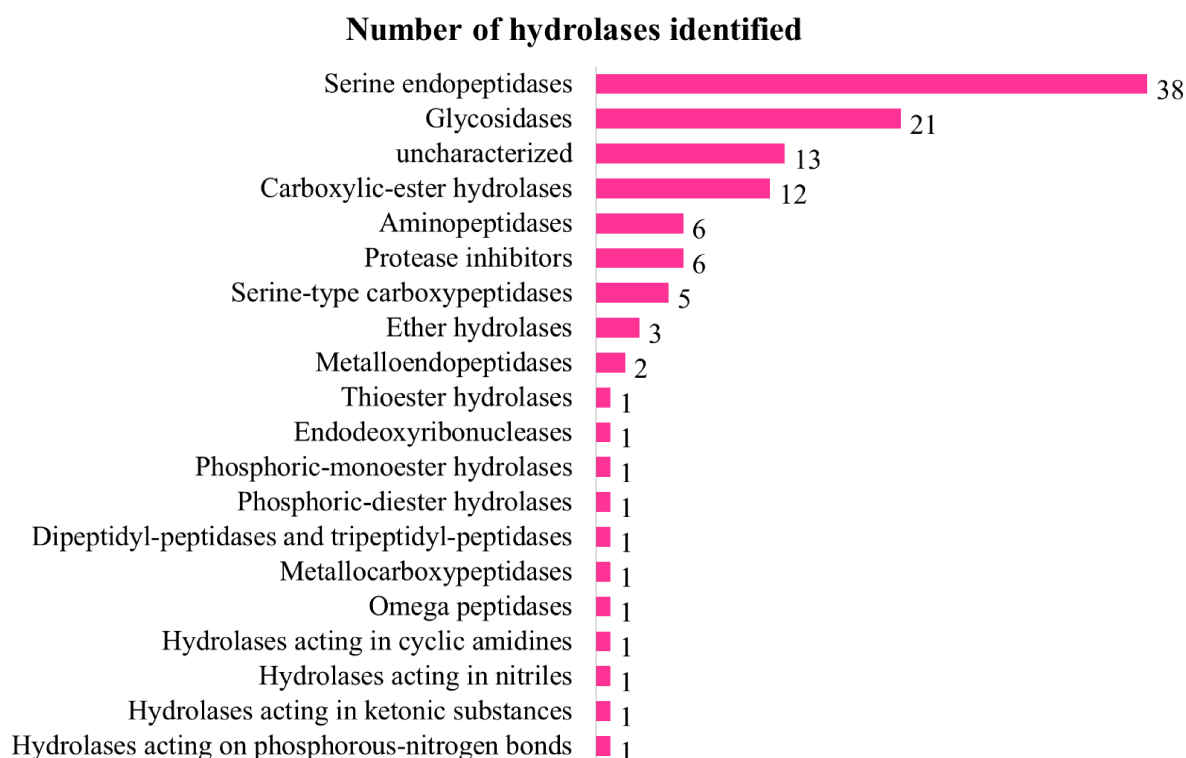


Figura 4. Classificação funcional das hidrolases identificadas por LC/MS de acordo com EC (classificação enzimática) em nível de subclasse.

Além de agrupar as hidrolases em suas respectivas subclasses, também classificamos as proteínas identificadas com função conhecida em 5 funções, com base na Gene Ontology (GO). Aqueles com função celular desconhecida corresponderam a 11%. A partir dessa classificação funcional, observamos que 31% das proteínas identificadas estão relacionadas a processos metabólicos e de sinalização celular (Figura 5), como proteínas ribossômicas, sinalização de membrana e envolvidas na respiração celular. As enzimas secretadas constituíram a fatia mais expressiva das proteínas identificadas (53%). As proteínas transmembranares representaram 2% das identificações e contêm isoformas de serino-proteases que contribuem substancialmente para a atividade proteolítica total no intestino da lagarta que é o foco principal deste trabalho. As proteínas estruturais e de reserva representaram 1% das identificadas (Figura 5).

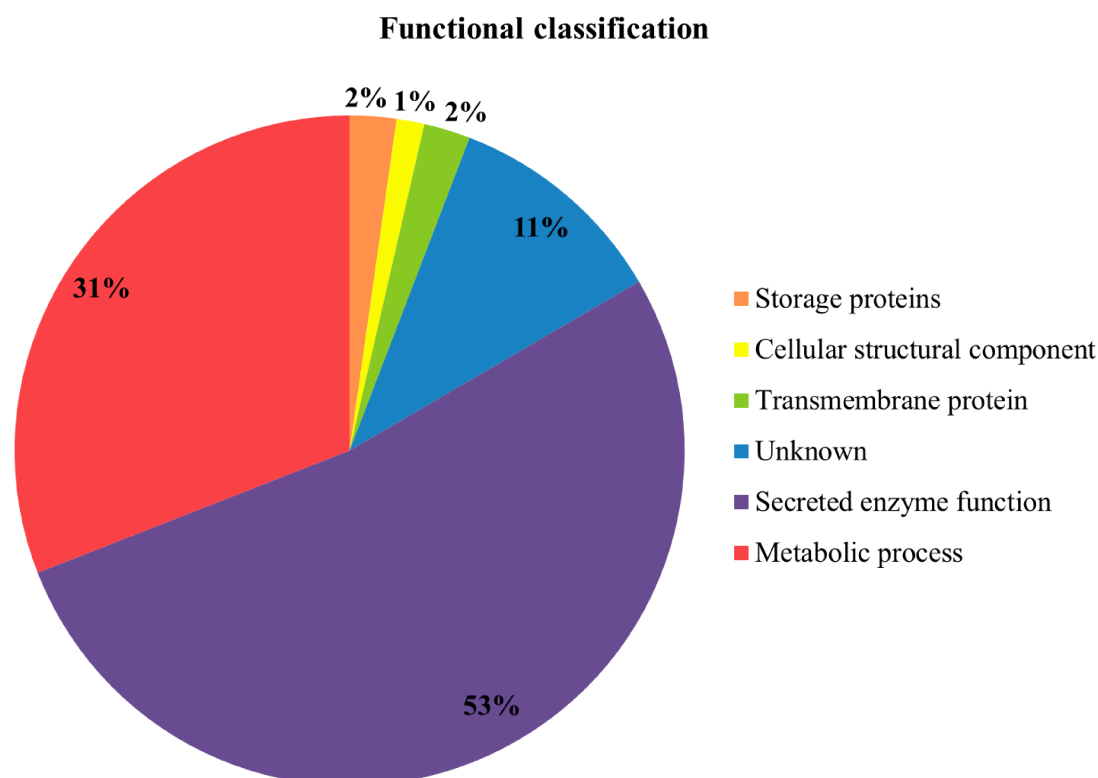


Figura 5. Classificação ontológica e funcional das enzimas identificadas no intestino de *Anticarsia gemmatalis*.

3.2. Múltiplas sequências de alinhamento e reconstrução filogenética

Como a maior porcentagem de proteínas identificadas foi representada por serina endopeptidases (34,5%), e desse grupo de proteínas todas eram enzimas tripsina-like, elas foram escolhidas para posterior análise estrutural por sua alta expressão no intestino de *A. gemmatalis* e possível alvos de inibição.

Para a visualização dos resultados foi utilizada apenas uma tripsina (NM_001043572.1), mas todas as análises foram feitas em todas as 13 sequências identificadas.

Nossa inspeção da sequência múltipla e alinhamento de estrutura usando Promals3D com 13 tripsinas de inseto *A. gemmatalis* mostrou os resíduos invariantes da tríade catalítica do sítio ativo (Figura 6). A primeira linha de cada bloco (Figura 6) mostra os índices de conservação para posições com índice de conservação acima de 4, quando 9 é o valor máximo. Os índices de conservação pelos resíduos catalíticos foram 6, 9 e 8 pelo His, Asp e Ser, respectivamente. A estrutura secundária prevista por Asp e Ser por consenso foi a fita Beta (e), e His faz parte de uma alfa-hélice (h) (Figura 6).

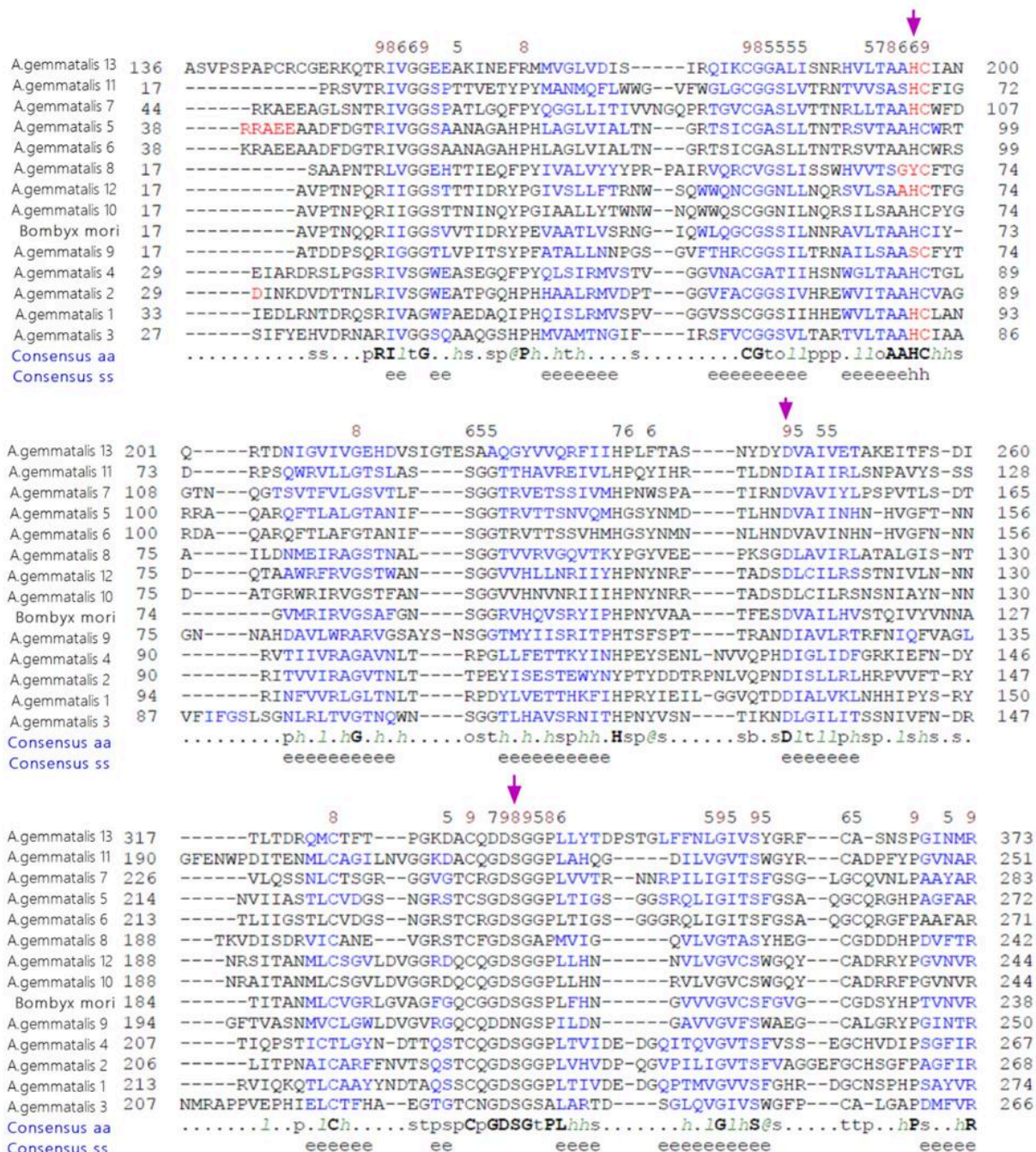


Figura 6. Alinhamentos múltiplo das 13 sequências da sequência de *Anticarsia gemmatalis* e *Bombyx mori* de acordo com a estrutura secundária utilizando o servidor Promals3D (<http://prodata.swmed.edu/promals/promals.php>). As letras em negrito mostram as alterações de aminoácidos.

Para examinar as relações entre as proteínas tripsina identificadas no intestino de *A. gemmatalis* e tripsina de *B. mori*, 14 sequências foram alinhadas e usadas para construir uma

filogenia (Figura 7A). A análise filogenética revelou que essas sequências agruparam-se em clados distintos separados com alto suporte bootstrap (acima de 0,7) (Figura 7A). No geral, o alinhamento da sequência de *A. gemmatalis* exibe vários resíduos de aminoácidos altamente conservados, como mostrado na análise de consurf (Figura 7B). O grau de conservação dos três aminoácidos cataliticamente importantes é mostrado na estrutura tridimensional prevista da tripsina de *A. gemmatalis* (Figura 7B) onde eles parecem estar na região mais conservada.

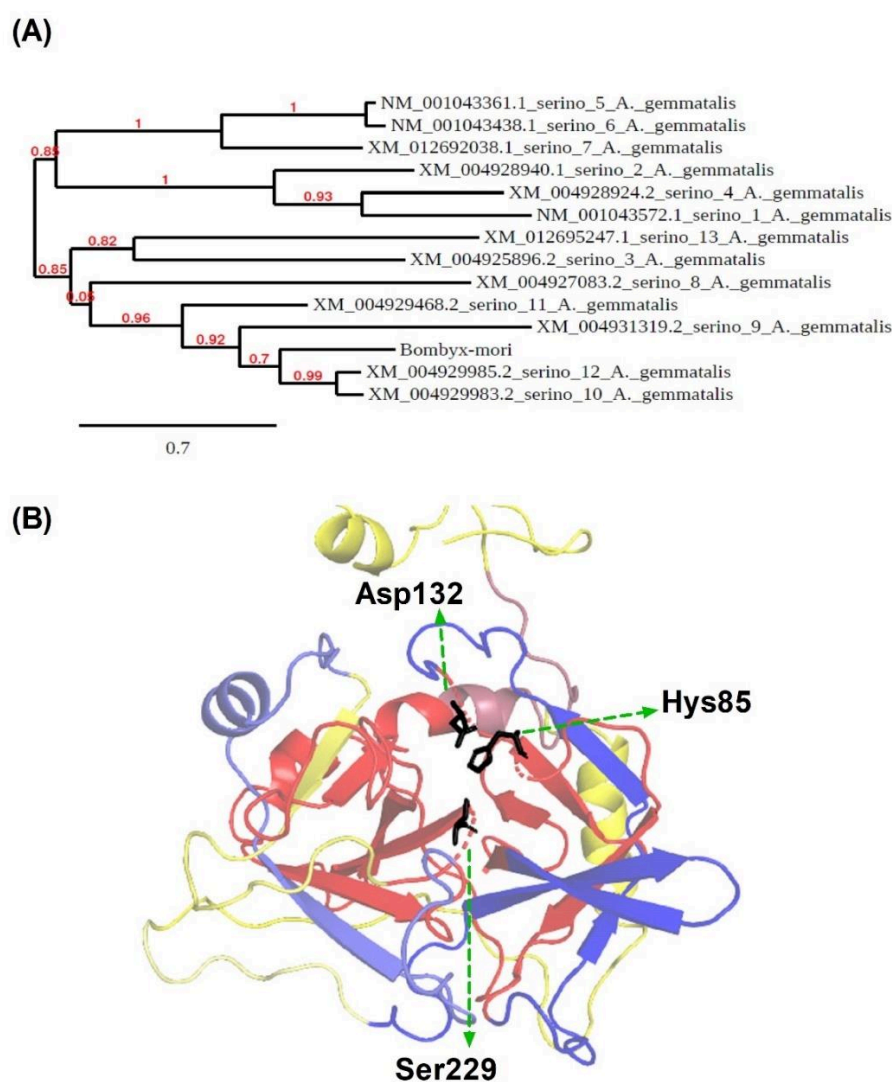


Figura 7. A. Árvore filogenética: uma árvore de inferência bayesiana não enraizada construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos apresentadas na Figura 6. B. Estrutura terciária da tripsina de *A. gemmatalis* 1 identificada neste estudo (NM_001043572.1). Visualização gráfica da proteína codificada por cores por pontuação de conservação, onde a região em vermelho corresponde à região mais conservada. A tripsina é representada como um desenho animado. Os três resíduos de aminoácidos conservados (His, Asp e Ser) estão indicados em bastões. Apenas uma (NM_001043572.1) das estruturas de tripsina é usada para visualização como modelo de consenso das 13 sequências identificadas, mas todas as análises foram realizadas para todas as sequências.

3.3. Previsão da estrutura terciária e avaliação dos modelos

A modelagem tridimensional de todas (13 sequências) tripsinas de *A. gemmatalis* foi estimada pelo Protein Homology/analogY Recognition Engine 2.0 (PHYRE2) (Figuras 8A e 8B). PHYRE2 usa correspondência de perfil-perfil e estrutura secundária para a previsão da estrutura terciária. Este servidor também usa o alinhamento de modelos ocultos de Markov via HHsearch (SÖDING, 2005; SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005) para melhorar significativamente a precisão do alinhamento e a taxa de detecção. Os modelos das tripsinas por PHYRE2 foram previstos com 100% de confiança e identidade acima de 30% (Tabela S1).

A primeira validação da qualidade estereoquímica foi realizada usando a análise do gráfico de Ramachandran computada com PROCHECK verificando resíduo por resíduo das estruturas proteicas. A análise mostrou que os resíduos de tripsinas de *A. gemmatalis* na região mais favorecida adicionados à região permitida estavam acima de 95% e a região outlier estava entre 3,7 e 1,9% (Tabela S1). O gráfico revelou que a estrutura terciária de todas as tripsinas possui uma boa estereoquímica de cadeias.

A energia de interação por resíduo também foi calculada pelo programa PROSA. O PROSA Z-Score mostra a qualidade geral do modelo. A análise global das tripsinas modelo com PROSA mostrou um Z-Score entre -2,51 a -6,19 (Tabela S1), não mostrando desvio significativo das estruturas nativas típicas de tamanho semelhante ao modelo.

3.4. Docking proteína-proteína

Para examinar as interações entre as tripsinas e os inibidores de proteínas (SERPIN e SKTI), estudos computacionais foram realizados usando o servidor de *docking* online ClusPro (KOZAKOV et al., 2017) para identificar potenciais sítios de interação nas proteínas. Para cada encaixe, o software produziu os 10 principais modelos de ligação. O melhor modelo foi escolhido de acordo com os resultados das análises de validação PROSA, Ramachandran, Verify3D, WHATCHECK e a pontuação ponderada dada pelo ClusPro (Tabela S1). Após o alinhamento das sequências de tripsina, os aminoácidos do sítio catalítico foram identificados e verificada sua participação na interação com cada inibidor (Figuras 8 e 9). Todas as tripsinas se ligam a inibidores (SKTI e SERPIN) através de resíduos do sítio de especificidade S1 ou resíduos da tríade catalítica.

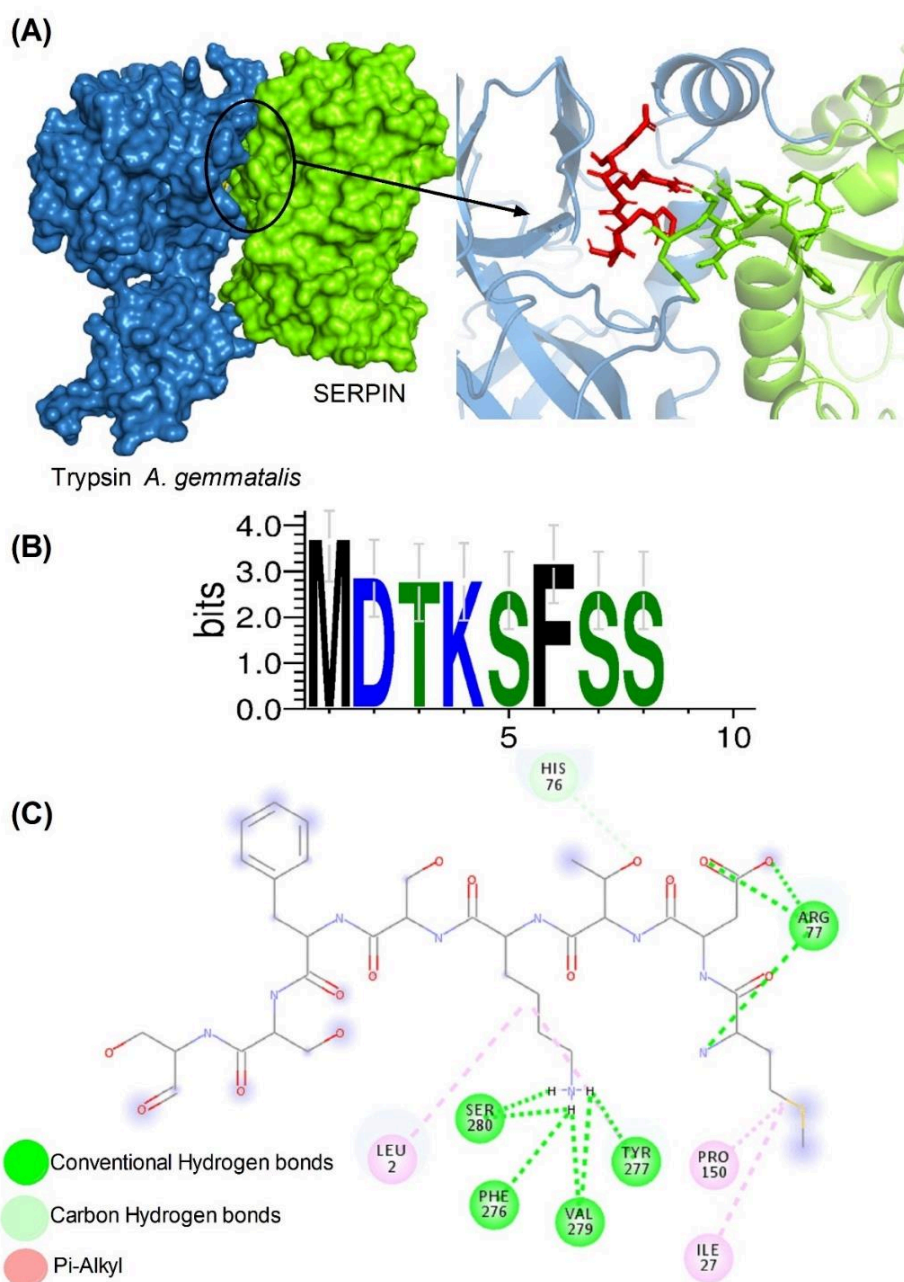


Figura 8. Uma visão geral e local da melhor posição de ancoragem do inibidor de serino-proteases (SERPIN) que se liga à tripsina digestiva de *Anticarsia gemmatalis*. Forma da superfície representando a tripsina em azul e a SERPIN em verde. À direita, aminoácidos catalíticos em bastões vermelhos e os resíduos reativos como bastões verdes envolvidos na interação tripsina-SERPIN. B. Logo da sequência dos motivos reativos mais representativos presentes na SERPIN que se ligam às tripsinas de *Anticarsia gemmatalis*. A altura de cada letra é proporcional à frequência do resíduo correspondente naquela posição. C. Perfil farmacofórico do complexo SERPIN-tripsina após *docking* molecular. A bola colorida e a linha pontiaguda indicam o tipo de interação entre a sequência reativa da SERPIN e a cadeia lateral dos resíduos da tripsina. Apenas uma (NM_001043572.1) das estruturas de tripsina é usada para visualização como modelo de consenso das 13 sequências identificadas, mas todas as análises foram realizadas para todas as sequências.

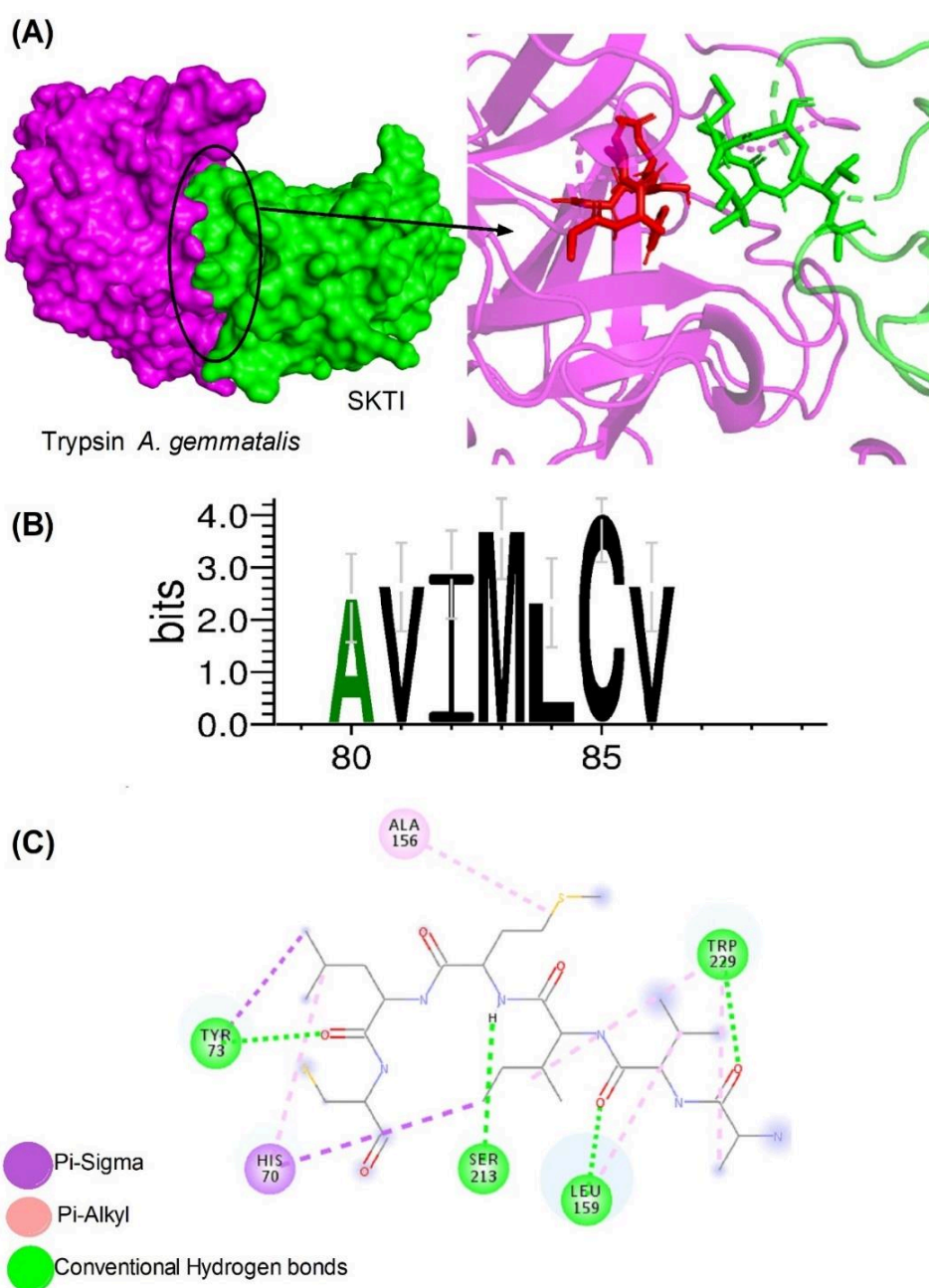


Figura 9. Uma visão geral e local da pose de encaixe melhor classificada do inibidor de tripsina de soja Kunitz (SKTI) com tripsina digestiva de *Anticarsia gemmatalis*. Formato da superfície representando a tripsina em magenta e o SKTI em verde. À direita, aminoácidos catalíticos em bastões vermelhos e os resíduos reativos como bastões verdes envolvidos na interação tripsina-SKTI. B. Logotipo da sequência dos motivos reativos mais representativos presentes em SKTI que se ligam às tripsinas de *Anticarsia gemmatalis*. A altura de cada letra é proporcional à frequência do resíduo correspondente naquela posição. C. Perfil farmacofórico do complexo SKTI-tripsina após *docking* molecular. A bola colorida e a linha pontiaguda indicam o tipo de interação entre a sequência reativa da SERPIN e a cadeia lateral dos resíduos da tripsina. Apenas uma (NM_001043572.1) das estruturas de tripsina é usada para visualização como modelo de consenso das 13 sequências identificadas, mas todas as análises foram realizadas para todas as sequências.

A representação gráfica dos resíduos padrão do alinhamento das sequências dos inibidores ligados à tripsina foi realizada utilizando WEBLOGO; os resíduos participantes na ligação às tripsinas foram mostrados como o fragmento da sequência completa com o maior número de resíduos contínuos (Figura 8B e 9B). SERPIN mostrou três possíveis sítios reativos por interação com as tripsinas de *A. gemmatalis* (13 proteínas), 69% das interações foram realizadas pelo motivo contendo os resíduos de aminoácidos entre a posição 1 a 9 da cadeia proteica (Met-Asp-Tyr -Lys-Ser-Phe-Ser-Ser) (Figura 8B). Na análise dos resíduos do inibidor de SKTI ligando-se a todas as tripsinas de *A. gemmatalis* selecionadas foram encontrados dois sítios reativos, 62% das interações foram realizadas pelo motivo contendo os resíduos de aminoácidos entre a posição 80 a 86 da cadeia protéica (Ala-Val- Ile-Met-Leu-Cys-Val) (Figura 9B).

A importância dos resíduos de interface do complexo tripsina-proteína inibidora foi esclarecida por *docking* e foi demonstrado que os resíduos catalíticos estão envolvidos na ligação com SERPIN e SKTI formando interação por pontes de hidrogênio (Figuras 8C e 9C). Na interface SERPIN-tripsinas, 60% da interação são ligações de hidrogênio convencionais (Figura 8C), e 66% pela interface SKTI-tripsinas (Figura 9C). Além das ligações de hidrogênio, várias interações, como pi-sigma, pi-Alquil e carbono-hidrogênio foram envolvidas para inibir a atividade catalítica da tripsina de *A. gemmatalis* após a ligação do inibidor (Figura 8C e 9C).

4. DISCUSSÃO

O desenho de novos IPs que apresentem capacidades mais eficientes para controlar a infestação de lagartas requer o conhecimento das sequências de proteases presentes nos intestinos dos insetos. No entanto, a caracterização proteômica das enzimas intestinais do inseto desafiadora, pois essas biomoléculas são encontradas em concentrações muito baixas no ambiente fisiológico, variando de 10^{-5} a 10^{-10} M (SRERE, 1967). Além disso, produtos gênicos abundantes, como proteínas estruturais, dificultam a detecção de enzimas de baixa abundância por meio da supressão de sinais no espectrômetro de massa. Para superá-lo, nosso fracionamento de PEG escolhido seguido de digestão em gel melhorou a cobertura do proteoma e a eficiência da digestão que envolve a imobilização das proteínas em condições de desnaturação, garantindo melhor acesso da tripsina aos locais de hidrólise. Além disso, a alquilação e redução de proteínas presentes na amostra são facilitadas na digestão em gel. A iodoacetamida e o DTT puderam ser completamente lavados do gel, evitando interferências na digestão e na aquisição de espectros de massa. Padrões distintos de tempos de retenção podem

levar a interpretações quantitativas e qualitativas sobre o analito. Além disso, este parâmetro pode ser estudado de forma independente ou com os espectros fornecidos por MS/MS, aumentando a confiança na identificação de peptídeos (LE MAUX; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015; PALMBLAD et al., 2004; STRITTMATTER et al., 2004). Além disso, a digestão em gel pode ter sido importante para remover a ligação do PEG nas proteínas antes da clivagem proteolítica e para obter uma desnaturação de protease intestinal mais eficiente. Isso permitiu a identificação de um maior número de peptídeos derivados das enzimas presentes no intestino de *A. gemmatalis*. Na verdade, Silva-Júnior et al. (2020) identificaram 14 genes que codificam proteases de amostras não fracionadas do extrato bruto de *A. gemmatalis*, extraídas de 7 bandas de SDS-PAGE, enquanto usando a estratégia de precipitação com PEG identificamos 54. Como também mostrado por Xi et al. (2006) e Lima et al. (2019), o fracionamento com PEG favorece a detecção de proteínas menos abundantes. Portanto, o uso desta técnica foi crucial para a identificação bem sucedida de altos números de proteases por LC/MS.

O número de proteínas não redundantes identificadas foi superior aos encontrados na literatura, realizados com intestinos de outros lepidópteros em fase larval. Usando uma abordagem de eletroforese bidimensional, 98 proteínas foram identificadas em *Tribolium castaneum* (MORRIS et al., 2009), 91 proteínas em *Bombyx mori* (Liu et al., 2018) e 98 proteínas em *Spodoptera frugiperda* (ACEVEDO et al., 2017). Usando RNAseq, 238 genes superexpressos foram detectados no intestino da lagarta *Tribolium castaneum* (PERKIN; OPPERT, 2019).

Inicialmente, a expressão de muitas isoformas pode parecer redundante ou perda bioenergética, mas a diversidade na expressão de enzimas que realizam atividades biológicas semelhantes tem um papel adaptativo importante em insetos (DÍAZ-MENDOZA et al., 2005). Conforme relatado por Souza et al. (2016), a expansão de genes que codificam serino-proteases está associada à adaptação do inseto ao IP produzido pela planta. Como a digestão de proteínas em lepidópteros é realizada principalmente por serino-proteases, o aumento da diversidade estrutural e funcional dos genes que codificam essa subclasse pode ser atribuído à maquinaria de resposta do inseto para contornar IPs. Portanto, essas proteínas expressas constitutivamente representam uma vantagem adaptativa.

Abordagem transcriptômica no intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) mostrou 14 quimotripsinas e 9 tripsinas diferencialmente expressas em resposta a IP na dieta (BRIOSCHI et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2013; PAUCHET et

al., 2010). Os autores apontaram essa reprogramação de expressão como uma estratégia para superar o efeito nocivo dos IPs.

As lepidópteras exibem uma flexibilidade incrível na adaptação à dieta. *Helicoverpa armigera*, por exemplo, expressa até 20 isoformas de serina proteases (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 1997; GATEHOUSE et al., 1998; PATANKAR et al., 2001). A existência de múltiplas isoformas dessas serino-proteases em insetos se deve a eventos de duplicação gênica (BAPTISTA et al., 1998; LOPES et al., 2004). A modulação de proteases-chave durante o desenvolvimento larval também mostrou ocorrer independentemente da dieta em *A. gemmatalis* (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020), *Helicoverpa armigera* (CHOUGULE et al., 2005; KIPGEN; AGGARWAL, 2014), *Naranga aenescens* (ZIBAEI et al., 2011) e *Nezara viridula* (LOMATE; BONNING, 2016). No entanto, estudos relacionando a reprogramação genética de insetos ao IP na dieta mostraram que, inicialmente, todas as proteases digestivas são reguladas positivamente e, em seguida, há regulação negativa em proteases sensíveis a IP (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004).

Em diferentes estágios de desenvolvimento, os insetos podem ter dietas diversas. Paralelo a isso, o intestino das lagartas altera o perfil das proteases expressas (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020). Não se sabe ao certo se essa modulação dinâmica é causa ou consequência da mudança na dieta. Mas o que parece ser um fato é que a grande diversidade de isoformas é importante não apenas para lidar com o conteúdo diversificado de proteínas vegetais, mas também para contornar uma parte expressiva da defesa vegetal baseada em IP. Lima et al. (2020) relataram que aproximadamente um terço das proteases expressas no intestino de insetos da ordem Lepidoptera correspondem a serina proteases (EC 3.4.16, EC 3.4.21). Essa fração de enzimas pode representar até 95% da atividade proteolítica no intestino larval de lepidópteras (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006).

As glicosidases (EC 3.2.1) foram a subclasse com a segunda maior identificação. Estas hidrolases são bem estudadas devido às suas aplicações industriais (ISHAK et al., 2019) e por sua função fisiológica em insetos fitófagos: a digestão da sacarose, um dos açúcares mais abundantes no tecido foliar (PAUCHET et al., 2010). Além dessa importância energética, as glicosidases também podem representar um importante foco de estudos no desenvolvimento de estratégias de controle de pragas. As plantas produzem uma grande variedade de aleloquímicos como defesa à herbivoria (por exemplo, cianogênicos, alcalóides, glicosídeos triterpenóides, glucosinolatos).

Embora eficaz na maioria das vezes, o arsenal bioquímico da planta pressiona seletivamente seus inimigos. Uma ação importante das glicosidases a esse respeito é

representada pela mirosinase (E.C. 3.2.1.147), que participa do sistema conhecido como glucosinolato-mirosinase. Nesta importante via de defesa da planta, a mirosinase e o glucosinolato são compartimentados separadamente nas células vegetais até que o dano tecidual os coloque em contato. Como resultado, o glucosinolato é ativado pela mirosinase através da hidrólise da ligação tioglicosídeo, levando à formação de uma aglicona instável que leva a compostos tóxicos para o inseto (LI et al., 2000; WINDE; WITTSTOCK, 2011). Eles desenvolveram maneiras de armazenar ou desintoxicar compostos nocivos e, assim, usá-los como compostos defensivos contra seus inimigos.

Neste trabalho, a mirosinase apresentou o maior número de isoformas identificadas entre as glicosidases, cerca de dois terços. Eles são comumente relatados em famílias multigênicas (VASSÃO et al., 2018), codificando várias isoenzimas funcionais em plantas (RASK et al., 2000). A questão é: por que os insetos investem em enzimas mirosinase se sua atividade pode levar a produtos tóxicos quando associada à dieta? Ainda não há uma resposta satisfatória, mas há alguns indícios de que essas enzimas são usadas para passar da defesa direta para a indireta, ao mesmo tempo em que o inseto pode neutralizar a toxicidade dos produtos isotiocianatos (ABDALSAMEE et al., 2014; SCHRAMM et al., 2012). Extratos obtidos do intestino de *A. gemmatalis* não tinham atividade de glutathione *S*-transferase (GST) para isotiocianato, mesmo após a indução, mas não em substratos artificiais frequentemente usados para medir a atividade de GST (WADLEIGH; YU, 1988; YU, 1987). Mesmo um generalista que se alimenta apenas ocasionalmente de plantas contendo glucosinolato se beneficia de um mecanismo tão especializado (WINDE; WITTSTOCK, 2011).

O sistema glucosinolato-mirosinase é importante não só para a defesa das plantas contra herbívoros, mas também para fins diretamente relacionados à aptidão dos insetos, como localização do hospedeiro, aceitação da oviposição e defesa contra inimigos (RASK et al., 2000). Insetos como *Brevicoryne brassicae* e *Lipaphis erysimi* sequestram glucosinolato que pode ser degradado por uma mirosinase produzida endogenamente por eles (BRIDGES et al., 2002; HUSEBYE et al., 2005; ROSSITER; JONES; BONES, 2003). Além disso, a produção de mirosinase por essas duas espécies parece imitar o sistema glucosinolato-mirosinase da planta (HUSEBYE et al., 2002; JONES et al., 2001; ROSSITER; JONES; BONES, 2003). Estudos demonstraram que o crescimento de *Plutella xylostella* não foi afetado quando alimentado com um mutante que superexpressa a mirosinase, para a inativação da glucosinolato sulfatase do inseto, sugerindo que a presença da mirosinase é indiferente a este herbívoro (RATZKA et al., 2002).

Estudos comparativos de metaboloma podem ser úteis para quantificar os produtos glucosinolatos em *A. gemmatalis* e complementar essas análises. As atividades enzimáticas da mirosinase precisam ser investigadas em condições semelhantes às condições fisiológicas do intestino de *A. gemmatalis*. Essas enzimas podem representar um importante alvo investigativo no controle de insetos-praga.

Xavier et al. (2005) caracterizaram as tripsinas-*like* ligadas à membrana de *A. gemmatalis* e estudos realizados em *Bombyx mori* mostraram que as tripsina-*like* e quimotripsina-*like* são transportadas via membrana até o lúmen onde são solubilizadas e ativadas (EGUCHI; IWAMOTO; YAMAUCHI, 1982). Uma parte expressiva dessas enzimas permanece ancorada na membrana peritrófica do intestino médio da lagarta (EGUCHI; IWAMOTO; YAMAUCHI, 1979; KURIYAMA; EGUCHI, 1985). Essas proteases ligadas à membrana já foram identificadas como alvos da ação do inibidor de tripsina de soja (SBTI) no controle de *Plodia interpunctella* (AMORIM et al., 2008). Análises histoquímicas mostram que as tripsinas estão expostas no lúmen intestinal de insetos como proteínas transmembranares, principalmente na porção anterior do intestino. Na região posterior, há predominância de tripsinas solúveis (JORDÃO et al., 1999). A ligação de enzimas na membrana pode ocorrer por ancoragem via domínios resistentes a detergentes (FUZITA et al., 2019) ou por vesículas ligadas a microvilosidades (JORDÃO et al., 1999). Avançando para a região posterior do intestino, essas enzimas são solúveis e secretadas por exocitose. Como resultado, a atividade das serino-proteases diminui ao longo do intestino larval (BOLOGNESI et al., 2001).

A abundância de serina-proteases identificadas neste estudo mostra a importância das enzimas tripsina-*like* no tecido intestinal de *A. gemmatalis*. Em espécies herbívoras de Lepidoptera, a expansão do número de genes que codificam serino-proteases tem sido associada principalmente à adaptação para superar os efeitos dos inibidores de serino-proteases do hospedeiro (LIMA et al., 2020b). Evolutivamente, os insetos herbívoros tentam possuir uma gama diversificada de enzimas digestivas e melhorar sua adaptabilidade, expressando diferentes tipos de enzimas para superar os IPs das plantas e garantir a digestão (MEHRABADI et al., 2012).

A tripsina-*like* exibe múltiplas arquiteturas capazes de influenciar suas propriedades funcionais e capacidades em suas vias de atuação. Apesar disso, a análise filogenética mostra que o domínio serino-proteases é o mais importante na formação da evolução tripsina-*like* (ARENAS et al., 2010; LIMA et al., 2020b). Assim, identificamos que cadeias com alto índice de conservação contêm a tríade catalítica (His, Asp, Ser), resíduos responsáveis por manter a conformação catalítica favorável do sítio ativo, e outros resíduos importantes para estabilizar

essa conformação favorável durante o zimogênio para formas enzimáticas ativas. uma transição no intestino de *A. gemmatalis*.

Variações na configuração da tríade catalítica Ser/His/Asp foram observadas no grupo de tripsina analisado, especificamente, substituições nos resíduos His e Ser, possivelmente mostrando que algumas dessas sequências podem ter se originado de duplicações em espécies ancestrais antigas e foram preservadas nesta proteoma até os dias atuais (EKICI; PAETZEL; DALBEY, 2008); essa conservação ao longo do tempo e a presença no intestino de *A. gemmatalis*, mostram que essas enzimas podem desempenhar papéis importantes nesses insetos. Essa substituição de resíduos na tríade catalítica também pode estar associada à perda de atividade enzimática, expressão de enzimas homólogas inativas, produto de eventos de expansão gênica observados durante a evolução da família gênica da tripsina e quimotripsina. Essas enzimas inativas podem desempenhar diferentes funções, particularmente em processos regulatórios e sujeitas a alta pressão seletiva purificadora (PILS; SCHULTZ, 2004).

Os aminoácidos Arg e Ile no início da cadeia polipeptídica da tripsina também eram uma região altamente conservada, pois a ativação dessas proteases ocorre neste sítio, durante uma etapa de clivagem proteolítica irreversível, na ligação entre os resíduos Arg-Ile que delimita a cadeia A e B da enzima (AFONSO et al., 2020; DI CERA, 2009).

As serino-proteases desempenham um papel proeminente em uma ampla gama de processos fisiológicos, como digestão de alimentos, coagulação do sangue, embriogênese, reorganização de tecidos, mecanismos de defesa e respostas imunes (HEUTINCK et al., 2010; SCHOOF; CLYNEN; SALZET, 2005). Muitos desses processos são cascatas proteolíticas que, uma vez acionadas, levam rápida e irreversivelmente a uma resposta celular específica. A ativação e a inativação das cascatas de proteases devem ser controladas de perto em diferentes níveis regulatórios, sendo a transcrição do gene da protease, a tradução do mRNA, a ativação do zimogênio, a especificidade do substrato, a cinética da enzima e por inibidores da enzima. A maioria das espécies animais sintetiza uma variedade de inibidores de proteases com diferentes especificidades, cuja função é prevenir a proteólise indesejada (CLYNEN; SCHOOF; SALZET, 2005; SCHOOF; CLYNEN; SALZET, 2005).

Analisando o proteoma intestinal de *A. gemmatalis*, identificamos um inibidor da enzima serina, cujo motivo SERPIN foi identificado por Pfam. Nós aqui exploramos e descrevemos os mecanismos bioquímicos básicos da interação entre a SERPIN e tripsinas da praga *A. gemmatalis* por meio de ferramentas de bioinformática. A SERPIN identificada é uma proteína com 374 resíduos de aminoácidos, peso molecular de aproximadamente 42 kDa, dobrada em 9 α -hélices e 3 β -folhas. As três fitas β são posicionadas no meio da molécula e

uma alça central reativa flexível é posicionada no topo da molécula, formada pelos resíduos de aminoácidos na posição 1 a 9 da cadeia protéica; essas características concordam com a definição de um SERPIN nativo (CABRERA; BLAMEY, 2018).

A análise de interação entre a SERPIN e as tripsinas de *A. gemmatalis* mostrou que o sítio reativo do inibidor está em contato com a cavidade catalítica das tripsinas (His-Asp-Ser) e resíduos adjacentes à tríade, ou seja, bloqueia o acesso do substrato ao sítio ativo. Dos 374 resíduos de aminoácidos que fazem parte da SERPIN, 9 resíduos de aminoácidos interagem com as tripsinas de *A. gemmatalis* a uma distância de quatro angstroms. Esses resíduos de aminoácido na alça central reativa são principalmente polares não carregados e hidrofóbicos, ligando-se às tripsinas principalmente por ligações de hidrogênio convencionais. Toubarro et al. (2013) mostraram *in vitro* que as SERPINs inibem a atividade semelhante à tripsina no intestino de lepidópteros. Assim, a SERPIN identificada poderia estar atuando como um regulador da atividade da serino protease (AN; KANOST, 2010; WANG et al., 2017; ZHU et al., 2003), especialmente aqueles envolvidos na modulação das respostas de insetos a bactérias, através da via da polifenoloxidase (PPO) (AN et al., 2011; LI et al., 2002), e a vírus em *B. mori* (WU et al., 2016).

Em SERPINs, seu RCL contém um motivo de sequência que é especificamente reconhecido por enzimas alvo. Curiosamente, as sequências de aminoácidos próximas ao local de clivagem são altamente variáveis entre diferentes SERPINs (CABRERA; BLAMEY, 2018). Assim, uma identificação realizada da sequência reativa da SERPIN de *A. gemmatalis* é promissora para a minimização molecular, visando criar uma molécula peptídica com maior estabilidade e menos propensa à clivagem por proteases e viável para ser utilizada no controle de pragas de insetos Lepidoptera, como lagartas de *A. gemmatalis*.

5. CONCLUSÕES

O 1DE-LC/MS possibilita o mapeamento proteômico do intestino larval de *A. gemmatalis* e descreve um número expressivo de hidrolases, apresentando diversas isoformas importantes para a digestibilidade do inseto. A identificação de enzimas intestinais em *A. gemmatalis* permite uma compreensão mais abrangente da alimentação de insetos. Em geral, todas as tripsinas se ligam a inibidores (SKTI e SERPIN) por meio de resíduos do sítio de especificidade S1 ou resíduos da tríade catalítica. Modelos de proteínas previstos a partir de sequências de DNA indicaram que não há diferenças na forma como as tripsinas interagem com os inibidores estudados usando análises de docagem molecular. Assim, a diferença nas

sequências globais poderia contribuir para uma estratégia para evitar a inibição por IPs através de alterações estruturais da protease expressa para evitar sua inativação.

Além disso, uma SERPIN endógena foi identificada e a análise da interação mostrou que o sítio reativo do inibidor está em contato com a cavidade catalítica das tripsinas com energia de afinidade próxima àquela determinada entre tripsina-SKTI. Este SERPIN pode estar atuando como regulador (WANG et al., 2017; ZHU et al., 2003) e dinâmica de ligação indicada como promissora para minimização molecular, visando criar uma molécula peptídica com maior estabilidade e menos propensa à clivagem por proteases e viável para ser utilizada no controle de pragas de insetos Lepidoptera como larvas de *A. gemmatalis*.

REFERÊNCIAS

ABDALSAMEE, Mohamed K.; GIAMPÀ, Marco; NIEHAUS, Karsten; MÜLLER, Caroline. Rapid incorporation of glucosinolates as a strategy used by a herbivore to prevent activation by myrosinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 115–123, 2014. DOI: 10.1016/j.ibmb.2014.07.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174814001143>.

ABRAHAM, Eappen G.; PINTO, Sofia B.; GHOSH, Anil; VANLANDINGHAM, Dana L.; BUDD, Aidan; HIGGS, Stephen; KAFATOS, Fotis C.; JACOBS-LORENA, Marcelo; MICHEL, Kristin. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 45, p. 16327–16332, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0508335102.

ACEVEDO, Flor E.; STANLEY, Bruce A.; STANLEY, Anne; PEIFFER, Michelle; LUTHE, Dawn S.; FELTON, Gary W. Quantitative proteomic analysis of the fall armyworm saliva. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 86, p. 81–92, 2017. DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.06.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174817300772>.

AFONSO, Marcelo Querino Lima; DA FONSECA, Neli J.; DE OLIVEIRA, Lucas Carrijo; LOBO, Francisco Pereira; BLEICHER, Lucas. Coevolved Positions Represent Key Functional Properties in the Trypsin-Like Serine Proteases Protein Family. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 1060–1068, 2020. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00903. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b00903>.

AMORIM, Ticiana M. L.; MACEDO, Leonardo L. P.; UCHOA, Adriana F.; OLIVEIRA, Adelianna S.; PITANGA, Joelma C. M.; MACEDO, Francisco P.; SANTOS, Elizeu A.; DE SALES, Mauricio P. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 17, p. 7738–7745, 2008. DOI: 10.1021/jf801224d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf801224d>.

AN, Chunju; BUDD, Aidan; KANOST, Michael R.; MICHEL, Kristin. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. **Cellular and**

Molecular Life Sciences, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 1929–1939, 2011. DOI: 10.1007/s00018-010-0543-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0543-z>.

AN, Chunju; KANOST, Michael R. Manduca sexta serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 683–689, 2010. DOI: 10.1016/j.ibmb.2010.07.001.

ARENAS, Aylan Farid; OSORIO-MÉNDEZ, Juan Felipe; GUTIERREZ, Andres Julian; GOMEZ-MARIN, Jorge E. Genome-wide survey and evolutionary analysis of trypsin proteases in apicomplexan parasites. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 103–112, 2010. DOI: 10.1016/S1672-0229(10)60011-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672022910600113>.

BADRAN, Ahmed H. et al. Continuous evolution of Bacillus thuringiensis toxins overcomes insect resistance. **Nature**, [S. l.], v. 533, n. 7601, p. 58–63, 2016. DOI: 10.1038/nature17938. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature17938>.

BAPTISTA, António M.; JONSON, Per Harald; HOUGH, Edward; PETERSEN, Steffen B. The origin of trypsin: Evidence for multiple gene duplications in trypsins. **Journal of Molecular Evolution**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 353–362, 1998. DOI: 10.1007/PL00006393. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/PL00006393>.

BEL, Yolanda; ZACK, Marc; NARVA, Ken; ESCRICHE, Baltasar. Specific binding of Bacillus thuringiensis Cry1Ea toxin, and Cry1Ac and Cry1Fa competition analyses in Anticarsia gemmatalis and Chrysodeixis includens. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 18201, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-54850-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54850-3>.

BOLOGNESI, Renata; RIBEIRO, Alberto F.; TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. The peritrophic membrane of Spodoptera frugiperda: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 62–75, 2001. DOI: 10.1002/arch.1037. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/arch.1037>.

BOWN, David P.; WILKINSON, Hillary S.; GATEHOUSE, John A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest,

Helicoverpa armigera, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 625–638, 1997. DOI: 10.1016/S0965-1748(97)00043-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096517489700043X>. Acesso em: 8 abr. 2022.

BOWN, David P.; WILKINSON, Hillary S.; GATEHOUSE, John 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**, [S. l.], v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 278–290, 2004. DOI: 10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x>. Acesso em: 10 jun. 2022.

BRIDGES, Matthew et al. Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 269, n. 1487, p. 187–191, 2002. DOI: 10.1098/rspb.2001.1861. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2001.1861>.

BRIOSCHI, Daniela; NADALINI, Larissa D.; BENGTON, Mario H.; SOGAYAR, Mari Cleide; MOURA, Daniel S.; SILVA-FILHO, Marcio C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 1283–1290, 2007. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.07.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174807001919>. Acesso em: 24 mar. 2022.

CABRERA, Ma Ángeles; BLAMEY, Jenny M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biological Research**, Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, Netherlands. DOI - 10.3389/fmed.2019.00025 SRC - Pubmed ID2 - 30809526 FG - 0, v. 51, n. 1, p. 37, 2018. DOI: 10.1186/s40659-018-0186-3. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/267/23/16396.short>.

CAMPOS, Estefânia V. R.; PROENÇA, Patrícia L. F.; OLIVEIRA, Jhones L.; BAKSHI, Mansi; ABHILASH, P. C.; FRACETO, Leonardo F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 105, n. July 2017, p. 483–495, 2019. DOI: 10.1016/j.ecolind.2018.04.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>.

CHOUGULE, Nanasaheb P.; GIRI, Ashok P.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 355–367, 2005. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.01.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805000226>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; SALZET, M. A review of the most important classes of serine protease inhibitors in insects and leeches. **Medicinal Chemistry Reviews - Online**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 197–206, 2005. DOI: 10.2174/1567203054065682. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2034&volume=2&issue=3&spage=197>.

COELHO, M.; GODOY, A. F.; BAPTISTA, Y. A.; BENTIVENHA, J. P. F.; LOURENÇÃO, A. L.; BALDIN, E. L. L.; CATCHOT, A. L. Assessing soybean genotypes for resistance to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 113, n. 1, p. 471–481, 2020. DOI: 10.1093/jee/toz269. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/113/1/471/5588651>.

COTABARREN, Juliana; LUFRANO, Daniela; PARISI, Mónica Graciela; OBREGÓN, Walter David. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, [S. l.], v. 292, p. 110398, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945219315717>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CRAVA, Cristina M.; BEL, Yolanda; JAKUBOWSKA, Agata K.; FERRÉ, Juan; ESCRICHE, Baltasar. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: Activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 924–935, 2013. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.07.009.

CROOKS, Gavin E.; HON, Gary; CHANDONIA, John Marc; BRENNER, Steven E. WebLogo: A sequence logo generator. **Genome Research**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1188–1190, 2004. DOI: 10.1101/gr.849004. Disponível em: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.849004>.

DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; DE OLIVEIRA, Eugênio E.; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21631, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21631>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DE CASTRO, A. A.; CORRÊA, A. S.; LEGASPI, J. C.; GUEDES, R. N. C.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *podisus nigripinus* and *supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). **Chemosphere**, [S. l.], v. 93, n. 6, p. 1043–1050, 2013. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.075. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513008217>.

DE CASTRO, Edouard; SIGRIST, Christian J. A.; GATTIKER, Alexandre; BULLIARD, Virginie; LANGENDIJK-GENEVAUX, Petra S.; GASTEIGER, Elisabeth; BAIROCH, Amos; HULO, Nicolas. ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 34, n. WEB. SERV. ISS., p. W362–W365, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkl124. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkl124>.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho et al. Dual insecticidal effects of *Adenantha pavonina* kunitz-type inhibitor on *Plodia interpunctella* is mediated by digestive enzymes inhibition and chitin-binding properties. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 4344, 2019. DOI: 10.3390/molecules24234344. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/23/4344>.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postali; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 19–25, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495913000250>. Acesso em: 25 mar. 2021.

DEREEPER, Alexis; AUDIC, Stephane; CLAVERIE, Jean Michel; BLANC, Guillaume. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. **BMC**

Evolutionary Biology, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 8, 2010. DOI: 10.1186/1471-2148-10-8. Disponível em: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-10-8>.

DI CERA, Enrico. Serine proteases. **IUBMB Life**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009. DOI: 10.1002/iub.186. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.186>. Acesso em: 24 jun. 2021.

DÍAZ-MENDOZA, M.; ORTEGO, F.; GARCÍA DE LACOBIA, M.; MAGAÑA, C.; DE LA POZA, M.; FARINÓS, G. P.; CASTAÑERA, P.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 1005–1020, 2005. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.04.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805001025>.

EGUCHI, Masaharu; IWAMOTO, Akiko; YAMAUCHI, Keiji. Relationship among proteases from the midgut, peritrophic membrane and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Sericultural Science of Japan**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 53–58, 1979. DOI: 10.11416/kontyushigen1930.48.53.

EGUCHI, Masaharu; IWAMOTO, Akiko; YAMAUCHI, Keiji. Interrelation of proteases from the midgut lumen, epithelia and peritrophic membrane of the silkworm, *bombyx moki* L. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 359–363, 1982. DOI: 10.1016/0300-9629(82)90231-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300962982902316>.

EKICI, Özlem Doğan; PAETZEL, Mark; DALBEY, Ross E. Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. **Protein Science**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 2023–2037, 2008. DOI: 10.1110/ps.035436.108. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1110/ps.035436.108>.

FEUSSNER, Ivo; WASTERNAK, Claus. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 275–297, 2002. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>. Acesso em: 28 maio. 2022.

FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future.

Nucleic Acids Research, [S. l.], v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/44/D1/D279/2503120>. Acesso em: 27 maio. 2021.

FUZITA, Felipe J.; PIMENTA, Daniel C.; PALMISANO, Giuseppe; TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Detergent-resistant domains in *Spodoptera frugiperda* midgut microvillar membranes and their relation to microapocrine secretion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 235, p. 8–18, 2019. DOI: 10.1016/j.cbpb.2019.05.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495919301046>.

GARDNER, Harold W. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, [S. l.], v. 1084, n. 3, p. 221–239, 1991. DOI: 10.1016/0005-2760(91)90063-N. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527609190063N>.

GATEHOUSE, Laurence N.; SHANNON, April L.; BURGESS, Elisabeth P. J.; CHRISTELLER, John T. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 929–944, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(97)00074-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096517489700074X>.

GÓMEZ, Jenny D. et al. Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 155, p. 196–212, 2020. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.07.010.

GOMEZ, Jenny D.; VITAL, Camilo E.; OLIVEIRA, Maria G. A.; RAMOS, Humberto J. O. Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. e0205010, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0205010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205010>. Acesso em: 6 abr. 2021.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 69, n. 4,

p. 487–488, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/69/4/487/2212175>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HEUTINCK, Kirstin M.; TEN BERGE, Ineke J. M.; HACK, C. Erik; HAMANN, Jörg; ROWSHANI, Ajda T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 47, n. 11–12, p. 1943–1955, 2010. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.04.020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589010001598>.

HUSEBYE, Harald; ARZT, Steffi; BURMEISTER, Wim P.; HÄRTEL, Frauke V.; BRANDT, Anders; ROSSITER, John T.; BONES, Atle M. Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 12, p. 1311–1320, 2005. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.07.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805001542>.

HUSEBYE, Harald; CHADCHAWAN, Supachitra; WINGE, Per; THANGSTAD, Ole P.; BONES, Atle M. Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 128, n. 4, p. 1180–1188, 2002. DOI: 10.1104/pp.010925. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.010925>.

ISHAK, Nadiah; MD YUSOP, Nadzirah; SARI MOHD KASSIM, Angzzas; MOHD ARIPIN, Ashuvila; MUTIA SHARIFAH, Sharfina; FADILAT OLUWATOSIN, Ayeronfe. **Insect Enzymes for Biotechnology Industry: From Nature To Industrial Applications**. *Jurnal Kejuruteraan dan Sains Kesihatan Journal of Engineering and Health Sciences* Jilid. [s.l.: s.n.].

JONES, A. M. E.; BRIDGES, M.; BONES, A. M.; COLE, R.; ROSSITER, J. T. Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 1–5, 2001. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00157-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174800001570>.

JORDÃO, Beatriz P.; CAPELLA, Adriana N.; TERRA, Walter R.; RIBEIRO, Alberto F.; FERREIRA, Clélia. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and

trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 29–37, 1999. DOI: 10.1016/S0022-1910(98)00098-5. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191098000985>.

KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053. Disponível em: <http://predictioncenter.org/index.cgi>. Acesso em: 27 maio. 2021.

KIPGEN, Lunminlal; AGGARWAL, Kamal K. Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 172–178, 2014. DOI: 10.1017/S1742758414000368. Disponível em: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1742758414000368. Acesso em: 28 maio. 2022.

KOTKAR, Hemlata M.; SARATE, Priya J.; TAMHANE, Vaijayanti A.; GUPTA, Vidya S.; GIRI, Ashok P. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 663–670, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.05.004.

KOZAKOV, Dima; BEGLOV, Dmitri; BOHNUUD, Tanggis; MOTTARELLA, Scott E.; XIA, Bing; HALL, David R.; VAJDA, Sandor. How good is automated protein docking? **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [S. l.], v. 81, n. 12, p. 2159–2166, 2013. DOI: 10.1002/prot.24403. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.24403>. Acesso em: 30 set. 2021.

KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORNY, Dzmity; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.169>. Acesso em: 27 maio. 2021.

KURIYAMA, Ken; EGUCHI, Masaharu. Conversion of the molecular form by alkaline treatment of gut protease from the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 575–579, 1985. DOI:

10.1016/0305-0491(85)90492-4. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305049185904924>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/227680a0>.

LE MAUX, Solène; NONGONIERMA, Alice B.; FITZGERALD, Richard J. Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 173, p. 847–854, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.104. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016677>.

LI, D.; SCHERFER, C.; KORAYEM, A. M.; ZHAO, Z.; SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U. Insect hemolymph clotting: Evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 919–928, 2002. DOI: 10.1016/S0965-1748(02)00030-9.

LI, Qun; EIGENBRODE, Sanford D.; STRINGAM, G. R.; THIAGARAJAH, M. R. Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2401–2419, 2000. DOI: 10.1023/A:1005535129399.

LI, Yunhe; HALLERMAN, Eric M.; WU, Kongming; PENG, Yufa. Insect-resistant genetically engineered crops in China: Development, application, and prospects for use. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 273–292, 2020. DOI: 10.1146/annurev-ento-011019-025039. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011019-025039>.

LIMA, Ana T.; BASTOS, Felipe A.; TEUBNER, Fernando Jakes; NETO, Renato R.; COOPER, Andrew; BARROSO, Gilberto F. Strengths and Weaknesses of a Hybrid Post-disaster Management Approach: the Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. **Environmental Management**, Department of Biochemistry, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel. DOI - 10.1093/nar/gki370 SRC - Pubmed ID2 - 15980475 FG - 0, v. 65, n. 6, p. 711–724, 2020. a. DOI: 10.1007/s00267-020-01279-4. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

204X2008000700003&lng=en&tlng=en. Acesso em: 31 mar. 2021.

LIMA DE CARVALHO, Willam; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria; GONÇALVES DE BARROS, Everaldo; ALVES MOREIRA, Maurilio. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 497–501, 1999. DOI: 10.1016/S0981-9428(99)80055-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942899800552>.

LIMA, Lucas Leal; BALBI, B. P.; MESQUITA, R. O.; SILVA, J. C. F. Da; COUTINHO, F. S.; CARMO, F. M. S. Proteomic and Metabolomic Analysis of a Drought Tolerant Soybean Cultivar from Brazilian Savanna. **Crop Breeding, Genetics and Genomics**, [S. l.], 2019. DOI: 10.20900/cbgg20190022. Disponível em: https://cbgg.hapres.com/htmls/CBGG_1121_Detail.html.

LIMA, Lucas R.; DIAS, Renata O.; FUZITA, Felipe Jun; FERREIRA, Clélia; TERRA, Walter R.; SILVA-FILHO, Marcio C. The evolution, gene expression profile, and secretion of digestive peptidases in lepidoptera species. **Catalysts**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 217, 2020. b. DOI: 10.3390/catal10020217. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/2/217>.

LIU, L.; QU, M.; YANG, J.; YANG, Q. The physiological differentiation along the midgut of *Bombyx mori* – inspirations from proteomics and gene expression patterns of the secreted proteins in the ectoperitrophic space. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 247–259, 2018. DOI: 10.1111/imb.12368. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/imb.12368>.

LOMATE, Purushottam R.; BONNING, Bryony C. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 27587, 2016. DOI: 10.1038/srep27587. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep27587>.

LOMATE, Purushottam R.; HIVRALE, Vandana K. Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. **Arthropod-Plant Interactions**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 359–368, 2011. DOI: 10.1007/s11829-011-9140-9.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *In*: ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 2004, **Anais** [...]. [s.l.: s.n.] p. 140–152. DOI: 10.1002/arch.10134. Disponível em:

<http://doi.wiley.com/10.1002/arch.10134>.

LOURENÇO, Adriano M. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 7215, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25721-0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-25721-0>.

LUCAS, Alexandra; YARON, Jordan R.; ZHANG, Liqiang; AMBADAPADI, Sriram. Overview of serpins and their roles in biological systems. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.], v. 1826p. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4939-8645-3_1.

MEHRABADI, Mohammad; BANDANI, Ali R.; MEHRABADI, Reza; ALIZADEH, Houshang. Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 220–228, 2012. DOI: 10.1016/j.pestbp.2012.01.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357512000090>. Acesso em: 25 mar. 2021.

MERIÑO-CABRERA, Y.; ZANUNCIO, J. C.; DA SILVA, R. S.; SOLIS-VARGAS, M.; CORDEIRO, G.; RAINHA, F. R.; CAMPOS, W. G.; PICANÇO, M. C.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G. Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 172, n. 2, p. 236–243, 2018. DOI: 10.1111/aab.12416. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12416>. Acesso em: 9 jun. 2021.

MORRIS, Kaley et al. *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: A resource for the study of the coleopteran gut. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 3889–3898, 2009. DOI: 10.1021/pr900168z. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr900168z>. Acesso em: 31 mar. 2021.

PALMBLAD, Magnus; RAMSTRÖM, Margareta; BAILEY, Christopher G.; MCCUTCHEN-MALONEY, Sandra L.; BERGQUIST, Jonas; ZELLER, Loreen C. Protein identification by liquid chromatography-mass spectrometry using retention time prediction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 803, n. 1, p. 131–135, 2004. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.11.007. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203009280>.

PANIZZI, A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 119–127, 2013. DOI: 10.1007/s13744-013-0111-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-013-0111-y>. Acesso em: 30 set. 2021.

PARDO-LÓPEZ, Liliana; SOBERÓN, Mario; BRAVO, Alejandra. Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 3–22, 2013. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>.

PATANKAR, Aparna G.; GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; SAINANI, Mohini N.; DESHPANDE, Vasanti V.; RANJEKAR, Prabhakar K.; GUPTA, Vidya S. Complexity in specificities and expression of Helicoverpa armigera gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 4–5, p. 453–464, 2001. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00150-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174800001508>. Acesso em: 31 mar. 2021.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VOGEL, H.; NELSON, D. R.; REYNOLDS, S. E.; HECKEL, D. G.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Pyrosequencing the Manduca sexta larval midgut transcriptome: Messages for digestion, detoxification and defence. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 61–75, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2009.00936.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2583.2009.00936.x>.

PEI, Jimin; KIM, Bong Hyun; GRISHIN, Nick V. PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 2295–2300, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkn072. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn072>. Acesso em: 30 set. 2021.

PERKIN, Lindsey C.; OPPERT, Brenda. Gene expression in Tribolium castaneum life stages: Identifying a species-specific target for pest control applications. **PeerJ**, [S. l.], v. 2019, n. 5, p. e6946, 2019. DOI: 10.7717/peerj.6946. Disponível em: <https://peerj.com/articles/6946>.

PILON, Alan C.; VALLI, Marilia; DAMETTO, Alessandra C.; PINTO, Meri Emili F.; FREIRE, Rafael T.; CASTRO-GAMBOA, Ian; ANDRICOPULO, Adriano D.; BOLZANI,

Vanderlan S. NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, Nuclei of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products (NuBBE), Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Sao Paulo State University - UNESP, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil. DOI - 10.1038/s41598-017-07451-x SRC - Pubme, v. 7, n. 1, p. 7215, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07451-x. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=28775335&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

PILS, Birgit; SCHULTZ, Jörg. Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 340, n. 3, p. 399–404, 2004. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.04.063. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283604005248>.

RASK, Lars; ANDRÉASSON, Erik; EKBOM, Barbara; ERIKSSON, Susanna; PONTOPPIDAN, Bo; MEIJER, Johan. Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 93–114, 2000. DOI: 10.1023/A:1006380021658. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006380021658>. Acesso em: 8 abr. 2021.

RATZKA, Andreas; VOGEL, Heiko; KLIEBENSTEIN, Daniel J.; MITCHELL-OLDS, Thomas; KROYMANN, Juergen. Disarming the mustard oil bomb. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 99, n. 17, p. 11223–11228, 2002. DOI: 10.1073/pnas.172112899. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.172112899>.

ROMANAZZI, Gianfranco et al. Innovation in sustainable management of plant diseases and pests, and effects on the environment. In: **The First Outstanding 50 Years of “Universita Politecnica delle Marche”: Research Achievements in Life Sciences**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 601–616. DOI: 10.1007/978-3-030-33832-9_38. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-33832-9_38.

ROSSITER, John T.; JONES, Alexandra M.; BONES, Atle M. Chapter six A novel myrosinase-glucosinolate defense system in, cruciferous specialist aphids. In: **Recent**

Advances in Phytochemistry. [s.l.: s.n.]. v. 37p. 127–142. DOI: 10.1016/S0079-9920(03)80021-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079992003800217>.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SANRATTANA, Wariya; MAAS, Coen; DE MAAT, Steven. **SERPINS-From trap to treatment** *Frontiers in Medicine*, 2019. DOI: 10.3389/fmed.2019.00025.

SCHOOFS, Liliane; CLYNEN, Elke; SALZET, Michel. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Insects and Gut Leeches. **Current Pharmaceutical Design**, Laboratory of Developmental Physiology and Molecular Biology, K.U.Leuven, Naamsestraat 59, Leuven, B-3000 Leuven, Belgium. liliane.schoofs@bio.kleuven.ac.be DOI - 10.2174/1381612023395718 SRC - Pubmed ID2 - 11945153 FG - 0, v. 8, n. 7, p. 483–491, 2005. DOI: 10.2174/1381612023395718. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=11945153&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

SCHRAMM, Katharina; VASSÃO, Daniel Giddings; REICHEL, Michael; GERSHENZON, Jonathan; WITTSTOCK, Ute. Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 174–182, 2012. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.12.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174811002128>.

SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, Molecular Biology Research Laboratory, Department of Zoology, Deshbandhu College, University of Delhi, Kalkaji, New Delhi, India. DOI - 10.1111/1744-7917.12641 SRC - Pubmed ID2 - 30230264 FG - 0, v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12641>. Acesso em: 27 maio. 2021.

SÖDING, Johannes. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 951–960, 2005. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti125. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bti125>.

SÖDING, Johannes; BIEGERT, Andreas; LUPAS, Andrei N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 33, n. SUPPL. 2, p. W244–W248, 2005. DOI: 10.1093/nar/gki408. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gki408>.

SOUSA, S.; MAIA, M. L.; CORREIRA-SÁ, L.; FERNANDES, V. C.; DELERUE-MATOS, C.; CALHAU, C.; DOMINGUES, V. F. Chemistry and Toxicology Behind Insecticides and Herbicides. In: **Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 59–109. DOI: 10.1007/978-3-030-23396-9_3. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-23396-9_3.

SOUZA, Thais P.; DIAS, Renata O.; CASTELHANO, Elaine C.; BRANDÃO, Marcelo M.; MOURA, Daniel S.; SILVA-FILHO, Marcio C. 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**, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, 13400-918 Piracicaba, SP, Brazil. DOI - 10.1016/j.cbpb.2016.02.007 SRC - Pubmed ID2 - 26944308 FG - 0, v. 196–197, p. 67–73, 2016. DOI: 10.1016/j.cbpb.2016.02.007. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=26944308&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

SRERE, Paul A. Enzyme concentrations in tissues. **Science**, [S. l.], v. 158, n. 3803, p. 936–937, 1967. DOI: 10.1126/science.158.3803.936. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=6054167&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pu

bmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok P.; GUPTA, Vidya S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Plant Molecular Biology Group, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Pune, India. DOI - 10.2478/s11658-006-0012-8 SRC - Pubmed ID2 - 16847755 FG - 0, v. 11, n. 1, p. 132–154, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11658-006-0012-8/html>. Acesso em: 27 maio. 2021.

STRITTMATTER, Eric F.; KANGAS, Lars J.; PETRITIS, Konstantinos; MOTTAZ, Heather M.; ANDERSON, Gordon A.; SHEN, Yufeng; JACOBS, Jon M.; CAMP, David G.; SMITH, Richard D. Application of peptide LC retention time information in a discriminant function for peptide identification by tandem mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Biological Sciences Division and Environmental and Molecular Sciences Laboratory, Richland, Washington 99352, USA. DOI - 10.1021/pr049965y SRC - Pubmed ID2 - 15359729 FG - 0, v. 3, n. 4, p. 760–769, 2004. DOI: 10.1021/pr049965y. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=15359729&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

TAVARES, Wagner S.; COSTA, Mariana A.; CRUZ, Ivan; SILVEIRA, Rodrigo D.; SERRAO, Jose E.; ZANUNCIO, Jose C. Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais State, Brazil. DOI - 10.1080/03601234.2010.493493 SRC - Pubmed ID2 - 20603748 FG - 0, v. 45, n. 6, p. 557–561, 2010. DOI: 10.1080/03601234.2010.493493. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=20603748&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

THAKUR, Meenakshi; UDAYASHANKAR, A. C. Lipoxygenases and their function in plant innate mechanism. *In: Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 133–143. DOI: 10.1007/978-3-030-27165-7_8. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-27165-7_8. Acesso em: 27 maio. 2021.

TOUBARRO, Duarte; AVILA, Mónica M.; HAO, You Jin; BALASUBRAMANIAN, Natesan; JING, Yingjun; MONTIEL, Rafael; FARIA, Tiago Q.; BRITO, Rui M.; SIMÕES, Nelson. A Serpin Released by an Entomopathogen Impairs Clot Formation in Insect Defense System. *PLoS ONE*, [S. l.], v. 8, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069161.

VASSÃO, Daniel Giddings; WIELSCH, Natalie; GOMES, Ana Maria de Melo Moreira; GEBAUER-JUNG, Steffi; HUPFER, Yvonne; SVATOŠ, Aleš; GERSHENZON, Jonathan. Plant defensive β -Glucosidases resist digestion and sustain activity in the gut of a lepidopteran herbivore. *Frontiers in Plant Science*, [S. l.], v. 9, n. October, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01389. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01389/full>.

WADLEIGH, Richard W.; YU, Simon J. Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species. *Journal of Chemical Ecology*, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 1279–1288, 1988. DOI: 10.1007/BF01019352. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01019352>. Acesso em: 8 abr. 2022.

WALKER, David R.; ALL, John N.; MCPHERSON, Robert M.; BOERMA, H. Roger; PARROTT, Wayne A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noetuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia, Athens 30602-7272, USA. DOI - 10.1603/0022-0493-93.3.613 SRC - Pubmed ID2 - 10902306 FG - 0, v. 93, n. 3, p. 613–622, 2000. DOI: 10.1603/0022-0493-93.3.613. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/0022-0493-93.3.613>. Acesso em: 31 mar. 2021.

WANG, Xialu; WANG, Kailin; HE, Yuanyuan; LU, Xinrui; WEN, Daihua; WU, Chunfu; ZHANG, Jinghai; ZHANG, Rong. The functions of serpin-3, a negative-regulator involved in prophenoloxidase activation and antimicrobial peptides expression of Chinese oak silkworm,

Antheraea pernyi. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 69, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1016/j.dci.2016.11.022.

WINDE, Inis; WITTSTOCK, Ute. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 13, p. 1566–1575, 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942211000422>. Acesso em: 8 abr. 2021.

WU, Kai; YANG, Bing; HUANG, Wuren; DOBENS, Leonard; SONG, Hongsheng; LING, Erjun. Gut immunity in Lepidopteran insects. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 64, p. 65–74, 2016. DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.010.

XAVIER, Luciana Pereira; OLIVEIRA, Maria Goreti Almeida; GUEDES, Raul Narciso Carvalho; SANTOS, Agenor Valadares; DE SIMONE, Salvatore Giovanni. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 147–153, 2005. DOI: 10.14411/eje.2005.023. Disponível em: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2005.023.html>. Acesso em: 19 abr. 2021.

XI, Jinghui; WANG, Xu; LI, Shanyu; ZHOU, Xin; YUE, Lin; FAN, Jia; HAO, Dongyun. Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. **Phytochemistry**, Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of the Ministry of Education (Jilin University), Changchun 130021, PR China. DOI - 10.1016/j.phytochem.2006.08.005 SRC - Pubmed ID2 - 16973185 FG - 0, v. 67, n. 21, p. 2341–2348, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.08.005. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=16973185&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

YU, S. J. Microsomal oxidation of allelochemicals in generalist (*Spodoptera frugiperda*) and semispecialist (*Anticarsia gemmatalis*) insect. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 423–436, 1987. DOI: 10.1007/BF01880090. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01880090>.

ZHU, Yifei; WANG, Yang; GORMAN, Maureen J.; JIANG, Haobo; KANOST, Michael R. *Manduca sexta* Serpin-3 Regulates Prophenoloxidase Activation in Response to Infection by Inhibiting Prophenoloxidase-activating Proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 47, p. 46556–46564, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M309682200.

ZIBAEE, Arash; BANDANI, Ali Reza; FAZELI-DINAN, Mahmoud; ZIBAEE, Idin; SENDI, Jalal Jalali; MALEKI, Feizollah A. A trypsin-like protease in rice green semi-looper, *Naranga aenescens moore* (Lepidoptera: Noctuidae): Purification and characterization. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. arash.zibae@gmx.com. DOI - 10.1002/arch.20435 SRC - Pubmed ID2 - 21678486 FG - 0, v. 78, n. 1, p. 1–16, 2011. DOI: 10.1002/arch.20435. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/arch.20435>. Acesso em: 28 maio. 2022.

TABELAS

Tabela 1. Identificação de hidrolase do quinto instar intestinos de *Anticarsia gemmatalis* por cromatografia líquida-espectrometria de massa

Sub-subclasse	Descrição	Query <i>A. gemmatalis</i>	Gene <i>B. mori</i>	Score	Identities
Carboxylic-ester hydrolases	bile salt-activated lipase-like	GFUV01000494.1_527	LOC101737366	96.8649 (106)	149/209 (71.29)
Carboxylic-ester hydrolases	time interval measuring enzyme-esterase A4	GFUV01000849.1_899	LOC692772	131.129 (144)	226/330 (68.48)
Glicosidases	alpha amylase	GFUV01000649.1_693	LOC100500759	96.8649 (106)	80/98 (81.63)
Glicosidases	alpha amylase	GFUV01001924.1_2019	LOC100500759	86.0446 (94)	91/119 (76.47)
Glicosidases	beta-fructofuranosidase	GFUV01001357.1_1425	LOC100145905	286.219 (316)	921/1404 (65.60)
Glicosidases	glucosidase	GFUV01000088.1_98	LOC692627	302.449 (334)	291/372 (78.23)
Glicosidases	maltase 2-like	GFUV01000649.1_693	LOC101738762	102.275 (112)	189/275 (68.73)
Glicosidases	maltase A1-like	GFUV01000649.1_693	LOC101738628	206.87 (228)	301/424 (70.99)
Glicosidases	myrosinase 1	GFUV01005532.1_5832	LOC101741245	183.427 (202)	378/553 (68.35)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01000088.1_98	LOC101737930	77.0278 (84)	83/110 (75.45)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01000103.1_114	LOC101737249	147.359 (162)	378/571 (66.20)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01000398.1_429	LOC101737249	242.938 (268)	545/802 (67.96)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01000811.1_860	LOC101741385	105.882 (116)	225/330 (68.18)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01001071.1_1129	LOC101738689	179.82 (198)	329/473 (69.56)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01001367.1_1435	LOC101736497	235.724 (260)	668/998 (66.93)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01002356.1_2471	LOC101736636	169.0 (186)	160/203 (78.82)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01002650.1_2772	LOC101737930	77.0278 (84)	83/110 (75.45)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01003681.1_3834	LOC101737930	210.477 (232)	246/331 (74.32)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01004009.1_4191	LOC101736379	167.196 (184)	289/412 (70.15)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01004362.1_4545	LOC101736636	179.82 (198)	210/282 (74.47)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01004616.1_4830	LOC101737249	215.887 (238)	348/498 (69.88)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01004824.1_5038	LOC101738689	77.0278 (84)	135/195 (69.23)

Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01005158.1_5372	LOC101747172	69.8143 (76)	156/233 (66.95)
Glicosidases	myrosinase 1-like	GFUV01005622.1_5922	LOC101736636	125.719 (138)	115/144 (79.86)
Glicosidases	uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	GFUV01000144.1_155	LOC733140	609.022 (674)	738/1002 (73.65)
Glicosidases	uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	GFUV01005558.1_5858	LOC733140	208.674 (230)	229/298 (76.85)
Ether hydrolases	juvenile hormone epoxide hydrolase-like protein 5	GFUV01000754.1_800	LOC100415790	412.454 (456)	738/1071 (68.91)
Aminopeptidases	aminopeptidase N	GFUV01000653.1_697	LOC692370	246.544 (272)	461/670 (68.81)
Aminopeptidases	aminopeptidase N3	GFUV01000223.1_242	LOC100127057	562.134 (622)	946/1353 (69.92)
Aminopeptidases	aminopeptidase N3	GFUV01005935.1_6235	LOC100127057	250.151 (276)	291/393 (74.05)
Aminopeptidases	putative aminopeptidase W07G4.4	GFUV01002991.1_3133	LOC101742623	508.033 (562)	807/1145 (70.48)
Aminopeptidases	xaa-Pro aminopeptidase 1	GFUV01003879.1_4060	LOC101742084	104.078 (114)	232/347 (66.86)
Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases	venom dipeptidyl peptidase 4-like	GFUV01001023.1_1077	LOC101742792	178.016 (196)	158/198 (79.80)
Serine-type carboxypeptidases	carboxypeptidase B-like	GFUV01000837.1_887	LOC101745363	439.505 (486)	641/902 (71.06)
Serine-type carboxypeptidases	carboxypeptidase B-like	GFUV01001100.1_1158	LOC101740853	295.235 (326)	450/638 (70.53)
Serine-type carboxypeptidases	carboxypeptidase B-like	GFUV01001531.1_1607	LOC101740853	470.162 (520)	822/1185 (69.37)
Serine-type carboxypeptidases	carboxypeptidase B-like	GFUV01001656.1_1737	LOC101745363	390.814 (432)	560/779 (71.89)
Serine-type carboxypeptidases	carboxypeptidase Q-like	GFUV01001131.1_1192	LOC101744086	769.521 (852)	973/1331 (73.10)
Metallo-carboxypeptidases	zinc carboxypeptidase-like	GFUV01000385.1_415	LOC101745066	116.702 (128)	375/576 (65.10)
Metallo-carboxypeptidases	zinc carboxypeptidase-like	GFUV01001070.1_1128	LOC101745066	73.4211 (80)	64/80 (80.00)

Omega peptidases	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8-like	GFUV01006063.1_6363	LOC101736709	143.752 (158)	121/149 (81.21)
Serine endopeptidases	35kDa protease	GFUV01002854.1_2983	LOC692590	95.0615 (104)	232/347 (66.86)
Serine endopeptidases	brachyurin-like	GFUV01000120.1_131	LOC101740293	221.297 (244)	428/623 (68.70)
Serine endopeptidases	brachyurin-like	GFUV01000120.1_131	LOC101740293	221.297 (244)	428/623 (68.70)
Serine endopeptidases	brachyurin-like	GFUV01000161.1_176	LOC101740147	69.8143 (76)	116/168 (69.05)
Serine endopeptidases	brachyurin-like	GFUV01002171.1_2280	LOC101738048	203.264 (224)	274/382 (71.73)
Serine endopeptidases	cathepsin B	GFUV01004118.1_4300	LOC692390	239.331 (264)	242/315 (76.83)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-2-like	GFUV01000022.1_25	LOC101737248	179.82 (198)	245/335 (73.13)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-like elastase family member 1	GFUV01002250.1_2359	LOC692380	75.2244 (82)	94/129 (72.87)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-like elastase family member 1	GFUV01004555.1_4769	LOC692380	187.033 (206)	314/454 (69.16)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-like serine protease	GFUV01000464.1_495	LOC732967	96.8649 (106)	184/271 (67.90)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-like serine protease	GFUV01002278.1_2387	LOC732967	105.882 (116)	125/170 (73.53)
Serine endopeptidases	chymotrypsin-like serine protease	GFUV01002651.1_2773	LOC732967	104.078 (114)	122/165 (73.94)
Serine endopeptidases	serine protease	GFUV01000011.1_13	LOC692357	86.0446 (94)	143/205 (69.76)
Serine endopeptidases	serine protease	GFUV01000036.1_41	LOC692357	93.2581 (102)	125/169 (73.96)
Serine endopeptidases	serine protease	GFUV01000098.1_109	LOC692447	95.0615 (104)	181/265 (68.30)
Serine endopeptidases	serine protease	GFUV01000228.1_247	LOC692447	68.0109 (74)	74/96 (77.08)
Serine endopeptidases	serine protease	GFUV01003174.1_3317	LOC692357	192.443 (212)	252/341 (73.90)
Serine endopeptidases	serine protease inhibitor 21	GFUV01000723.1_769	LOC100272186	176.213 (194)	599/924 (64.83)
Serine endopeptidases	transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000027.1_31	LOC101735750	127.522 (140)	161/220 (73.18)
Serine endopeptidases	transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000161.1_176	LOC101735750	109.488 (120)	193/279 (69.18)
Serine endopeptidases	transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000278.1_304	LOC101735750	98.6682 (108)	189/274 (68.98)

Serine endopeptidases	transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000792.1_838	LOC101735750	66.2076 (72)	108/156 (69.23)
Serine endopeptidases	transmembrane protease serine 9-like	GFUV01004166.1_4348	LOC101735750	116.702 (128)	301/454 (66.30)
Serine endopeptidases	trypsin alpha-3-like	GFUV01004150.1_4332	LOC101739308	111.292 (122)	267/399 (66.92)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline A-like	GFUV01000428.1_459	LOC101737834	95.0615 (104)	128/178 (71.91)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01000200.1_218	LOC101738353	132.932 (146)	402/605 (66.45)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01000683.1_727	LOC101738353	179.82 (198)	157/193 (81.35)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01000813.1_862	LOC101747046	136.539 (150)	254/372 (68.28)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01000954.1_1007	LOC101736414	78.8312 (86)	138/201 (68.66)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01000974.1_1027	LOC101738353	125.719 (138)	251/369 (68.02)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001099.1_1157	LOC101738353	147.359 (162)	238/335 (71.04)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001224.1_1286	LOC101738353	98.6682 (108)	138/191 (72.25)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001333.1_1396	LOC101736414	68.0109 (74)	63/80 (78.75)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001769.1_1859	LOC101738624	77.0278 (84)	187/279 (67.03)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001775.1_1865	LOC101738353	203.264 (224)	204/264 (77.27)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01005229.1_5443	LOC101738353	111.292 (122)	107/135 (79.26)
Serine endopeptidases	venom serine protease-like, transcript variant X1	GFUV01001559.1_1635	LOC101744823	132.932 (146)	267/395 (67.59)
Serine endopeptidases	venom serine protease-like, transcript variant X1	GFUV01003194.1_3337	LOC101744823	136.539 (150)	247/361 (68.42)
Metalloendopeptidases	collagenase-like	GFUV01000489.1_522	LOC101735472	80.6345 (88)	120/168 (71.43)
Hydrolases acting in nitriles	aliphatic nitrilase	GFUV01000757.1_803	LOC100329149	987.729 (1094)	919/1167 (78.75)
Hydrolases acting on phosphorous-nitrogen bonds	phosphohistidine phosphatase	GFUV01000316.1_343	LOC692960	109.488 (120)	153/215 (71.16)
-	antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01001446.1_1515	LOC692739	78.8312 (86)	174/257 (67.70)
-	antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01001743.1_1833	LOC692739	118.505 (130)	379/583 (65.01)

-	antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01002634.1_2756	LOC692739	78.8312 (86)	141/205 (68.78)
-	serine protease inhibitor 2	GFUV01006839.1_7139	LOC692573	100.472 (110)	120/161 (74.53)
-	uncharacterized LOC100500745	GFUV01002171.1_2280	LOC100500745	91.4547 (100)	155/225 (68.89)
-	uncharacterized LOC101735686	GFUV01000435.1_466	LOC101735686	223.101 (246)	340/480 (70.83)
-	uncharacterized LOC101735686	GFUV01004411.1_4594	LOC101735686	141.949 (156)	157/207 (75.85)
-	uncharacterized LOC101735686	GFUV01005222.1_5436	LOC101735686	131.129 (144)	160/216 (74.07)
-	uncharacterized LOC101736728	GFUV01004657.1_4871	LOC101736728	315.072 (348)	326/427 (76.35)
-	uncharacterized LOC101737875, transcript variant X5	GFUV01000735.1_781	LOC101737875	279.005 (308)	491/713 (68.86)
-	uncharacterized LOC101743712	GFUV01003921.1_4102	LOC101743712	152.769 (168)	168/224 (75.00)
-	uncharacterized LOC101743760	GFUV01006166.1_6466	LOC101743760	152.769 (168)	253/361 (70.08)
-	uncharacterized LOC101744336	GFUV01000685.1_729	LOC101744336	675.746 (748)	828/1128 (73.40)
-	uncharacterized LOC105842978	GFUV01001986.1_2088	LOC105842978	100.472 (110)	132/178 (74.16)

Tabela suplementar 1. Resultados da proteína do modelo tridimensional gerada pelo Phyre2, análise da qualidade dos modelos e *docking* entre digestivos de tripsina de *Anticarsia gemmatalis* e inibidores de proteína

Proteins	Tridimensional Model Protein (Phyre2)			Ramachandram plot quality			Protein Structure Analyses	Docking SERPIN	Docking SKTI
	Minimum Condidence	Minimum % i.d.	Tamplate	Allo wed	General	Disallowed	Overall Model quality	CLUSPRO	
Trypsins									
<i>B. mori</i>	100	32	20	92.9	5.1	2.0	-2.77	-795.6	-1086.7
<i>A.gemmatalis 1</i>	100	31	20	88.1	8.7	3.2	-5.82	-784.0	-1088.5
<i>A.gemmatalis 2</i>	100	31	20	91.3	5.2	3.5	-3.88	-784.3	-1110.2
<i>A.gemmatalis 3</i>	100	28	20	91.2	5.8	3.0	-3.55	-845.7	-1017.3
<i>A.gemmatalis 4</i>	100	25	20	88.1	9.2	2.7	-4.13	-866.1	-929.4
<i>A.gemmatalis 5</i>	100	26	20	91.5	6.4	2.1	-4.39	-651.0	-905.4
<i>A.gemmatalis 6</i>	100	31	20	88.9	8.2	2.9	-2.51	-746.2	-984.3
<i>A.gemmatalis 7</i>	100	27	20	83.5	14.6	1.9	-5.45	-832.1	-1153.2
<i>A.gemmatalis 8</i>	100	30	20	90.7	6.7	2.6	-5.66	-793.2	-1030.4
<i>A.gemmatalis 9</i>	100	31	20	90.5	6.2	3.3	-4.55	-692.5	-930.4
<i>A.gemmatalis 10</i>	100	33	20	89.4	7.5	3.1	-5.82	-776.3	-995.4
<i>A.gemmatalis 11</i>	100	32	20	87.4	8.8	3.7	-6.19	-776.6	-1305.8

<i>A.gemmatalis</i> <i>12</i>	100	27	20	90.8	6.3	2.9	-5.12	-717.7	-1104.4
<i>A.gemmatalis</i> <i>13</i>	100	31	20	82.8	13.8	3.3	-4.13	-845.5	-1132.8
Inhibitors									
SERPIN	100	24	20	92.9	5.8	1.3	-2.09		
SKTI	100	20	20	90.9	6.7	2.4	-1.80		

CAPÍTULO III - Extensa reprogramação de isoformas proteicas e alterações histopatológicas no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* alimentado com inibidores de protease

ARTIGO III - Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors - Publicado na revista *Annals of Applied Biology*. Ed. Wiley - <https://doi.org/10.1111/aab.12740>

Extensa reprogramação de isoformas proteicas e alterações histopatológicas no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* alimentado com inibidores de protease

RESUMO

Os inibidores de protease (IPs) interferem na digestão, levando à má absorção de nutrientes e diminuindo a disponibilidade de aminoácidos para os insetos. A ingestão de IPs pode retardar o desenvolvimento, causar malformações anatômicas, reduzir a fertilidade e alterar o conjunto de proteases no intestino do inseto. Este estudo avaliou o perfil proteômico no intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* alimentados com inibidores de protease sintéticos (Berenil® com bis-benzamidina como ingrediente ativo) e naturais (SKTI) e seus efeitos sobre a fisiologia intestinal, atividade proteolítica e as características estruturais da ligação do inibidor de tripsina. Maior número de isoformas de proteínas foram identificadas especialmente relacionadas à atividade de proteases e processos de estresse, sendo que o IP sintético desencadeou uma reprogramação menor que o SKTI. Além disso, o Berenil promoveu maior redução na atividade da protease do intestino médio nos primeiros tempos de tratamento com IP. A modelagem molecular das interações entre as proteases identificadas e os IPs indicou que o Berenil pode interagir com as enzimas da tripsina e acessar um sítio mais hidrofóbico promovendo o efeito inibitório sobre as serino-proteases. Além disso, sua capacidade inibitória e dano estrutural nas células do intestino médio foi acelerada possivelmente pelo atraso na expressão de proteases, pela reprogramação menos extensa e pela menor expressão de isoformas suprarreguladas. Assim, a nossos resultados mostram que o uso de IPs sintéticos, como o Berenil, pode ser eficiente para o manejo de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: bis-benzamidina, larvas, proteoma, soja, tripsina.

ABSTRACT

Protease inhibitors (PIs) interfere with digestion, leading to poor nutrient absorption and decreasing amino acid availability in insects. Ingestion of PIs can delay development, cause anatomical malformations, reduce fertility, and changes the set of proteases in the insect gut. This study evaluated the proteomic profile in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed on synthetic (Berenil® with bis-benzamidine as active ingredient) and natural (SKTI) protease inhibitors and their effect on the gut physiology, proteolytic activity, and the structural characteristics of the trypsin-inhibitor binding. Larger number of protein isoforms were identified specially related to protease activity and stress processes, being that the synthetic PI triggered a lower reprogramming than SKTI. Furthermore, Berenil promoted higher reduction on midgut protease activity at first times of PI treatment. Molecular modeling of the interactions between the identified proteases and PIs indicated that Berenil can interact with the trypsin enzymes and access to a more hydrophobic site promoting the inhibitory effect on serine proteases. Besides, its inhibitory capacity and structural damage on the midgut cells was sped up possibly by the delay in the expression of proteases, the reprogramming less extensive and the lower expression of up-regulated isoforms. Thus, our results show that the use of synthetic PIs, such as Berenil, can be efficient for the management of *A. gemmatalis*.

Keywords: bis-benzamidine, larvae, proteome, soybean, trypsin.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga desfolhadora da soja (*Glycine max*), comprometendo a produtividade com sérios efeitos econômicos (BUENO et al., 2021; LIMA et al., 2020; WALKER et al., 2000). A perda econômica na cultura da soja causada por *A. gemmatalis* tem incentivado a busca por estratégias de controle de pragas que atualmente são baseadas em inseticidas sintéticos (KRINSKI; FOERSTER; DESCHAMPS, 2018). No entanto, abordagens alternativas são necessárias para reduzir os efeitos poluentes, riscos para insetos benéficos não-alvo e evolução da resistência a inseticidas em populações de pragas.

Em *A. gemmatalis*, assim como em outros insetos, as proteases digestivas, incluindo serino proteases no canal alimentar, hidrolisam principalmente as proteínas ingeridas e, posteriormente, influenciam tanto o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução do inseto (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; HEMMATI et al., 2017; HEMMATI; MEHRABADI, 2020). Tripsinas-like são as principais serino proteases em *A. gemmatalis* e sua inibição promove grande impacto na capacidade de digestão proteica no intestino médio (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2005; PATARROYO-VARGAS et al., 2018). Por esse motivo, as tripsinas-like têm sido foco de inibição para comprometer o desenvolvimento larval (MERIÑO-CABRERA et al., 2020a).

Muitos peptídeos naturais e inibidores sintéticos de tripsina possuem uma arginina ou uma lisina que se liga no sítio de especificidade da enzima, próximo à tríade catalítica responsável pela catálise (DE ALMEIDA BARROS et al., 2021; PRESNELL et al., 1998). Em particular, a benzamidina, um imitador estrutural da arginina e um potente inibidor (MARESGUIA; SHAW, 1965), é o componente primário de muitos inibidores maiores. De fato, a potência e especificidade para diferentes serino-proteases podem ser alcançadas pela incorporação do pequeno inibidor benzamidina em inibidores sintéticos maiores e mais complexos, como bis-benzamidina, um composto ativo de Berenil®. Este inibidor é um exemplo de um inibidor sintético de tripsina (OLIVEIRA et al., 1993) mas seu efeito potencial como inseticida, repelente e antialimentar contra pragas foi pouco testado em comparação com o inibidor natural de soja SKTI (MARINHO-PRADO et al., 2012; PATARROYO-VARGAS et al., 2020).

O conhecimento mais profundo das serino-proteases e sua ligação molecular a inibidores que afetam a atividade proteolítica e a fisiologia intestinal em *A. gemmatalis* é fundamental para o controle desse inseto-praga. A exposição ao Berenil permite conhecer

melhor o centro ativo da tripsina e as interações moleculares com os IPs, bem como avaliar o uso de inibidores sintéticos como estratégia de manejo integrado de pragas. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar as isoformas de proteínas envolvidas na resposta de *A. gemmatalis* à ingestão de inibidores de protease sintéticos (Bis-benzamidina) e naturais (SKTI) e seus efeitos nas características estruturais do epitélio do intestino médio, atividade proteolítica e características da ligação do inibidor de tripsinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos e preparo da dieta artificial contendo IPs

Os insetos foram criados a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $70\% \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo 14:10 (claro:escuro) no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Para manter os insetos adultos, gaiolas de 50 x 50 cm foram teladas e revestidas internamente com folhas de papel. As pupas foram colocadas em placas de Petri (150 x 20 mm) dentro das gaiolas e, após a eclosão, as mariposas foram alimentadas com uma solução nutritiva composta por mel (20,0 g), cerveja (350 mL), sacarose (50 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (650 mL), embebidos em uma bola de algodão colocada no fundo da gaiola. As folhas de papel contendo ovos de *A. gemmatalis* foram cortadas em tiras de 2,5 x 10 cm e transferidas para frascos plásticos de 500 mL. Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial de acordo com Greene et al. (1976). As larvas de quinto ínstar foram separadas em gaiolas de 2 x 5 cm e alimentadas com dieta (controle) e dietas suplementadas com IPs 0,0019% (p/v) do inibidor sintético de serino-protease Berenil (Br) (tratamento 1) e 0,01% (w/v) de serino-protease Kunitz (SKTI) (tratamento 2) conforme descrito por Chougule et al. (2008). As lagartas foram coletadas após 6, 12, 24 e 48 h de cada tratamento e respectivos controles. Os intestinos retirados e armazenados a -80 °C . Para cada tratamento foram utilizados 10 potes com 2 lagartas.

2.2. Análise proteômica por 2DE-LC/MS

O intestino médio de lagartas de quinto ínstar (quatro por tratamento e controle) foram dissecados, agrupados e macerados com bastão de vidro estéril sob 1,0 mL de solução de HCl 10^{-3} M , a 4 °C , e depois centrifugados a 10000 g, por 10 min, a 4 °C , para remover detritos celulares (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005). Em seguida, o sobrenadante obtido

contendo as proteínas foi coletado e precipitado com um volume de ácido tricloroacético a 10% em acetona por 12 h a -20 °C. A solução foi centrifugada a 6000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão e lavado duas vezes com acetona a 80% em gelo e centrifugado a 6000 g por 10 min a 4 °C. Por fim, o pellet foi lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O extrato proteico obtido foi solubilizado em tampão de solubilização composto por 7 M de uréia, 2 M de tiouréia e 2% de CHAPS. A solução foi solubilizada usando o Processador UltraSonic (Modelo GE 50) por ciclos de 5 a 10 s até a completa solubilização do pellet e as amostras foram armazenadas a -80 °C. As concentrações de proteína foram medidas pelo método de Bradford (1976).

A focagem isoeétrica (IEF) foi realizada em uma tira de IPG de 24 cm pH 3-10 (GE Healthcare). As tiras foram previamente reidratadas por 14-20 h com 450 µL de tampão de reidratação (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de CHAPS, azul de bromofenol 0,002%, 2% de tampão IPG, 0,2% de DTT) com a adição de DeStreak 50% reagente (GE Healthcare). A quantidade de proteína em cada amostra foi de 1,3 mg. As proteínas foram separadas na primeira dimensão usando o sistema de focagem IPGphor3 (GE Healthcare). Após a focalização, foram adicionados às tiras o tampão de equilíbrio (6 M de uréia, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 30% de glicerol e 4% de SDS) contendo inicialmente 1% (p/v) de DTT por 15 min seguido de 2,5 % (p/v) de iodoacetamida durante 15 min à temperatura ambiente. As tiras de IPG foram colocadas em gel de poliacrilamida a 12% e seladas com agarose a 0,5%.

Os géis foram submetidos à eletroforese no sistema EthanDalt Six (GE Healthcare) a 20 mA/gel por 10 h. Ao final da eletroforese, os géis foram fixados por 16 h em solução de etanol 40% e ácido acético 10%. Para visualizar as manchas de proteína, os géis foram submersos em solução de azul brilhante de Coomassie por 48 h e foram lavados com água ultrapura para eliminar o excesso de solução corante. Os géis foram armazenados em solução de ácido acético a 5% e digitalizados com ImageScanner III (GE Healthcare), com calibração de imagem pelo software Labscan (GE Healthcare).

Os perfis de proteínas do intestino médio de lagartas expostas ou não a IP para cada vez (em pares) foram comparados pelo software ImageMaster 2D Platinum 7 (GE Healthcare) para determinar os pontos de abundância de proteínas. Os pontos que apresentaram valores de rádio acima de 1,0 e ANOVA com valores de p abaixo de 0,05 foram considerados como expressos diferencialmente. Três réplicas biológicas foram usadas para cada tratamento. As abundâncias (% V) das manchas de proteína expressas diferencialmente usando os critérios acima foram convertidas para mudança de *fold change* e classificadas como reguladas para cima ou para baixo.

As manchas protéicas dos géis foram cortadas e previamente descoloridas em solução de bicarbonato de amônio 50 mM/metanol a 50%, seguida de desidratação com acetonitrila. As proteínas foram então reduzidas com solução de DTT 200 mM preparada em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56 °C e alquilação com solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min em temperatura ambiente. Os pedaços de géis foram lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM, desidratados com acetonitrila e secos por centrifugação a vácuo. Para a digestão proteolítica, as manchas foram reidratadas com 20 ng μL^{-1} de solução de tripsina por 20 h a 37 °C. Os peptídeos digeridos foram extraídos por três ciclos usando o tampão de extração (50% (v/v) acetonitrila, 5% (v/v) ácido fórmico) e secos por centrifugação a vácuo. Os peptídeos foram dissolvidos em ácido fórmico a 0,1% (v/v) e analisados por LC-MS usando um sistema nanoUPLC (nanoACQUITY-Waters) contendo uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 μM 100 nm \times 100 mm, operando a uma taxa de fluxo de 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em um espectrômetro de massa ION TRAP Amazon (Bruker), online usando uma agulha de ionização nanoESI. A varredura dos íons do espectrômetro de massa foi realizada entre 300 e 1500 m/z no modo positivo e os dados foram adquiridos por 70 min em cada análise LC-MS/MS. O espectrômetro de massa foi operado no modo auto-MSn. A aquisição de dados do instrumento LC-MS foi gerenciada pelo software Hystar (Bruker) e os espectros foram processados com o software Data Analysis (Bruker) usando as configurações padrão para proteômica. Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7.0 com licença de cliente local, conectado a um servidor remoto para identificação de proteínas. Os parâmetros usados no programa foram: um banco de dados de ESTs traduzido do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*, contendo 7806 contigs de DNA de sequências de RNA transcritas (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/308354) ou uma lista de proteínas baixada do UNIPROT para todos os insetos táxon; oxidação de metionina como modificação variável e carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de carga de 2⁺, 3⁺, 4⁺, enzima de clivagem tripsina-like e erro de massa de 0,15 Da. Para identificação de proteínas, consideramos uma taxa de falsa descoberta (FDR) inferior a 1,0%, juntamente com pelo menos três peptídeos únicos.

2.3. Atividades proteolíticas do intestino médio da lagarta

Para as atividades proteolíticas, 10 intestinos dissecados de larvas de quinto instar alimentados com IPs e controle para cada tempo foram colocados em 1 mL de solução de ácido clorídrico 10^{-3} M a 4 °C, (mantendo a proporção de quatro intestinos por 1 mL de solução). O extrato proteico contendo as enzimas proteolíticas foi obtido por lise celular resultante de três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento, seguido de maceração em pilão de polipropileno. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10000 g por 30 min a 4 °C e os pellets foram descartados. Os sobrenadantes contendo o material solúvel foram separados e armazenados a -20 °C.

A atividade das proteases totais do intestino das lagartas foi determinada usando azocaseína como substrato em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, CaCl₂ 20 mM (pH 8,0), a 37 °C. A taxa de formação do produto, calculada em $M s^{-1}$, foi obtida a partir dos valores de absorvância, utilizando-se a fórmula $V = A_{440} (\epsilon l t)^{-1}$, em que A_{440} corresponde à absorvância em 440 nm, ϵ é o molar coeficiente de extinção ($36 M^{-1} cm^{-1}$), l é o caminho óptico (1 cm) e t é o tempo de incubação da reação (120 s). Foram utilizadas alíquotas de 5 μ g de proteínas de cada amostra e 500 μ L de uma solução de azocaseína 0,3 mM e os valores de absorvância foram lidos continuamente a cada segundo até 120 s, no modo automático do espectrofotômetro (Hitachi UV-VIS, modelo U-5100), quando foram registrados os valores de A_{440} (para todas as amostras foi observado um aumento linear da absorvância).

A atividade de serino protease tripsina-like foi medida usando cloridrato de N- α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida 0,5 mM (L-BApNA) como substrato para atividade amidolítica (amidásica) diluída em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl₂, descrito por Erlanger et al. (1961). A atividade amidásica foi determinada pela formação de *p*-nitroanilina a 410 nm durante 2,5 min usando o coeficiente de extinção molar de $8800 M^{-1} cm^{-1}$. O experimento foi conduzido em uma série de 3 repetições e ANOVA de duas vias foi usada para comparar as respostas à exposição de IPs ao longo do tempo.

As concentrações de proteínas foram medidas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA), na concentração variando de 0 a 20 mg mL⁻¹ para a curva padrão. As atividades enzimáticas de todos os ensaios foram realizadas em triplicata e expressas de acordo com a concentração de proteína (μ mol s⁻¹ μ g⁻¹ de proteína).

2.4. Análises histológicas do intestino médio da lagarta

Para análise histológica, quatro lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com IPs e controle para cada tempo foram coletadas e dissecadas em NaCl 125 mM e transferidas para a solução fixadora de Zamboni (STEFANINI; MARTINO; ZAMBONI, 1967) por 12 h a 4 °C (FIAZ et al., 2018a). Em seguida, o intestino médio foi desidratado em série gradativa de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebido em historesina (Leica) seguindo as instruções do fabricante. Secções de três µm de espessura foram obtidas com micrótomo de rotação e coradas com hematoxilina (8 min) e eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz.

2.5. Docking proteína-ligante

A estrutura tridimensional das tripsinas de *A. gemmatalis* previamente modeladas (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020) utilizando o servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2015) foram utilizadas como receptores na análise de *docking* utilizando o software PyRx (DALLAKYAN; OLSON, 2015). O arquivo individual de cada tripsina foi aberto na ferramenta de triagem virtual PyRx como uma estrutura de proteína inicial no formato pdbqt. O ligante bis-benzamidina (Berenil) foi escolhido e automaticamente teve sua energia minimizada e convertida para o formato pdbqt. Em seguida, a caixa de grade foi aparecendo automaticamente e foi ajustada para cobrir toda a superfície do receptor da proteína. O encaixe foi realizado com Autodock Vina. O acoplamento proteína-ligante foi analisado por um ligante e comparado com oito receptores de tripsina. Os melhores valores de energia de afinidade e pose estrutural do ligante em cada encaixe foram obtidos/desenvolvidos em PyRx. O DS Visualizer 4.0 (Studio, 2012) e o Pymol (Molecular Graphics System, Versão 2.0 Schrodinger, LLC) foram usados para realizar todas as figuras. Os resultados estruturais dos encaixes entre tripsinas e Berenil foram comparados com os resultados do inibidor de SKTI (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020).

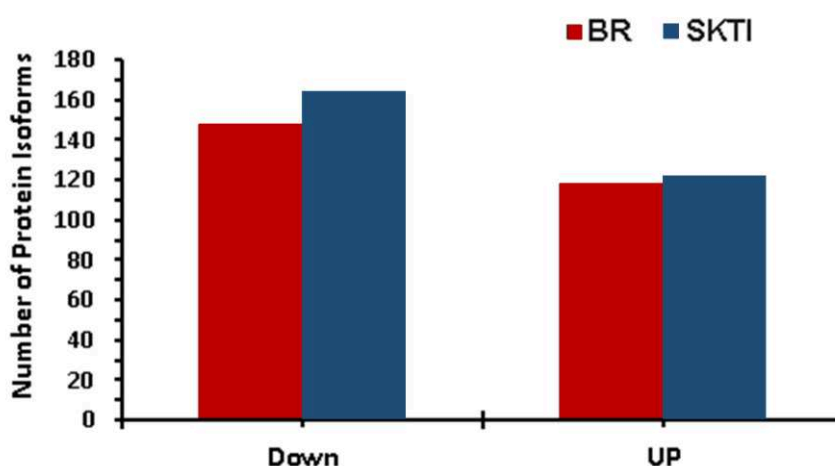
3. RESULTADOS

3.1. Perfis de expressão proteica do intestino médio de lagarta na presença de inibidores de protease

Inibidores de protease foram adicionados nas dietas das lagartas para avaliação da reprogramação da expressão proteica após 6, 12 e 24 h da ingestão (Fig. 1 e Tabela S1). Os perfis de proteína por 2-DE foram contrastados com os respectivos controles sem a adição de

IP e os aumentos ou diminuições das abundâncias de proteínas foram mostrados como regulados para cima e para baixo. Para todos os tratamentos, 312 e 240 manchas apresentaram abundâncias de proteínas diferenciadas e essas manchas foram classificadas como reguladas para cima e para baixo, respectivamente (Fig. 1A). Um número maior de proteínas foi regulado negativamente (57%), enquanto 43% foram regulados positivamente (Fig. 1A). Desses pontos, 134 foram identificados por LC-MS como peptídeos únicos, responsivos a SKTI, enquanto 126 pontos mostraram diferença na presença de Berenil (Tabela S2). Assim, um maior número de isoformas de proteínas foi encontrado nos perfis de 2-DE. Além disso, as IDs para *B. mori* homólogas dessas proteínas únicas, identificadas a partir dos perfis 2-DE de cada IP, foram comparadas para verificar as proteínas compartilhadas nos perfis de expressão (Fig. 1B). Destes, 23 proteínas únicas mostraram alterações na expressão de proteínas tanto para cima quanto para baixo tanto para Berenil quanto para SKTI (Fig. 1B). Portanto, é indicativo que para a mesma proteína foram detectadas ID em diferentes isoformas (manchas com ponto isoeletrico ou massa molecular diferente) com padrão de expressão diferencial. Caso contrário, aprox. 30% das proteínas únicas apresentaram alterações específicas para cada padrão/perfil de expressão (Fig. 1B).

(A)



(B)

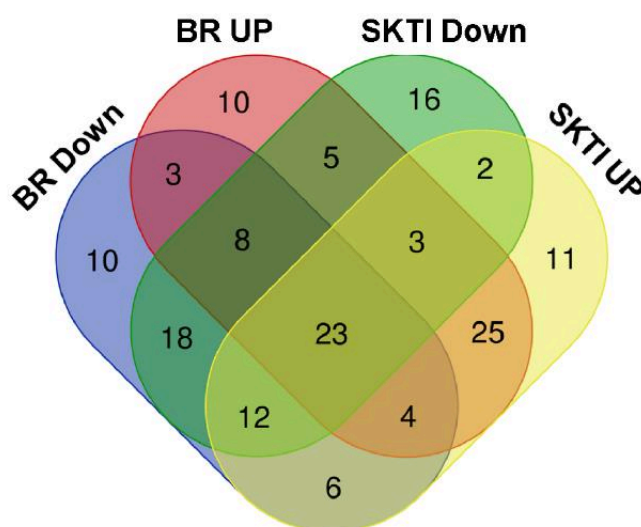
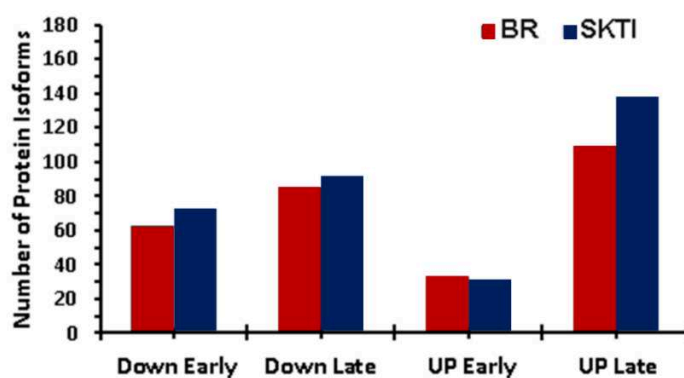


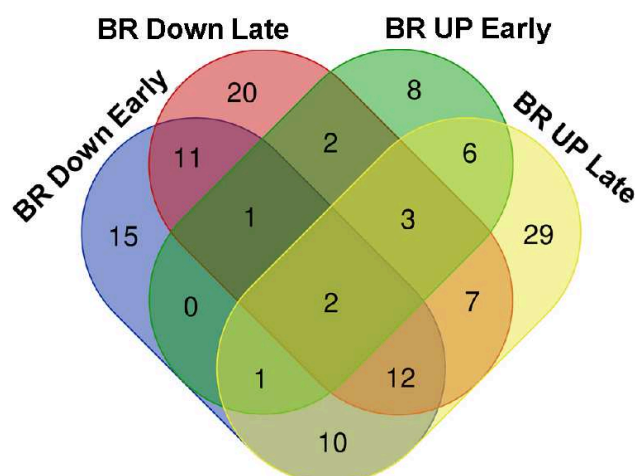
Figura 1. Distribuição das isoformas proteicas diferencialmente abundantes do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* alimentados com Berenil (BR) e inibidor de tripsina Kunitz de soja (SKTI). Em (A) os números de isoformas são classificados como regulados para cima e para baixo. Em (B) os números dessas isoformas mostram diferença nas abundâncias especificamente para cada IPs.

As abundâncias de proteínas com *fold change* para mais e para menos foram adicionalmente divididas como precoce e tardia para indicar a reprogramação da expressão proteica no intestino médio da lagarta antes de 12 h e após 24 h da ingestão de IP (Fig. 2). O número de isoformas de proteínas classificadas como reguladas para baixo precocemente ou tardiamente foi semelhante (Fig. 2A), enquanto aquelas classificadas como reguladas para cima tardiamente foram maiores do que reguladas para cima precocemente, especialmente para SKTI. Assim, indicando que as cascatas para ativar o aumento da expressão da proteína foram encontradas após 24 h da ingestão do IP, sendo 3,9 vezes maior do que após 12 h (Fig. 2A). Quando os IDs das proteínas únicas foram comparados, suas distribuições foram semelhantes entre Berenil (Fig. 2B) e SKTI (Fig. 2C), sendo apenas o número de proteínas suprarreguladas posteriormente foi maior para SKTI.

(A)



(B)



(C)

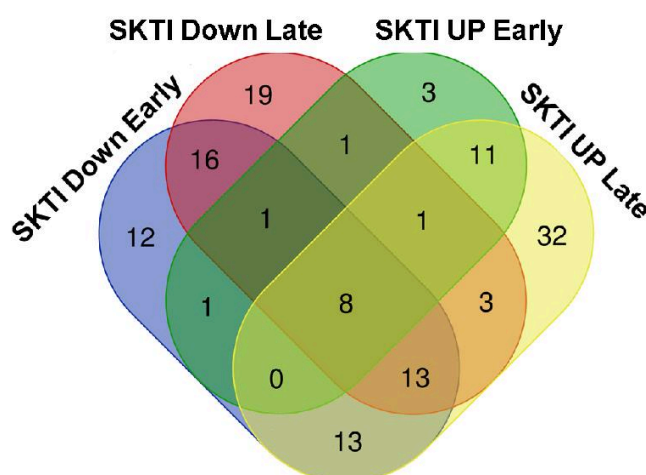


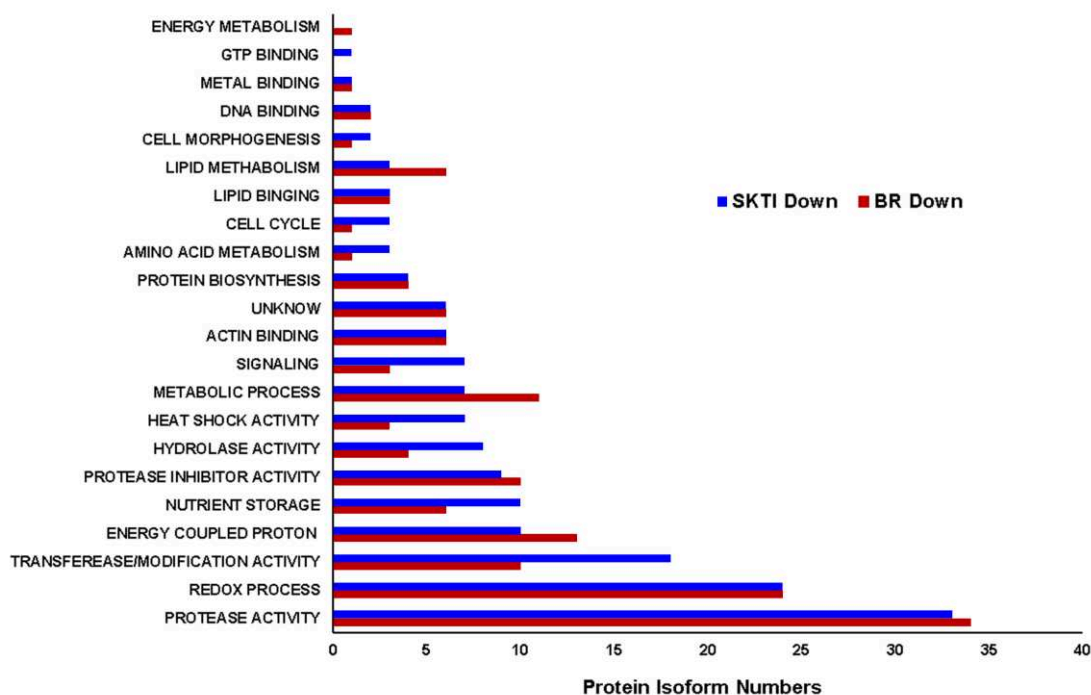
Figura 2. Efeito dos tempos de exposição na distribuição das isoformas proteicas diferencialmente abundantes do intestino médio de *A. gemmatalis* alimentados com Berenil (BR) e inibidor de tripsina Kunitz de soja (SKTI). As isoformas proteicas dos perfis 2DE foram classificadas como “precoces” quando a mancha foi detectada como diferencialmente abundante antes de 12 horas de exposição e como “tardia” após 12 horas. Em (A) o número de

isoformas reguladas para cima e para baixo durante os tempos de exposição precoce e tardia. Em (B) o número de isoformas mostrando regulação para cima e para baixo especificamente para cada tempo de exposição em resposta à presença de Berenil. Em (C) o número de isoformas mostrando regulação para cima e para baixo especificamente para cada tempo de exposição em resposta à presença de SKTI.

3.2. Classificação funcional das proteínas diferencialmente expressas

As IDs de *B. mori* homólogas às proteínas de *A. gemmatalis* identificadas a partir de perfis 2-DE foram usadas para categorização funcional que foram agrupadas por regulação para cima ou para baixo para cada IP (Fig. 3). Em geral, a maioria das isoformas de proteínas foram classificadas como pertencentes a proteases, processo redox, prótons acoplados a energia e classes de atividade de transferase/modificação (Fig. 3 e Tabela S1). Para isoformas de proteases reguladas negativamente, os números foram semelhantes entre os PIs Berenil e SKTI, com 34 e 33 isoformas, respectivamente (Fig. 3A), enquanto as isoformas reguladas positivamente foram aprox. 2,3 vezes maior para insetos alimentados com SKTI (Fig. 3B). Achado semelhante também ocorreu para outras classes funcionais de proteínas (Fig. 3A e 3B). Por outro lado, a isoforma transferase/classe de modificação foi regulada negativamente com SKTI.

(A)



(B)

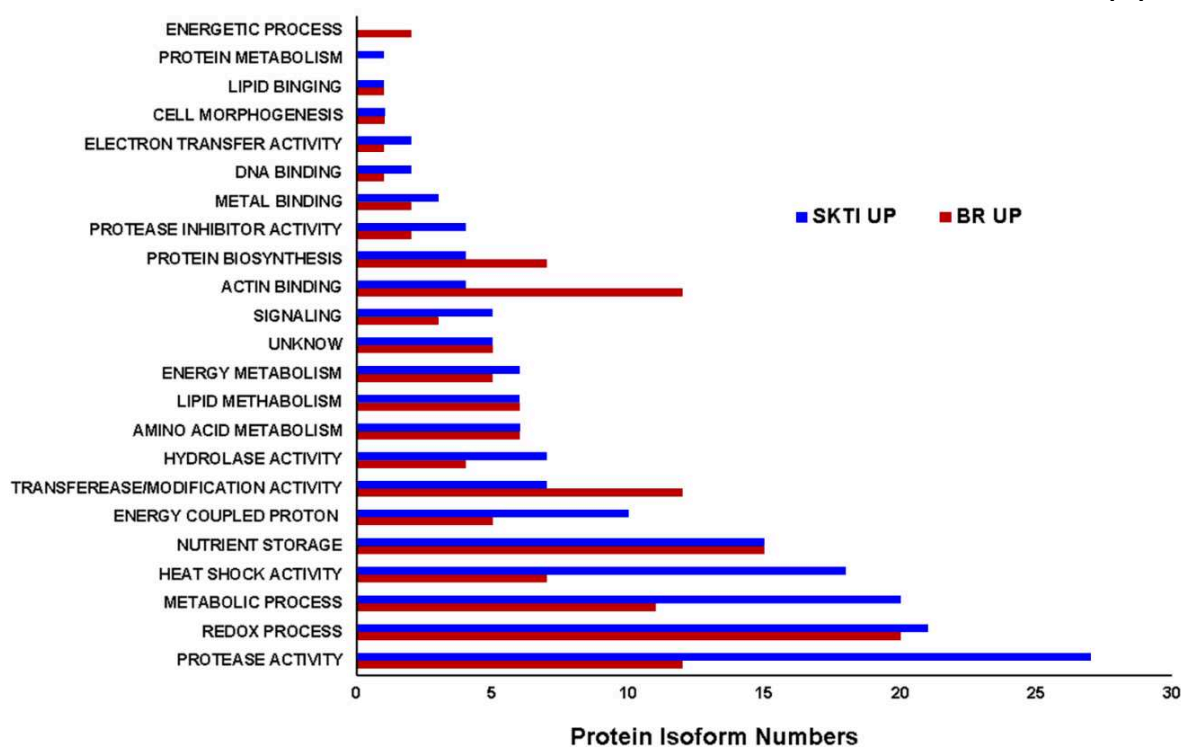


Figura 3. Categorização funcional (Gene Ontology) das proteínas de abundância diferencial do intestino médio de *A. gemmatalis* alimentados em Berenil (BR) e inibidor de tripsina Kunitz de soja (SKTI). (A) Número de isoformas reguladas negativamente. (B) Número de isoformas reguladas positivamente.

Outras isoformas de proteínas foram identificadas e agrupadas como hidrolases (Fig. 3A e 3B), incluindo domínio de proteína α , β -hidrolase-1 (2 isoformas) e hidrolase de éster carboxílico (5 isoformas). As alfa/beta-hidrolases pertencem a um grupo de enzimas estruturalmente relacionadas a diversas funções catalíticas, incluindo acetilcolinesterase, serino carboxipeptidase, prolil aminopeptidase e prolil oligopeptidase. Essa classe inclui as enzimas esterases, que hidrolisam as ligações ésteres presentes em uma ampla variedade de inseticidas e, portanto, essas enzimas podem estar envolvidas na resistência aos principais produtos químicos utilizados em programas de controle, mecanismo conhecido como resistência metabólica (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Algumas hidrolases foram identificadas como a proteína glicosil hidrolase família 31 com três isoformas que estão envolvidas no metabolismo de carboidratos.

Alguns grupos de proteínas regulados para cima e para baixo foram relacionados ao metabolismo energético, principalmente as bombas de prótons como ATP sintase, ATPase e proteínas de transferência de elétrons (Tabela S1), indicando que os IPs têm efeito direto e indireto no metabolismo celular do intestino médio da lagarta. Muitas proteínas demonstraram ser expressas de forma diferente em resposta aos IPs na dieta e têm atividades envolvendo reações de oxidação-redução (redox), incluindo várias desidrogenases, oxidoredutases, glutathione transferases, superóxido dismutase e tiol peroxirredoxina (Tabela S1). Muitos deles têm sido associados às respostas ao estresse oxidativo celular. Além disso, muitas isoformas foram identificadas como proteínas de choque térmico e a maioria foi regulada positivamente (Tabela S1). As proteínas de choque térmico de insetos incluem pequenas proteínas de choque térmico independentes de ATP e as proteínas maiores dependentes de ATP são sintetizadas constitutivamente em insetos e induzidas por condições de estresse (KING; MACRAE, 2015).

Alterações na abundância de proteínas mostraram que o metabolismo das células do intestino médio na presença dos IPs desencadeia um mecanismo adaptativo em resposta ao estresse nutricional. A expressão diferencial da via de glicólise, metabolismo de proteínas, absorção, transporte e ligação a ácidos graxos também mostram cascatas para modular o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios que ocorrem no intestino médio em resposta à presença de IPs (Tabela S1 e Fig. 3). Algumas proteínas responsivas pertencem a proteínas contendo domínio FABP e são importantes para a absorção e transporte de ácidos graxos no intestino médio durante os estágios de alimentação larval do inseto. Proteínas do metabolismo energético central também foram reguladas positivamente, provavelmente para compensar a redução da oferta de aminoácidos, como observado pelo aumento da abundância de glutamina sintetase (3 isoformas) e aspartato aminotransferase (1 isoforma).

Proteínas de armazenamento (SPs) e vitelogenina também foram reguladas em resposta aos IPs. O acúmulo e a utilização de SPs e vitelogenina são importantes para a metamorfose do inseto e funcionam como reserva de aminoácidos para a produção de proteínas adultas (OGAWA; TOJO, 1981; TELANG; BUCK; WHEELER, 2002). Os SPs de insetos são categorizados em dois grupos: proteínas ricas em metionina e proteínas ricas em aromáticos (arilforinas). Em *B. mori*, a proteína de armazenamento 1 (SP1) é nomeada para proteína rica em metionina, e a proteína de armazenamento 2 (SP2) é nomeada para proteína rica em aromáticos (arilforina). Para o armazenamento de proteína 1, os perfis de expressão foram semelhantes, no entanto, a arilforina foi regulada positivamente apenas em resposta a SKTI (Tabela S1).

As proteínas ribossomais, incluindo a proteína ribossomal L28 e L6, foram comuns no intestino médio de lagartas alimentadas com IPs. A proteína reguladora da biogênese do ribossomo foi regulada para baixo precocemente para ambos os IPs e, portanto, pode ser um sinal de que, sob estresse de inibição de protease e fome de aminoácidos, a biossíntese de proteínas foi prejudicada nas células do intestino médio. Os perfis de expressão de proteínas mostraram uma regulação negativa de uma proteína homóloga à proibitina, que compreende uma família altamente conservada de proteínas implicadas em importantes processos celulares, como estruturas de membrana, garantindo o recrutamento de proteases de membrana para facilitar o processamento do substrato (OCHOA-CAMPUZANO et al., 2013).

Sete proteínas únicas foram identificadas para responder a IPs no intestino médio da lagarta mostrando homologias com proteínas envolvidas em processos de sinalização celular, como a proteína quinase C, proteína citosólica de ligação ao hormônio juvenil 36 kDa e uma subunidade alfa de importina (Tabela S1). A família de genes da proteína quinase C (PKC) compreende serina/treonina quinases que atuam como moléculas sinalizadoras centrais e reguladoras de um amplo espectro de processos celulares, incluindo função de barreira epitelial e imunidade. A importina sub-alfa medeia o transporte da proteína ou RNA do citoplasma para o lúmen nuclear.

3.3. Abundâncias de protease em resposta a IPs adicionados nas dietas

As proteínas mais responsivas foram as subclasses de proteases (Tabela S1 e Fig. 3) porque uma longa história de estreita associação entre insetos herbívoros e suas plantas hospedeiras levou a respostas fisiológicas sofisticadas aos IPs dietéticos. As proteases foram classificadas em cinco tipos catalíticos: serina, treonina, cisteína, aspártica e metaloprotease.

Um total de 103 isoformas de proteínas foram identificadas para 20 proteases únicas (20 IDs homólogas a *B. mori*) (Tabela 1). De 103 proteínas, 34 e 31 isoformas foram reguladas para baixo precoce e tardiamente, enquanto quatro e 34 foram reguladas para cima precoce e tardiamente, respectivamente. Assim, 65 isoformas foram reguladas negativamente e 38 foram reguladas positivamente em resposta aos IPs.

Alterações nas abundâncias diferenciais foram mais observadas para a classe das serino-proteases (Tabela 1), como 70 isoformas e 13 proteínas únicas. Dentro da serino protease, 27 e 12 foram regulados positivamente, enquanto 17 e 28 foram regulados negativamente para SKTI e Berenil, respectivamente. Essa resposta inversa entre os IPs é indicativa de que SKTI desencadeia uma cascata diferente ou mais intensa para a biossíntese de isoformas de serino protease. Também foram identificadas 19 isoformas para duas proteínas únicas como metalocarboxipeptidase (Tabela 1). Interessante, outros tipos de isoformas de proteases foram identificados como pertencentes ao complexo proteassoma, com 11 isoformas para quatro proteínas únicas. Assim, mostra que sob estresse de privação de aminoácidos a degradação proteica foi ativada nas células intestinais da lagarta. De fato, uma proteína identificada apresentando homologia com uma proteína de *B. mori* (ID H9IYN7) atua na ativação da atividade da endopeptidase cisteína-*like* e está envolvida no processo apoptótico. Esta proteína foi suprarregulada tardiamente apenas para SKTI e foi classificada como “regulação da atividade da protease” na Tabela S1.

A partir dos perfis de proteína 2-DE, 21 isoformas de proteínas classificadas como “atividade de inibição de protease” foram identificadas (Tabela S1) para duas IDs homólogas de *B. mori* como serpina-2 e antiqumotripsina-2. Algumas isoformas foram reguladas para cima e outras para baixo de modo semelhante para SKTI e Berenil. Serpinas de insetos são encontradas expressas em vários órgãos, incluindo corpos gordurosos, intestino médio e hemócitos (MEEKINS; KANOST; MICHEL, 2017). Acredita-se que a maioria dessas serpinas está relacionada à imunidade inata e atua inibindo serino proteases. Por exemplo, quando *B. mori* foi desafiado por patógenos como *Micrococcus luteus* e *Serratia marcescens*, a expressão de serpin6 aumentou significativamente (LI et al., 2017). Verificou-se que BmSerpín6 inibiu diretamente a expressão das proteínas antimicrobianas drosomicina e gloverina2, e a atividade da polifenol oxidase (PPO) na cascata de melanização. Em estudos de *Manduca sexta*, os pesquisadores mostraram que a serpina-1 poderia formar um complexo com a serino protease hemolinfa protease 8 (HP8), para inibir a ativação da via Toll (AN et al., 2011) durante a infecção bacteriana. No entanto, o papel desses IPs nas cascatas regulatórias para responder aos IPs no intestino médio de insetos ainda não foi descrito.

3.4. Atividades de protease no intestino médio da lagarta na presença de IPs

Considerando as alterações nas abundâncias de proteases, tanto para proteínas únicas quanto para isoformas no intestino médio de lagartas alimentadas com IPs, as atividades de protease total e tripsina amidásica também foram avaliadas. Além disso, as abundâncias de isoformas de proteínas também foram reguladas para cima e para baixo dependendo do tempo de exposição e, portanto, foram testadas e comparadas para caracterizar as mudanças na atividade proteolítica no intestino médio por 6, 12, 24 e 48 h após a ingestão de IPs.

As atividades gerais da protease variaram de acordo com o tempo, apresentando reduções e aumentos em relação ao controle. Após 12 h, as atividades de protease foram 35% menores para ambos os IPs do que a dieta controle (Fig. 4A).

Assim, o aumento da atividade após 24 h em comparação com o controle é adaptativo e ajuda as larvas a superar os efeitos negativos da diminuição da atividade após 12 h. As larvas voltaram ao “normal” após 48 h, pois têm a mesma atividade que as larvas de controle. Por outro lado, a atividade proteolítica no intestino médio na presença de SKTI foi gradualmente recuperada após inibição em 12 h e após 48 h atingiu valores aprox. 50% maior que o controle. A atividade de serino-protease foi 53% menor para tripsina em lagartas alimentadas com Berenil, enquanto SKTI não teve efeito sobre a atividade de tripsina de acordo com os períodos avaliados (Fig. 4B).

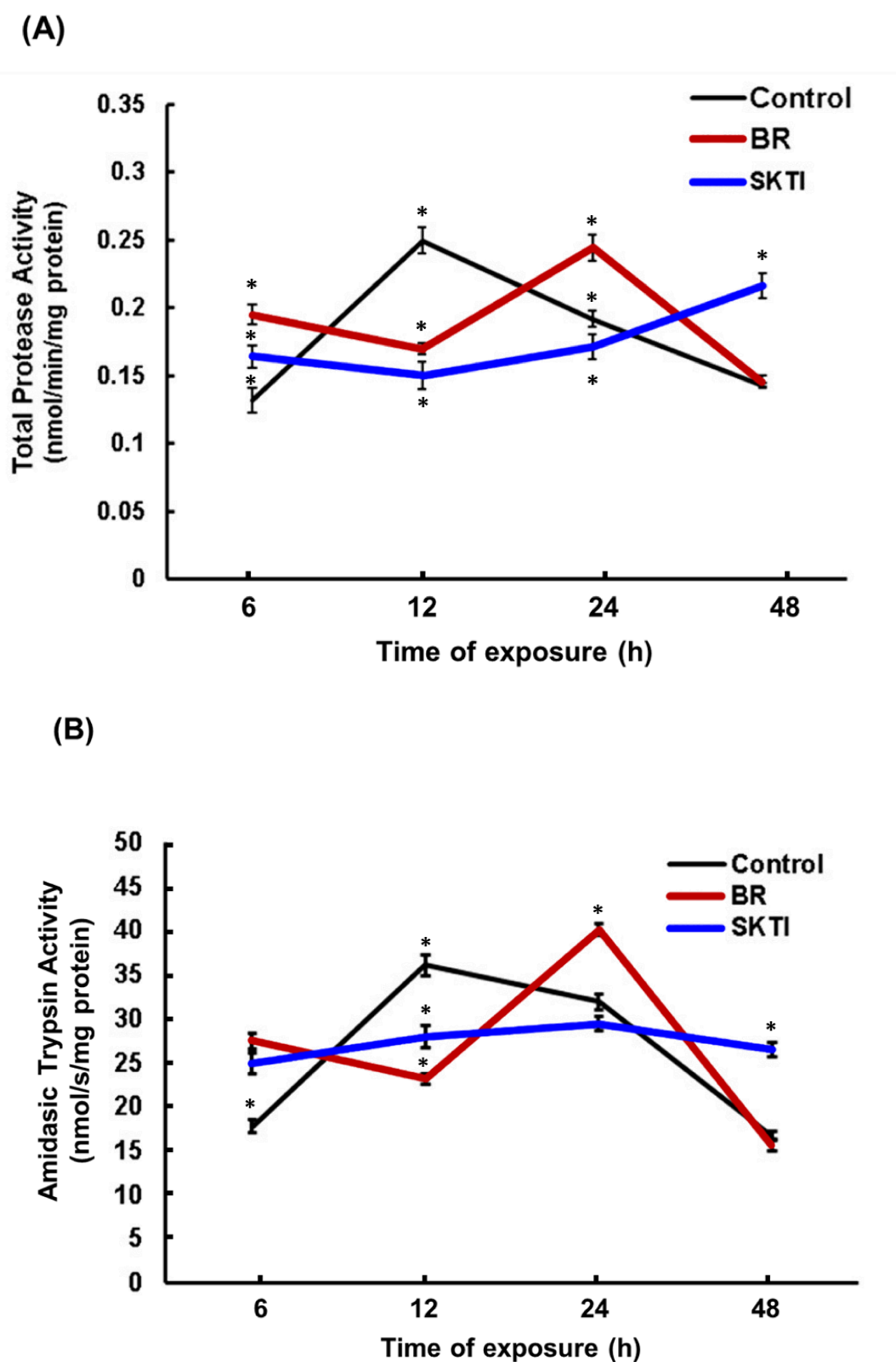


Figura 4. Efeito de Berenil (BR) e inibidor de tripsina Kunitz de soja (SKTI) nas atividades de protease no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*. (A) Atividade de protease total. (B) atividade amidásica de tripsina-like. O asterisco é indicativo de significância estatística ao comparar as médias das atividades de protease em cada tempo de exposição por ANOVA e teste de Tukey.

3.5. Análises histológicas do intestino médio de *A. gemmatalis*

As células do intestino médio da lagarta foram avaliadas para verificar alterações histopatológicas causadas por IPs nas dietas. No controle, o intestino médio permaneceu intacto com um epitélio de camada única com células digestivas e caliciformes, bem como alguns ninhos de células regenerativas (Fig. 5A).

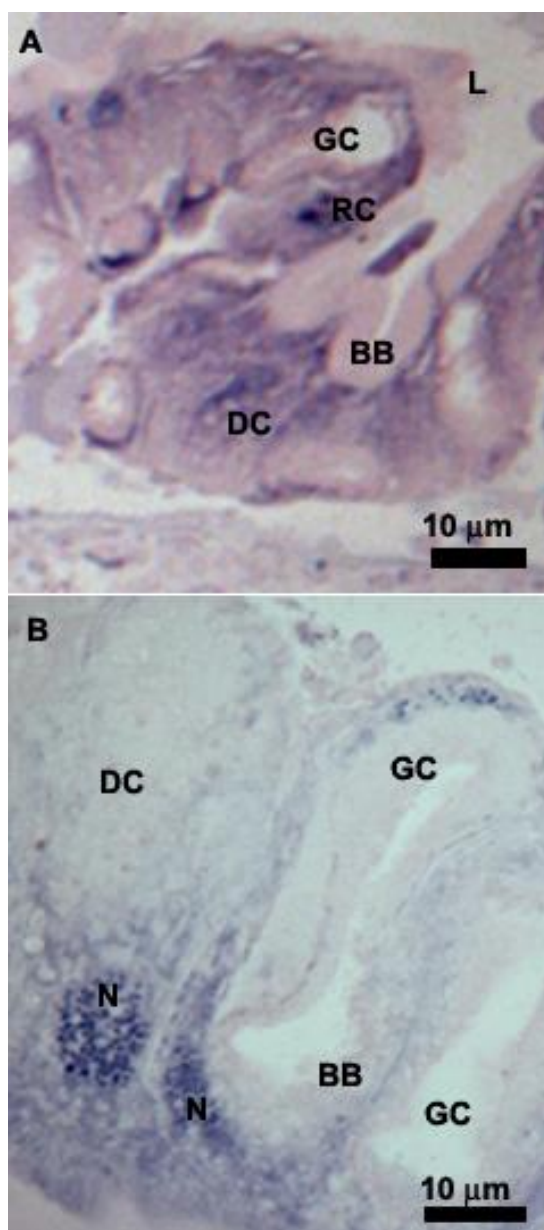


Figura 5. Micrografias de luz do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com dieta artificial. (A) Aspecto geral do epitélio mostrando células digestivas (DC) com borda em escova apical (BB) bem desenvolvida, células caliciformes (GC) e ninho de células regenerativas (RC). (B) Detalhes da célula digestiva (DC) com citoplasma homogêneo e núcleo bem desenvolvido (N), e células caliciformes (GC) com borda em escova da cavidade (BB) e núcleo basal (N). L – lúmen do intestino médio.

As células digestivas apresentavam citoplasma homogêneo, borda em escova apical evidente e núcleo bem desenvolvido com cromatina descondensada (Fig. 5B). As células caliciformes apresentavam uma grande cavidade com borda em escova (Fig. 5B).

As lagartas alimentadas com inibidores da protease SKTI e Berenil apresentaram algumas diferenças no epitélio do intestino médio em comparação com o controle. O intestino médio de *A. gemmatalis* exposto a SKTI por 6 h e Berenil por 12 h tiveram as células digestivas com vacuolização do citoplasma (Figs. 6A, 6B) e presença de células caliciformes com desorganização da borda em escova (Fig. 6C), características que foram mantidas até 24 h de exposição. As lagartas alimentadas com ambos os inibidores por 48 h apresentaram as células digestivas com saliências apicais (Fig. 6D) e liberação de fragmentos celulares, alguns com núcleo (Fig. 6D) para a luz do intestino médio.

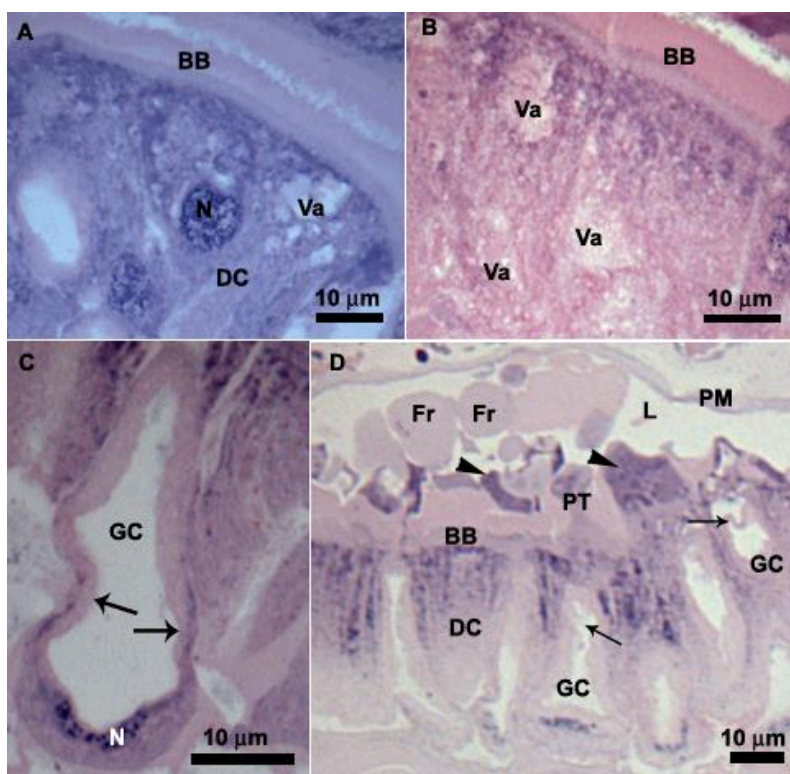


Figura 6. Micrografias de luz do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com Berenil e inibidores de protease do inibidor de tripsina Kunitz de soja (SKTI). (A) Lagarta alimentada com SKTI por 6 h mostrando célula digestiva (DC) com citoplasma vacuolizado (Va). (B) Células digestivas com vacúolos citoplasmáticos (Va) após 12 h de exposição ao Berenil. (C) Detalhe da célula caliciforme (GC) com borda em escova desorganizada (setas) após 48 h de exposição ao SKTI. (D) Detalhe do epitélio do intestino médio 48 h após exposição ao Berenil mostrando células caliciformes (GC) com borda em escova desorganizada (setas), células digestivas (CD) com borda em escova desorganizada (BB), protrusões apicais (PT) I, algumas com núcleo (pontas de seta) e fragmentos celulares (Fr) liberados para o lúmen (L). N – núcleo, PM – matriz peritrófica.

3.6. Docking proteína-ligante

Para sondar as interações entre as tripsinas de *A. gemmatalis* e o inibidor de Berenil, uma análise bioinformática foi realizada usando Pyrx para identificar potenciais locais de interação nas proteínas. Para cada encaixe, o software produziu os 10 principais modelos de encadernação. O melhor modelo para cada *docking* foi escolhido de acordo com os resultados da energia de afinidade (Kcal/mol) (Tabela 2).

A representação gráfica da posição de interação do Berenil na tripsina mostrou que os IP possuem dois sítios de interação na tripsina de *A. gemmatalis*, 62,5% das interações no sítio S2' (Fig. 7) e 37,5% ligando-se ao resíduo de aminoácido próximo ao local S1. As conformações adotadas pelo inibidor de Berenil em cada um dos complexos foram diferentes, pois interagiu com diferentes resíduos de aminoácidos na superfície das proteínas via ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Fig. 8).

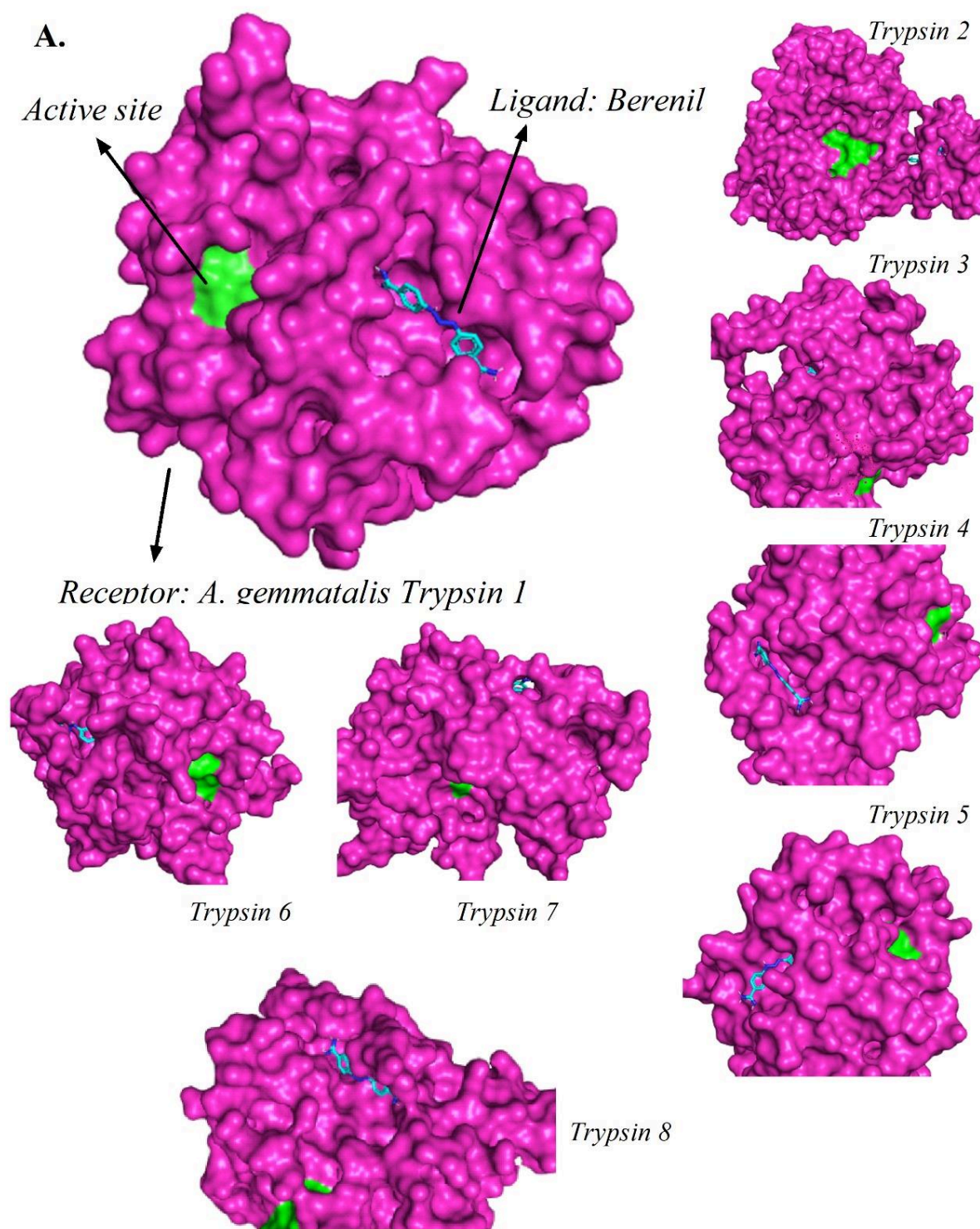


Figura 7. Visão geral da pose de encaixe mais bem classificada da ligação de Berenil com tripsinas digestivas de *Anticarsia gemmatalis* (Tripsina 1-8). Tripsina em magenta, sítio ativo em verde e Berenil em azul.

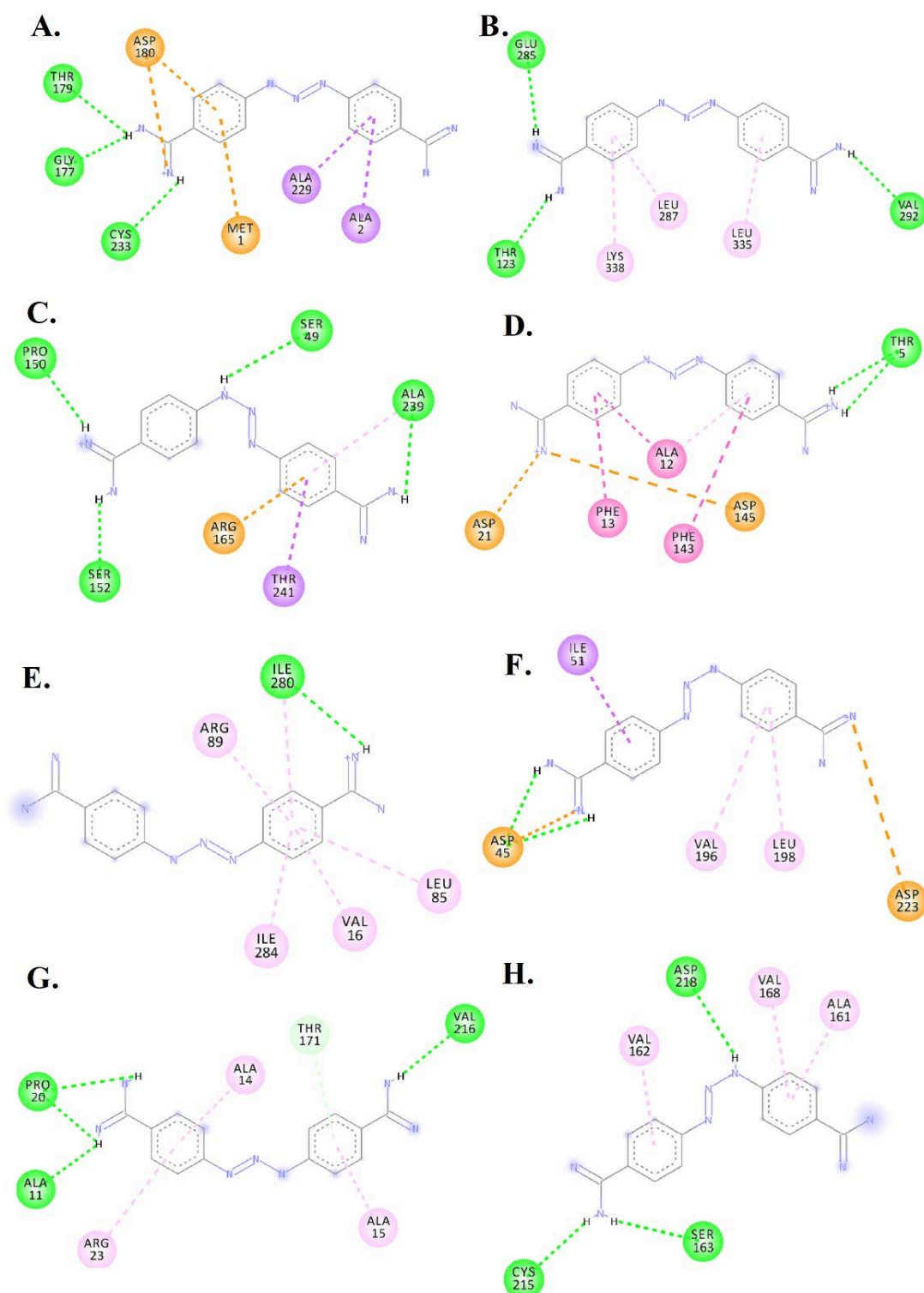


Figura 8. Perfil farmacofórico do complexo Berenil-tripsina após *docking* molecular. Círculos coloridos e linhas pontilhadas indicam o tipo de interação entre Berenil e aminoácidos da cadeia lateral de tripsinas. (A-H) Tripsina 1 em tripsina-8. Verde representa ligações de hidrogênio, carga atrativa laranja, interações Pi-sigma roxas, interações em forma de Pi-Pi rosa, ligação de hidrogênio do doador Pi azul.

Os aminoácidos na bolsa S2' e aqueles próximos à tríade catalítica estavam envolvidos na ligação com Berenil formando ligações de hidrogênio, pi-sigma, pi-alquil, pi-ânion, pi-cation, pi-doador e carga atrativa (Fig. 8).

Aminoácidos polares e não polares desconhecidos foram responsáveis pela interação tripsinas-berenil. Alguns aminoácidos polares desempenham um papel no complexo tripsina-berenil, aprox. 50% dos complexos mostraram Arg, Asp e Glu realizando ligações de hidrogênio e interações de carga atrativas com o ligante (Fig. 8).

4. DISCUSSÃO

A eficiência de defesa da planta a insetos por meio de IPs pode ser prejudicada pela adaptação do herbívoro. Essa associação coevolutiva entre o inseto fitófago e a planta hospedeira desenvolveu respostas fisiológicas no inseto que contornam os efeitos negativos causados pelos IPs presentes na dieta (DAWKAR et al., 2013; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Uma dessas respostas fisiológicas dos insetos aos IPs de plantas é a regulação diferencial de múltiplas proteases digestivas (LOMATE et al., 2018). Assim, nosso estudo mostra pela primeira vez uma análise abrangente sobre a resposta proteômica de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com os PIs Berenil e SKTI, sugerindo que variações na síntese e modificações pós-traducionais de proteínas específicas são responsáveis pela superação dos insetos aos IPs. Além disso, Berenil tem a inibição máxima de enzimas tripsina-like 2 h após a exposição, confirmada pela sua ligação no sítio S2' da tripsina através de ligações de hidrogênio e carga atrativa, e a formação de saliências apicais nas células do intestino médio que são liberadas para o lúmen intestinal revelado por microscopia de luz.

A ingestão de Berenil e SKTI por *A. gemmatalis* mostra que este inseto compensa a inibição de enzimas proteolíticas pela secreção tardia de outras proteases. Esse achado é evidenciado por um maior número de isoformas proteicas reguladas positivamente para protease e uma diminuição da atividade da protease após 12 h de exposição, apesar de não diferir do grupo controle após 48 h. A compensação pela inibição das atividades das enzimas endopeptidase pelo aumento das atividades das isoformas das exopeptidases foi relatada em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) (LOMATE et al., 2018), sugerindo que essas proteases digestivas são sintetizadas não apenas devido à ativação e repressão de genes, mas também devido a modificações pós-traducionais quando a lagarta é exposta a IPs na dieta (CHOUGULE et al., 2005; GRABHERR et al., 2011; PATANKAR et al., 2001; SARATE et al., 2012).

Moléculas pequenas, como inibidores sintéticos, têm várias vantagens em comparação com outros agentes químicos potenciais, incluindo estabilidade metabólica, biodistribuição, meia-vida, custo de fabricação, farmacocinética e permeabilidade (RAN et al., 2015; ZHAO et al., 2017). No entanto, não se pode descartar que pequenas moléculas possam ter algumas desvantagens quando as interações proteína-proteína são o alvo, devido à sua superfície limitada (RAN; GESTWICKI, 2018). No entanto, o efeito dessas moléculas na resposta através da expressão de proteases pode ser vantajoso para o manejo de pragas agrícolas, como demonstrado pelos resultados aqui obtidos. Quando o inseto é exposto a uma molécula inibitória pequena, como o Berenil, a expressão de proteases pode ser retardada, a reprogramação pode ser menos extensa, e a expressão de algumas proteínas é regulada positivamente. Esses resultados podem indicar que o efeito inibitório do Berenil comparado ao SKTI pode ser mais severo devido à resposta retardada ao nível de expressão de novas proteases que podem mitigar o efeito inibitório desta molécula. Além disso, a recuperação do inseto foi mais rápida quando desafiada com Berenil em comparação com SKTI, sugerindo que o inibidor natural de soja tem um efeito tardio na modulação da atividade de proteases totais. Esse resultado pode indicar que o SKTI é mais despercebido pelo sistema de defesa dos artrópodes, implicando em um efeito mais duradouro. A melhor resposta de *A. gemmatalis* à exposição do SKTI na dieta pode ser devido à estreita associação evolutiva com suas plantas hospedeiras (como as plantas de soja que produzem SKTI) resultando em respostas fisiológicas sofisticadas aos IPs dietéticos (RYAN, 1990; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Berenil tem uma ligação diazo entre dois anéis amino de benzamidina e se liga ao sítio ativo como um inibidor competitivo de tripsina. Há também uma ligação efetiva no sítio secundário da enzima, exibindo um comportamento parabólico parcialmente competitivo com o substrato (JUNQUEIRA; SILVA; MARES-GUIA, 1992). Devido a isso, Berenil é um inibidor severo de *A. gemmatalis*.

A nível cinético, os SKTI apresentam menor constante de inibição (K_i) em comparação com os inibidores sintéticos, o que lhes permite ocupar todos os sítios de ligação disponíveis no centro ativo da enzima e assim ocorre um ajuste otimizado no inibidor enzimático (EI) formação complexa. Os inibidores sintéticos, por serem menores, não ocupam todos os sítios disponíveis da enzima, formando complexo EI menos estável (MERIÑO-CABRERA et al., 2020a, 2020b; PATARROYO-VARGAS et al., 2020; VOLPICELLA et al., 2003). Neste estudo, descobrimos que a síntese proteica é acompanhada por mudanças no perfil enzimático do inseto. A capacidade hidrolítica da tripsina de *A. gemmatalis* diminui 53% após 48 h de exposição ao Berenil, que é maior em comparação com SKTI. Além disso, SKTI aumenta o número de proteases diferencialmente abundantes em um menor tempo de exposição,

mostrando que o aumento da produção de proteases não é suficiente para contornar os efeitos inibitórios de SKTI em um curto período. Achados semelhantes foram relatados para outros insetos expostos a inibidores de protease vegetal (COTABARREN et al., 2020; JONGSMA; BOLTER, 1997).

A reprogramação gênica é uma resposta esperada na tentativa do inseto de superar os efeitos negativos dos IPs e assim aumentar sua tolerância. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) responde de forma adaptativa aos efeitos de IPs vegetais regulando a expressão de genes que codificam para proteases (CHOUGULE et al., 2005; GRABHERR et al., 2011; PATANKAR et al., 2001; SARATE et al., 2012). Além de atuarem diretamente nas enzimas proteolíticas do intestino de *A. gemmatalis*, os IPs também acionam a sinalização celular para reprogramar genes relacionados ao estresse. Isso confirma que os inibidores de protease podem induzir não apenas mudanças na assimilação de nutrientes como proteínas, mas também podem induzir apoptose e estresse oxidativo em células do intestino médio de *A. gemmatalis*, como já foi demonstrado em outros insetos-praga (NAPOLEÃO et al., 2019).

Além disso, os IPs causam alterações na morfologia do intestino médio dos insetos. Em ambos os tratamentos contendo IP, as células digestivas do intestino médio apresentaram vacuolização do citoplasma (após 6 h em SKTI e 12 h em Berenil) que se mantém até 24 h, após a ocorrência de saliências apicais que são liberadas como fragmentos celulares para o lúmen intestinal. Além disso, a borda em escova das células caliciformes sofre grave desorganização. Essas características podem estar relacionadas ao número de proteínas relacionadas ao estresse expressas em *A. gemmatalis*, que tem sido associada à vacuolização do citoplasma como resposta ao estresse metabólico, uma vez que o intestino médio é um importante órgão de desintoxicação e defesa antioxidante (LUSHCHAK et al., 2018). Possivelmente, muitos desses vacúolos também são autofagossomos degradando organelas danificadas. A liberação de fragmentos celulares no lúmen tem sido associada à secreção apócrina, mas também a mecanismos de morte celular, pois alguns desses fragmentos contêm o núcleo celular (semelhante à apoptose em mamíferos) (SHUBIN et al., 2016). Características semelhantes de morte celular foram relatadas nas células do intestino médio de *A. gemmatalis* expostas a alguns pesticidas (ALMEIDA et al., 2014; FIAZ et al., 2018a,b; CASTRO et al., 2019a,b).

Análises de *docking* molecular e caracterizações das energias de ligação do inibidor Berenil às tripsinas de *A. gemmatalis* mostraram que a estabilização deste complexo é alcançada por 39% de ligações de hidrogênio e 61% de interações hidrofóbicas. No entanto, as contribuições para a mudança total na energia livre de Gibbs durante a ligação do Berenil

podem estar associadas a essas interações. Diferenças nas energias de afinidade entre a tripsina e o ligante podem ser explicadas pelas variações das ligações de hidrogênio em cada *docking*, como mostrado em outros estudos (PERILO et al., 2010). Essas diferenças podem ser explicadas pela variação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação, que são principalmente polares ou apolares não carregados nos sítios S2' e próximos a S1.

Em resumo, propomos que um inibidor de Berenil pode interagir com a tripsina através de ligações de hidrogênio permitindo ao ligante acessar um bolsão mais hidrofóbico e seu efeito inibitório sobre serino-proteases potencializado, conforme validado nas análises experimentais. Além disso, a integração de nossos resultados mostra que o uso de Berenil pode ser eficiente para o manejo de *A. gemmatalis*, uma vez que sua capacidade inibitória e danos morfológicos nas células do intestino médio é rápida possivelmente pelo atraso na expressão de proteases, menos extensa reprogramação de isoformas de proteínas e a menor expressão de proteínas reguladas para cima.

REFERÊNCIAS

AN, Chunju; BUDD, Aidan; KANOST, Michael R.; MICHEL, Kristin. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 1929–1939, 2011. DOI: 10.1007/s00018-010-0543-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0543-z>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-020-00792-9>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CASTRO, Bárbara Monteiro de Castro e.; MARTINEZ, Luis Carlos; BARBOSA, Sergio Guedes; SERRÃO, José Eduardo; WILCKEN, Carlos Frederico; SOARES, Marcus Alvarenga; DA SILVA, Antonio Alberto; DE CARVALHO, Amélia Guimarães; ZANUNCIO, José Cola. Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. a. DOI: 10.1038/s41598-019-43074-0. Disponível em: www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 26 abr. 2021.

CASTRO, Bárbara Monteiro de Castro e.; MARTÍNEZ, Luis Carlos; PLATA-RUEDA, Angelica; SOARES, Marcus Alvarenga; TAVARES, Wagner de Souza; SERRÃO, José Eduardo; ZANUNCIO, José Cola. Chlorantraniliprole degenerates microvilli goblet cells of the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Chemosphere**, [S. l.], v. 229, p. 525–528, 2019. b. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.041.

CHOUGULE, Nanasahab P.; DOYLE, Emily; FITCHES, Elaine; GATEHOUSE, John A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 563–572, 2008. DOI:

10.1016/j.jinsphys.2007.12.005. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18241882>. Acesso em: 31 mar. 2021.

CHOUGULE, Nanasaheb P.; GIRI, Ashok P.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 355–367, 2005. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.01.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805000226>. Acesso em: 31 mar. 2021.

COTABARREN, Juliana; LUFRANO, Daniela; PARISI, Mónica Graciela; OBREGÓN, Walter David. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, [S. l.], v. 292, p. 110398, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945219315717>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; DE OLIVEIRA, Eugênio E.; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21631, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21631>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DALLAKYAN, Sargis; OLSON, Arthur J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1263, p. 243–250, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2269-7_19. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2269-7_19. Acesso em: 31 mar. 2021.

DAWKAR, Vishal V.; CHIKATE, Yojana R.; LOMATE, Purushottam R.; DHOLAKIA, Bhushan B.; GUPTA, Vidya S.; GIRI, Ashok P. Molecular insights into resistance mechanisms of lepidopteran insect pests against toxicants. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 4727–4737, 2013. DOI: 10.1021/pr400642p. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr400642p>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DE ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; DA

SILVA JÚNIOR, Neilier R.; DE OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V.; RAMOS, Humberto J. O.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6191>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DE ALMEIDA, G. D.; ZANUNCIO, J. C.; SENTHIL-NATHAN, S.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; AZEVEDO, D. O.; SERRÃO, José Eduardo. **Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract** *Invertebrate Survival Journal*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/309>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398616190145X>. Acesso em: 25 mar. 2021.

FIAZ, Muhammad; MARTÍNEZ, Luis Carlos; COSTA, Marilza da Silva; COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva; PLATA-RUEDA, Angelica; GONÇALVES, Wagner Gonzaga; SANT’ANA, Antônio Euzébio Goulart; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 156, n. March, p. 1–8, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.080. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.080>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FIAZ, Muhammad; MARTÍNEZ, Luis Carlos; PLATA-RUEDA, Angelica; GONÇALVES, Wagner Gonzaga; SHAREEF, Muhammad; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Chemosphere**, [S. l.], v. 212, p. 337–345, 2018. b. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.088.

GRABHERR, Manfred G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011. DOI: 10.1038/nbt.1883. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.1883>. Acesso em: 31

mar. 2021.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/69/4/487/2212175>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HEMMATI, Seyed A.; SAJEDI, Reza H.; MOHARRAMIPOUR, Saeid; TAGHDIR, Majid; RAHMANI, Hossein; ETEZAD, Seyed M.; MEHRABADI, Mohammad. Biochemical characterization and structural analysis of trypsin from *Plodia interpunctella* midgut: implication of determinants in extremely alkaline pH activity profile. **Physiological Entomology**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 307–318, 2017. DOI: 10.1111/phen.12196. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/phen.12196>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HEMMATI, Seyed Ali; MEHRABADI, Mohammad. Structural ensemble-based computational analysis of trypsin enzyme genes discovered highly conserved peptide motifs in insects. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, [S. l.], v. 53, n. 7–8, p. 335–354, 2020. DOI: 10.1080/03235408.2020.1744978. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03235408.2020.1744978>. Acesso em: 31 mar. 2021.

JONGSMA, Maarten A.; BOLTER, Caroline. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 885–895, 1997. DOI: 10.1016/S0022-1910(97)00040-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191097000401>. Acesso em: 31 mar. 2021.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 873–887, 1992. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1342833>. Acesso em: 24 ago. 2021.

KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053. Disponível em: <http://predictioncenter.org/index.cgi>. Acesso em: 27 maio. 2021.

KING, Allison M.; MACRAE, Thomas H. Insect heat shock proteins during stress and

diapause. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 59–75, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162107. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011613-162107>. Acesso em: 31 mar. 2021.

KRINSKI, Diones; FOERSTER, Luís Amilton; DESCHAMPS, Cicero. Efeito ovicida de óleos essenciais de 18 espécies Brasileiras de piper: Controlando *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebididae) no estágio inicial de desenvolvimento. **Acta Scientiarum - Agronomy**, [S. l.], v. 40, n. 1, 2018. DOI: 10.4025/actasciagron.v40i1.35273. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/asagr/a/qwJkqBVb6LYLGT8bRxGrYpx/?lang=en&format=html>. Acesso em: 28 maio. 2022.

LI, Bing; YU, Hai Zhong; YE, Chong Jun; MA, Yan; LI, Xing; FAN, Tao; CHEN, Fu Sheng; XU, Jia Ping. Bombyx mori Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. **Gene**, [S. l.], v. 610, p. 64–70, 2017. DOI: 10.1016/j.gene.2017.02.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111917300914>. Acesso em: 19 abr. 2021.

LIMA, Ana T.; BASTOS, Felipe A.; TEUBNER, Fernando Jakes; NETO, Renato R.; COOPER, Andrew; BARROSO, Gilberto F. Strengths and Weaknesses of a Hybrid Post-disaster Management Approach: the Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. **Environmental Management**, Department of Biochemistry, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel. DOI - 10.1093/nar/gki370 SRC - Pubmed ID2 - 15980475 FG - 0, v. 65, n. 6, p. 711–724, 2020. DOI: 10.1007/s00267-020-01279-4. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008000700003&lng=en&tlng=en. Acesso em: 31 mar. 2021.

LOMATE, Purushottam R.; DEWANGAN, Veena; MAHAJAN, Neha S.; KUMAR, Yashwant; KULKARNI, Abhijeet; WANG, Li; SAXENA, Smita; GUPTA, Vidya S.; GIRI, Ashok P. Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *helicoverpa armigera*. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 1324–1336, 2018. DOI: 10.1074/mcp.RA117.000533. Disponível em: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.RA117.000533>. Acesso em: 31 mar. 2021.

LUSHCHAK, Volodymyr I.; MATVIISHYN, Tetiana M.; HUSAK, Viktor V.; STOREY, Janet

M.; STOREY, Kenneth B. **Pesticide toxicity: A mechanistic approach** *EXCLI Journal* Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, , 2018. DOI: 10.17179/excli2018-1710. Disponível em: /pmc/articles/PMC6295629/. Acesso em: 31 mar. 2021.

MARES-GUIA, Marcos; SHAW, Elliott. Studies on the Active Center of Trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 240, n. 4, p. 1579–1585, 1965. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)97474-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818974740>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; LOURENÇÃO, A. L.; GUEDES, R. N. C.; PALLINI, A.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Enzymatic Response of the Eucalypt Defoliator *Thyrntina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) to a Bis-Benzamidine Proteinase Inhibitor. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 420–425, 2012. DOI: 10.1007/s13744-012-0063-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-012-0063-7>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MEEKINS, David A.; KANOST, Michael R.; MICHEL, Kristin. **Serpins in arthropod biology** *Seminars in Cell and Developmental Biology* Academic Press, , 2017. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.09.001.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago A.; CASTRO, José G. S.; BARBOSA, Samuel L.; MACEDO, Maria L. R.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatilis* trypsins by *Adenanthera pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. e21687, 2020. a. DOI: 10.1002/arch.21687. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21687>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Ligia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 122, p. 103390, 2020. b. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.

MONTELLA, Isabela Reis; SCHAMA, Renata; VALLE, Denise. **The classification of**

esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Fundação Oswaldo Cruz, , 2012. DOI: 10.1590/S0074-02762012000400001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 31 mar. 2021.

NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly D. L.; NOVA, Isabella C. V.; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia M. G.; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.5233>. Acesso em: 31 mar. 2021.

OCHOA-CAMPUZANO, Camila; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, Amparo C.; CONTRERAS, Estefanía; RAUSELL, Carolina; REAL, M. Dolores. Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. 299–308, 2013. DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.09.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357513001491>. Acesso em: 31 mar. 2021.

OGAWA, Ken Ichi; TOJO, Sumio. Quantitative Changes of Storage Proteins and Vitellogenin during the Pupal-Adult Development in the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Applied Entomology and Zoology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 288–296, 1981. DOI: 10.1303/aez.16.288. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/aez1966/16/3/16_3_288/_article. Acesso em: 31 mar. 2021.

OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495904003598>. Acesso em: 27 maio. 2021.

OLIVEIRA, M. G. D. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and

kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo- β -trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)74195-7.

PATANKAR, Aparna G.; GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; SAINANI, Mohini N.; DESHPANDE, Vasanti V.; RANJEKAR, Prabhakar K.; GUPTA, Vidya S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 4–5, p. 453–464, 2001. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00150-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174800001508>. Acesso em: 31 mar. 2021.

PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; CORDEIRO, Gláucia; DA SILVA, Carolina R.; DA SILVA, Camila R.; MENDONÇA, Eduardo G.; VISÔTTO, Liliane E.; ZANUNCIO, José C.; CAMPOS, Wellington G.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 92, n. suppl 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477. Disponível em: www.scielo.br/aabc%7Cwww.fb.com/aabcjournalAnAcadBrasCienc. Acesso em: 31 mar. 2021.

PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine- Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.

PERILO, Cecília Steinberg; PEREIRA, Márcio Tadeu; SANTORO, Marcelo Matos; NAGEM, Ronaldo Alves Pinto. Structural binding evidence of the trypanocidal drugs Berenil® and Pentacarinat® active principles to a serine protease model. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 502–511, 2010. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.03.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813010000875>. Acesso em: 31 mar. 2021.

PRESNELL, Steven R.; PATIL, Girish S.; MURA, Cameron; JUDE, Kevin M.; CONLEY, Jennifer M.; BERTRAND, Jay A.; KAM, Chih Min; POWERS, James C.; WILLIAMS, Loren Dean. Oxyanion-mediated inhibition of serine proteases. **Biochemistry**, [S. l.], v. 37, n. 48, p. 17068–17081, 1998. DOI: 10.1021/bi981636u. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi981636u>. Acesso em: 31 mar. 2021.

RAN, Xu et al. Structure-Based Design of γ -Carboline Analogues as Potent and Specific BET Bromodomain Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 4927–4939, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00613. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00613>. Acesso em: 31 mar. 2021.

RAN, Xu; GESTWICKI, Jason E. **Inhibitors of protein–protein interactions (PPIs): an analysis of scaffold choices and buried surface area** *Current Opinion in Chemical Biology* Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.06.004.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990. DOI: 10.1146/annurev.py.28.090190.002233. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SARATE, P. J.; TAMHANE, V. A.; KOTKAR, H. M.; RATNAKARAN, N.; SUSAN, N.; GUPTA, V. S.; GIRI, A. P. Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, [S. l.], v. 12, n. 42, p. 1–16, 2012. DOI: 10.1673/031.012.4201. Disponível em: <https://academic.oup.com/jinsectscience/article-lookup/doi/10.1673/031.012.4201>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SHUBIN, Andrey V.; DEMIDYUK, Ilya V.; KOMISSAROV, Alexey A.; RAFIEVA, Lola M.; KOSTROV, Sergey V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 34, p. 55863–55889, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.10150. Disponível em: </pmc/articles/PMC5342458/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

STEFANINI, Mario; MARTINO, Cesare De; ZAMBONI, Luciano. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. . 1967, 5111, p. 173–174.

TELANG, A.; BUCK, N. A.; WHEELER, D. E. Response of storage protein levels to variation in dietary protein levels. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 48, n. 11, p. 1021–1029, 2002. DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00190-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191002001907>. Acesso em: 31 mar. 2021.

VOLPICELLA, Mariateresa; CECI, Luigi R.; CORDEWENER, Jan; AMERICA, Twan; GALLERANI, Raffaele; BODE, Wolfram; JONGSMA, Maarten A.; BEEKWILDER, Jules. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 270, n. 1, p. 10–19, 2003. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03368.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1033.2003.03368.x>. Acesso em: 31 mar. 2021.

WALKER, David R.; ALL, John N.; MCPHERSON, Robert M.; BOERMA, H. Roger; PARROTT, Wayne A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noetuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia, Athens 30602-7272, USA. DOI - 10.1603/0022-0493-93.3.613 SRC - Pubmed ID2 - 10902306 FG - 0, v. 93, n. 3, p. 613–622, 2000. DOI: 10.1603/0022-0493-93.3.613. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/0022-0493-93.3.613>. Acesso em: 31 mar. 2021.

XAVIER, Luciana Pereira; OLIVEIRA, Maria Goreti Almeida; GUEDES, Raul Narciso Carvalho; SANTOS, Agenor Valadares; DE SIMONE, Salvatore Giovanni. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 147–153, 2005. DOI: 10.14411/eje.2005.023. Disponível em: <http://www.eje.cz/doi/10.14411/eje.2005.023.html>. Acesso em: 19 abr. 2021.

ZHAO, Yujun et al. Structure-Based Discovery of 4-(6-Methoxy-2-methyl-4-(quinolin-4-yl)-9H-pyrimido[4,5-b]indol-7-yl)-3,5-dimethylisoxazole (CD161) as a Potent and Orally Bioavailable BET Bromodomain Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 9, p. 3887–3901, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00193. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b00193>. Acesso em: 31 mar. 2021.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-010814-020816>. Acesso em: 31 mar. 2021.

TABELAS

Tabela 1: Isoformas de protease diferencialmente expressas no intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com inibidores de protease Berenil (BR) e inibidores de tripsina Kunitz de soja (SKTI) em comparação com lagartas alimentadas com dieta controle sem inibidores

INHIBITOR	PROTEASE TYPE	<i>Bombyx</i> ID	PROTEIN NAME	Down Early	Down Late	UP Early	UP Late
BR	serine-type peptidase	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	5	NA	1
SKTI	serine-type peptidase	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	4	1	3
BR	serine-type peptidase	H9J230	Peptidase S1 domain	1	1	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9J230	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	serine-type peptidase	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	1	2	NA	1
SKTI	serine-type peptidase	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	2	2	NA	2
BR	serine-type peptidase	H9J243	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9J243	Peptidase S1 domain	1	2	NA	4
BR	serine-type peptidase	H9J4K5	Peptidase S1 domain	1	1	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9J4K5	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	serine-type peptidase	H9JAI9	chymotrypsin-2 isoform X1	1	NA	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9JAI9	chymotrypsin-2 isoform X1	NA	1	NA	NA
BR	serine-type peptidase	H9JG67	Peptidase S1	NA	NA	1	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9JG67	Peptidase S1	NA	NA	NA	1
BR	serine-type peptidase	H9JJA9	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9JJA9	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	serine-type peptidase	H9JL75	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	serine-type peptidase	H9JL75	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	1
BR	serine-type peptidase	H9JM38	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	3
SKTI	serine-type peptidase	H9JM38	Peptidase S1 domain	2	3	NA	3
BR	serine-type peptidase	O01953	Serine protease	1	1	NA	1
SKTI	serine-type peptidase	O01953	Serine protease	1	NA	NA	2
BR	serine-type peptidase	H9J268	Peptidase S1 domain	NA	2	NA	NA
BR	serine-type peptidase	H9J0V4	alpha-aspartyl dipeptidase X1	NA	1	NA	NA
BR	metallocarboxy	H9JIY6	Peptidase_M14 domain	3	1	NA	2
SKTI	metallocarboxy	H9JIY6	Peptidase_M14 domain	1	1	1	4
BR	metallocarboxy	H9JUR3	Peptidase_M14 domain	1	1	NA	1
SKTI	metallocarboxy	H9JUR3	Peptidase_M14 domain	1	1	NA	1
BR	Proteasome	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	NA
SKTI	Proteasome	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	1
BR	Proteasome	H9JWI4	Proteasome endopeptidase	1	1	NA	NA
SKTI	Proteasome	H9JWI4	Proteasome endopeptidase	1	1	NA	NA
BR	Proteasome	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha	1	NA	NA	NA
SKTI	Proteasome	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha	1	NA	NA	NA
BR	Proteasome	H9JI85	Proteasome subunit alpha	NA	NA	1	1
SKTI	Mitochondrial peptidase	H9IZ97	Mitochondrial peptidase beta	1	NA	NA	1
TOTAL				34	31	4	34

Tabela 2. Valores de energia de afinidade determinados por *docking* molecular de oito tripsinas de *Anticarsia gemmatalis* e o ligante inibitório Bis-benzamidina (Berenil) usando o software PyRx. Os valores correspondem ao melhor modelo para cada encaixe

Complexes (Trypsin-Berenil)	Affinity energy (Kcal/mol)
Trypsin1-Berenil	-7.9
Trypsin2-Berenil	-7.6
Trypsin3-Berenil	-7.4
Trypsin4-Berenil	-8.1
Trypsin5-Berenil	-7.6
Trypsin6-Berenil	-7.9
Trypsin7-Berenil	-7.4
Trypsin8-Berenil	-7.3

Tabela S1: Isoformas proteicas diferencialmente expressas do intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas ou não com inibidores de protease Berenil (BR) e inibidores de tripsina Kunitz de soja (SKTI). As isoformas proteicas dos perfis 2DE foram classificadas como “precoce” quando a mancha foi detectada como diferencialmente abundante antes de 12 horas de exposição e como “tardia” após 12 horas

PI	Molecular process	<i>Bombyx</i> ID	Protein name	BR Down Early	BR Down Late	BR UP Early	BR UP Late
BR	Actin binding	H9ISA2	ADF-H domain-containing protein	1	NA	NA	3
SKTI	Actin binding	H9ISA2	ADF-H domain-containing protein	NA	NA	NA	1
BR	Actin binding	H9JLR9	Uncharacterized protein	NA	1	NA	NA
SKTI	Actin binding	H9JLR9	Uncharacterized protein	NA	1	NA	NA
BR	Actin binding	H9JLZ2	Transgelin	NA	NA	NA	2
SKTI	Actin binding	H9JLZ2	Transgelin	NA	NA	NA	1
BR	Actin binding	H9JWN1	Actin muscle-type A1	NA	4	3	4
SKTI	Actin binding	H9JWN1	Actin muscle-type A1	1	4	NA	2
BR	Amino acid metabolism	H9IT07	Glutamine synthetase	NA	NA	NA	1
SKTI	Amino acid metabolism	H9IT07	Glutamine synthetase	NA	NA	1	2
BR	Amino acid metabolism	H9J1D2	Aspartate aminotransferase	NA	1	NA	1
BR	Amino acid metabolism	H9J441	Glutamine synthetase	NA	NA	NA	4
SKTI	Amino acid metabolism	H9J441	Glutamine synthetase	2	1	NA	3
BR	Cell cycle	H9JHM2	Inhibitor of growth protein	1	NA	NA	NA
SKTI	Cell cycle	H9JHM2	Inhibitor of growth protein	1	2	NA	NA
BR	Cell morphogenesis	H9JLN6	C-CAP/cofactor C-like domain-containing protein	1	NA	NA	1
SKTI	Cell morphogenesis	H9JLN6	C-CAP/cofactor C-like domain-containing protein	1	1	NA	1
BR	Dna binding	H9J0W4	DNA topoisomerase I	NA	NA	NA	1
SKTI	Dna binding	H9J0W4	DNA topoisomerase I	NA	NA	NA	1
BR	Dna binding	H9JGS2	TPR_REGION domain-containing protein	1	1	NA	NA
SKTI	Dna binding	H9JGS2	TPR_REGION domain-containing protein	1	1	NA	NA
SKTI	Dna binding	H9JMB5	Barrier-to-autointegration factor	NA	NA	NA	1
BR	Electron transfer activity	Q2F6A1	Electron-transfer-flavoprotein beta polypeptide	NA	NA	NA	1

SKTI	Electron transfer activity	Q2F6A1	Electron-transfer-flavoprotein beta polypeptide	NA	NA	NA	1
SKTI	Electron transfer activity	-	electron transfer flavoprotein mitochondrial	NA	NA	NA	1
BR	Energy coupled proton	B3VBE3	Vacuolar ATPase B subunit	NA	4	2	NA
SKTI	Energy coupled proton	B3VBE3	Vacuolar ATPase B subunit	NA	3	NA	NA
SKTI	Energy coupled proton	H9IYU7	V-type proton ATPase subunit a	1	NA	NA	NA
BR	Energy coupled proton	H9J535	chloride channel protein 2 isoform	NA	NA	1	NA
SKTI	Energy coupled proton	H9J535	chloride channel protein 2 isoform	NA	NA	1	1
BR	Energy coupled proton	H9JFJ8	V-ATPase subunit A	NA	1	NA	NA
BR	Energy coupled proton	H9JHF8	voltage-dependent anion-selective channel isoform X2	1	1	NA	1
SKTI	Energy coupled proton	H9JHF8	voltage-dependent anion-selective channel isoform X1	1	1	1	1
BR	Energy coupled proton	H9JSP4	ATP synthase subunit beta	NA	NA	NA	1
SKTI	Energy coupled proton	H9JSP4	ATP synthase subunit beta	NA	NA	1	NA
BR	Energy coupled proton	Q1HPP3	ATP synthase subunit d, mitochondrial	NA	1	NA	NA
SKTI	Energy coupled proton	Q1HPP3	ATP synthase subunit d, mitochondrial	NA	NA	1	1
BR	Energy coupled proton	Q1HPT0	ATP synthase subunit beta	NA	1	NA	NA
SKTI	Energy coupled proton	Q1HPT0	ATP synthase subunit beta	NA	NA	NA	1
BR	Energy coupled proton	Q1HQ34	H+ transporting ATP synthase delta subunit	2	NA	NA	NA
SKTI	Energy coupled proton	Q1HQ34	H+ transporting ATP synthase delta subunit	2	2	NA	NA
SKTI	Energy coupled proton	Q2F5T3	ATP synthase subunit alpha	NA	NA	NA	2
BR	Energy metabolism	H9J8H0	Arginine kinase	1	NA	2	3
SKTI	Energy metabolism	H9J8H0	Arginine kinase	NA	NA	2	4
SKTI	Gtp binding	Q2F6C7	ADP-ribosylation factor	1	NA	NA	NA
SKTI	Heat shock activity	H9IVD8	Heat shock cognate 70 protein	1	2	NA	NA
BR	Heat shock activity	H9JCV2	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	NA	NA	NA	1
SKTI	Heat shock activity	H9JCV2	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	NA	NA	1	5
BR	Heat shock activity	HSP83	Heat shock protein 83	1	1	NA	NA
SKTI	Heat shock activity	HSP83	Heat shock protein 83	1	NA	NA	3

BR	Heat shock activity	Q8N0P2	Heat shock cognate protein; Heat shock protein 70	NA	1	1	5
SKTI	Heat shock activity	Q8N0P2	Heat shock cognate protein; Heat shock protein 70	2	1	2	7
BR	Hydrolase activity	E5LAN2	Phosphotriesterase-like protein	NA	NA	1	NA
SKTI	Hydrolase activity	E5LAN2	Phosphotriesterase-like protein	NA	NA	NA	1
BR	Hydrolase activity	H9ITR8	Chitinase-like protein EN03	NA	1	NA	NA
SKTI	Hydrolase activity	H9ITR8	Chitinase-like protein EN03	NA	NA	1	1
BR	Hydrolase activity	H9IUA7	Carboxylic ester hydrolase	NA	NA	NA	1
SKTI	Hydrolase activity	H9IUA7	Carboxylic ester hydrolase	NA	NA	1	2
SKTI	Hydrolase activity	H9IV93	Endonuclease	1	1	NA	NA
SKTI	Hydrolase activity	H9J991	AB hydrolase-1 protein	NA	NA	NA	1
BR	Hydrolase activity	H9J9S1	AB hydrolase-1 protein	NA	NA	1	1
BR	Hydrolase activity	H9JCA8	Glycosyl hydrolase family 31 protein	NA	2	NA	NA
SKTI	Hydrolase activity	H9JCA8	Glycosyl hydrolase family 31 protein	1	2	NA	NA
BR	Hydrolase activity	H9JNW4	Carboxylesterase	NA	1	NA	NA
SKTI	Hydrolase activity	H9JPZ1	4-nitrophenylphosphatase	1	2	NA	NA
BR	Lipid binging	H9J0J5	CRAL-TRIO domain-containing protein	1	2	NA	1
SKTI	Lipid binging	H9J0J5	CRAL-TRIO domain-containing protein	1	2	NA	1
BR	Lipid metabolism	Q2F686	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	NA	NA	NA	1
SKTI	Lipid metabolism	Q2F686	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	NA	NA	NA	1
BR	Lipid methabolism	H9J4Z5	Vitellogenin (VIT)	1	NA	NA	1
SKTI	Lipid methabolism	H9J4Z5	Vitellogenin (VIT)	1	NA	NA	2
BR	Lipid methabolism	H9J814	Mitochondrial enoyl-CoA hydratase 3	2	NA	NA	1
SKTI	Lipid methabolism	H9J814	Mitochondrial enoyl-CoA hydratase 3	1	NA	NA	2
BR	Lipid methabolism	H9JCW3	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	NA	NA	1	NA
SKTI	Lipid methabolism	H9JCW3	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	NA	NA	NA	1
BR	Lipid methabolism	H9JTT0	FABP domain-containing protein	1	NA	NA	1
SKTI	Lipid methabolism	H9JTT0	FABP domain-containing protein	1	NA	NA	NA
BR	Lipid methabolism	Q2F5R6	FABP domain-containing protein	NA	2	NA	NA

BR	Lipid methabolism	Q2F5T3	ATP synthase subunit alpha	NA	NA	NA	1
BR	Metabolic process	H9ITA1	Sulfhydryl oxidase	NA	NA	NA	1
BR	Metabolic process	H9ITU2	Citrate synthase	1	2	2	NA
SKTI	Metabolic process	H9ITU2	Citrate synthase	NA	2	1	1
BR	Metabolic process	H9IU89	Flavin reductase	1	NA	NA	NA
SKTI	Metabolic process	H9IZR5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	NA	NA	NA	1
BR	Metabolic process	H9JDT4	Phosphoglycerate kinase	1	1	NA	NA
BR	Metabolic process	H9JDV4	Nucleoside diphosphate kinase	NA	NA	1	NA
SKTI	Metabolic process	H9JDV4	Nucleoside diphosphate kinase	NA	NA	1	1
BR	Metabolic process	H9JEU5	Carbonic anhydrase 2	2	1	NA	1
SKTI	Metabolic process	H9JEU5	Carbonic anhydrase 2	1	NA	NA	4
BR	Metabolic process	H9JN02	NAD(P)H-hydrate epimerase	NA	2	NA	NA
BR	Metabolic process	H9JP54	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	NA	NA	3	2
SKTI	Metabolic process	H9JP54	Acyl-coenzyme A dehydrogenase	NA	NA	3	4
BR	Metabolic process	H9JUN1	Phosphoglycerate mutase	NA	NA	NA	1
SKTI	Metabolic process	H9JUN1	Phosphoglycerate mutase	NA	NA	1	NA
SKTI	Metabolic process	Q1HPN7	Fructose-bisphosphate aldolase	2	2	NA	3
BR	Metabolic process	Q1EPM0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NA	NA	1	1
BR	Metal binding	B6ZIV8	Globin	NA	NA	NA	1
SKTI	Metal binding	B6ZIV8	Globin	NA	NA	NA	1
SKTI	Metal binding	H9JPZ9	zinc finger CCCH domain-containing protein 15 homolog	NA	NA	NA	1
BR	Metal binding	H9JR59	selenium-binding protein 1 isoform X1	1	NA	NA	1
SKTI	Metal binding	H9JR59	selenium-binding protein 1 isoform X1	1	NA	1	NA
SKTI	Nutrient storage	H9JGX1	Ferritin	NA	NA	NA	1
BR	Nutrient storage	H9JH62	Basic juvenile hormone-suppressible protein 2	1	1	NA	NA
SKTI	Nutrient storage	H9JH62	Basic juvenile hormone-suppressible protein 2	1	NA	NA	1
BR	Nutrient storage	H9JHM9	Silkworm storage protein	1	3	5	10

SKTI	Nutrient storage	H9JHM9	Silkworm storage protein	2	5	2	9
SKTI	Nutrient storage	H9JP12	Sex-specific storage-protein 1	NA	2	NA	NA
SKTI	Nutrient storage	Q1HPP4	Arylphorin	NA	NA	1	1
BR	Protease activity	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	5	NA	1
SKTI	Protease activity	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	4	1	3
SKTI	Protease activity regulation	H9IYN7	activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	NA	NA	NA	1
SKTI	Protease activity	H9IZ97	Mitochondrial processing peptidase beta	1	NA	NA	1
BR	Protease activity	H9J0V4	probable alpha-aspartyl dipeptidase isoform X1	NA	1	NA	NA
BR	Protease activity	H9J230	Peptidase S1 domain-containing protein	1	1	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9J230	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA
BR	Protease activity	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	1	2	NA	1
SKTI	Protease activity	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	2	2	NA	2
BR	Protease activity	H9J243	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9J243	Peptidase S1 domain-containing protein	1	2	NA	4
BR	Protease activity	H9J268	Peptidase S1 domain-containing protein	NA	2	NA	NA
BR	Protease activity	H9J4K5	Peptidase S1 domain-containing protein	1	1	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9J4K5	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA
BR	Protease activity	H9JAI9	Serine protease 2	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9JAI9	Serine protease 2	NA	1	NA	NA
SKTI	Catalytic regulation	H9JC16	Pept_C1 domain-containing protein	NA	NA	NA	1
BR	Protease activity	H9JG67	Peptidase S1 protein	NA	NA	1	NA
SKTI	Protease activity	H9JG67	Peptidase S1 domain-containing protein	NA	NA	NA	1
BR	Protease activity	H9JI85	Proteasome subunit alpha type	NA	NA	1	1
BR	Protease activity	H9JIY6	Carboxypeptidase B	3	1	NA	2
SKTI	Protease activity	H9JIY6	Peptidase_M14 domain-containing protein	1	1	1	4
BR	Protease activity	H9JJA9	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9JJA9	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA

BR	Protease activity	H9JL75	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9JL75	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	1
BR	Protease activity	H9JM38	Peptidase S1 domain-containing protein	1	NA	NA	3
SKTI	Protease activity	H9JM38	Peptidase S1 domain-containing protein	2	3	NA	3
BR	Protease activity	H9JUR3	Peptidase_M14 domain-containing protein	1	1	NA	1
SKTI	Protease activity	H9JUR3	Peptidase_M14 domain-containing protein	1	1	NA	1
BR	Protease activity	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	1
BR	Protease activity	H9JWI4	Proteasome endopeptidase complex	1	1	NA	NA
SKTI	Protease activity	H9JWI4	Proteasome endopeptidase complex	1	1	NA	NA
BR	Protease activity	O01953	Serine protease	1	1	NA	1
SKTI	Protease activity	O01953	Serine protease	1	NA	NA	2
BR	Protease activity	Q2F5J2	Prohibitin protein WPH	NA	1	NA	NA
SKTI	Protease activity	Q2F5J2	Prohibitin protein WPH	NA	1	NA	NA
BR	Protease activity	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha type	1	NA	NA	NA
SKTI	Protease activity	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha type	1	NA	NA	NA
BR	Protease inhibitor activity	H9JDX3	Serpin-2 -SERPIN domain-containing protein	3	4	NA	2
SKTI	Protease inhibitor activity	H9JDX3	Serpin-2 -SERPIN domain-containing protein	3	4	NA	3
BR	Protease inhibitor activity	H9JKA2	Antichymotrypsin-2	3	NA	NA	1
SKTI	Protease inhibitor activity	H9JKA2	Antichymotrypsin-2	2	NA	NA	1
BR	Protein biosynthesis	H9IZ57	Tubulin alpha chain	NA	NA	NA	2
SKTI	Protein biosynthesis	H9IZ57	Tubulin alpha chain	NA	NA	NA	1
BR	Protein biosynthesis	H9J0N6	Translationally-controlled tumor	NA	NA	1	1
SKTI	Protein biosynthesis	H9J0N6	Translationally-controlled tumor protein homolog	1	1	1	NA
BR	Protein biosynthesis	H9J3S8	Translation elongation factor 2	NA	NA	NA	2
BR	Protein biosynthesis	H9J7S2	Ribosome biogenesis regulatory protein	1	NA	NA	NA
SKTI	Protein biosynthesis	H9J7S2	Ribosome biogenesis regulatory protein	1	NA	NA	NA

BR	Protein biosynthesis	H9J8C7	ranslocon-associated protein subunit beta	NA	NA	NA	1
SKTI	Protein biosynthesis	H9JAB7	eIF2B-alpha protein	1	NA	NA	NA
BR	Protein biosynthesis	H9JU64	Ribosomal protein L6	1	1	NA	NA
SKTI	Protein biosynthesis	H9JU64	Ribosomal protein L6	1	NA	NA	1
BR	Protein biosynthesis	Q5UAR0	Ribosomal protein L28	NA	1	NA	NA
SKTI	Protein biosynthesis	Q5UAR0	Ribosomal protein L28	NA	1	NA	1
SKTI	Protein metabolism	H9JHL2	MPN domain-containing protein	NA	NA	NA	1
BR	Redox process	H9IXE6	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	NA	1	NA	NA
SKTI	Redox process	H9IXE6	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	NA	1	NA	1
BR	Redox process	H9IYX2	Retinal dehydrogenase 1	NA	NA	NA	2
SKTI	Redox process	H9IYX2	Aldedh domain-containing protein	1	NA	NA	1
BR	Redox process	H9J0A3	Putative alcohol dehydrogenase	1	1	NA	2
SKTI	Redox process	H9J0A3	Putative alcohol dehydrogenase	1	1	NA	1
BR	Redox process	H9J250	Protein disulfide-isomerase	NA	1	1	1
SKTI	Redox process	H9J250	Protein disulfide-isomerase	1	1	NA	2
SKTI	Redox process	H9J294	trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase	NA	1	NA	NA
BR	Redox process	H9J7L3	NADP-dependent oxidoreductase	NA	NA	1	NA
SKTI	Redox process	H9J7L3	NADP-dependent oxidoreductase	NA	NA	NA	2
BR	Redox process	H9J8A9	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	NA	1	NA	1
BR	Redox process	H9JHN5	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	1	NA	NA
SKTI	Redox process	H9JHN5	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	1	NA	NA
BR	Redox process	H9JKA0	Glutathione S-transferase 10	1	NA	NA	NA
SKTI	Redox process	H9JKA0	Glutathione S-transferase 10	NA	NA	NA	1
BR	Redox process	H9JKZ2	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	NA	NA	1	1
BR	Redox process	H9JNV5	Zinc-containing alcohol dehydrogenase	NA	1	NA	1
SKTI	Redox process	H9JNV5	Zinc-containing alcohol dehydrogenase	NA	NA	NA	1
BR	Redox process	H9JRJ2	Aldo_ket_red domain-containing protein	NA	1	1	NA
SKTI	Redox process	H9JRJ2	Aldo_ket_red domain-containing protein	NA	1	NA	NA

BR	Redox process	H9JUE7	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	NA	NA	NA	2
SKTI	Redox process	H9JUE7	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	NA	NA	NA	4
BR	Redox process	H9JUI0	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	3	NA	1
SKTI	Redox process	H9JUI0	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	2	NA	NA
BR	Redox process	H9JUK8	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	NA	NA	NA	1
BR	Redox process	H9JUP1	Aldo_ket_red domain protein	NA	1	NA	NA
SKTI	Redox process	H9JUP1	Aldo_ket_red domain-containing protein	NA	1	NA	NA
BR	Redox process	H9JUQ7	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	NA	NA	NA
SKTI	Redox process	H9JUQ7	3-dehydroecdysone 3alpha-reductase	1	NA	NA	NA
BR	Redox process	H9JV01	carbonyl reductase [NADPH] 1	NA	1	NA	NA
SKTI	Redox process	H9JV01	carbonyl reductase [NADPH] 1	NA	1	NA	1
BR	Redox process	Q2F5R4	Glutamate dehydrogenase	3	2	NA	NA
SKTI	Redox process	Q2F5R4	Glutamate dehydrogenase	1	1	NA	1
BR	Redox process	Q2F5Y9	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	NA	1	NA	2
SKTI	Redox process	Q2F5Y9	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	1	1	1	2
BR	Redox process	Q4H1F9	Glutathione peroxidase	NA	NA	1	NA
SKTI	Redox process	Q4H1F9	Glutathione peroxidase	NA	NA	1	1
BR	Redox process	Q6T3A7	Thiol peroxiredoxin	NA	1	NA	NA
SKTI	Redox process	Q6T3A7	Thiol peroxiredoxin	NA	1	1	NA
BR	Redox process	SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	NA	NA	NA	1
SKTI	Redox process	SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	NA	1	NA	NA
SKTI	Redox process	A4UU25	Cytochrome P450	1	1	NA	NA
SKTI	Signaling	H9J2M1	Importin subunit alpha	NA	1	NA	NA
SKTI	Signaling	H9J647	bisphosphate nucleotidase 1 isoform X2	1	NA	NA	NA
BR	Signaling	H9JAN8	Cytosolic juvenile hormone binding protein 36 kDa	NA	2	NA	NA
SKTI	Signaling	H9JAN8	Cytosolic juvenile hormone binding protein 36 kDa	NA	2	NA	NA
BR	Signaling	H9JB75	signaling adaptor activity	NA	NA	NA	2
SKTI	Signaling	H9JB75	Androgen-dependent TFPI-regulating protein-like	NA	NA	NA	2

BR	Signaling	H9JH85	Androgen-dependent TFPI-regulating protein-like	NA	NA	NA	1
BR	Signaling	H9JID2	Protein kinase C and casein kinase substrate	NA	1	NA	NA
SKTI	Signaling	H9JID2	Protein kinase c inhibitor	NA	NA	1	NA
SKTI	Signaling	H9JJK2	Protein kinase c inhibitor	1	1	NA	NA
SKTI	Signaling	H9JKS9	Annexin IX isoform C	NA	1	NA	NA
BR	Signaling	Q1HPY8	Phosphatidylethanolamine binding protein isoform 1	NA	NA	NA	1
SKTI	Signaling	Q1HPY8	Phosphatidylethanolamine binding protein isoform 1	NA	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9ISR9	N-acetyltransferase domain-containing protein	NA	NA	NA	1
BR	Transferease/modification	H9IYU4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NA	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9IYU4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9IZB9	Farnesoic acid O-methyltransferase	NA	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9IZB9	Farnesoic acid O-methyltransferase	NA	NA	NA	1
BR	Transferease/modification	H9JDX6	S-formylglutathione hydrolase	1	NA	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JKZ8	Peptidylprolyl isomerase	1	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9JKZ8	Peptidylprolyl isomerase	1	NA	NA	NA
SKTI	Transferease/modification	H9JLY5	Myrosinase 1	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JMQ8	myrosinase 1	NA	NA	NA	3
SKTI	Transferease/modification	H9JMQ8	myrosinase 1	1	2	NA	NA
SKTI	Transferease/modification	H9JMQ9	myrosinase 1	NA	2	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JNC6	Acetoacetyl-CoA thiolase	NA	2	NA	2
SKTI	Transferease/modification	H9JNC6	Acetoacetyl-CoA thiolase	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JSZ8	Putative acetyl transferase	NA	1	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9JSZ8	Putative acetyl transferase	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JWI1	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	NA	1	NA	NA
SKTI	Transferease/modification	H9JWI1	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	H9JXF1	4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase	NA	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	H9JXF1	4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase	1	1	NA	NA

BR	Transferease/modification	Q2I0J5	Glutathione S-transferase 3	NA	NA	NA	1
SKTI	Transferease/modification	Q2I0J5	Glutathione S-transferase 3	NA	1	NA	NA
BR	Transferease/modification	Q5CCJ4	Glutathione S-transferase sigma 2	2	2	NA	1
SKTI	Transferease/modification	Q5CCJ4	Glutathione S-transferase sigma 2	2	2	2	3
SKTI	Unknow	E5EVW5	Inorganic pyrophosphatase	NA	NA	NA	1
SKTI	Unknow	H9IZF9	Uncharacterized	1	2	NA	NA
BR	Unknow	H9J818	Alcohol dehydrogenase domain	NA	1	NA	1
SKTI	Unknow	H9J818	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	1	1	NA	NA
BR	Unknow	H9J991	carbonyl reductase [NADPH] 3	NA	NA	1	NA
BR	Unknow	H9JIP2	Uncharacterized	1	1	NA	NA
SKTI	Unknow	H9JIP2	Uncharacterized	1	NA	NA	1
BR	Unknow	H9JP17	SGL domain-containing protein	1	NA	NA	2
SKTI	Unknow	H9JP17	SGL domain-containing protein	NA	NA	NA	2
BR	Unknow	H9JSR3	Retinol dehydrogenase 14	1	NA	NA	NA
SKTI	Unknow	H9JSR3	Retinol dehydrogenase 14	NA	NA	NA	1
BR	Unknow	H9JUK7	Uncharacterized	NA	NA	NA	1
BR	Unknow	H9JVE1	Uncharacterized	1	NA	NA	NA

CAPÍTULO IV – Transcriptoma, resposta ao estresse oxidativo e alterações histológicas da praga da soja *Anticarsia gemmatalis* a inibidores de protease natural e racionalmente desenhado

ARTIGO III – Transcriptome, oxidative stress response and histological alterations of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis* to natural and rationally designed protease inhibitors

**Transcriptoma, resposta ao estresse oxidativo e alterações histológicas da praga da soja
Anticarsia gemmatalis a inibidores de protease natural e racionalmente desenhado**

RESUMO

Os efeitos fisiológicos dos IPs não se limitam ao dano nutricional ao inseto. Eles levam a respostas bioquímicas que podem variar desde o redirecionamento da síntese de proteínas para a produção de novas proteases até o aumento da produção de enzimas envolvidas nas vias de desintoxicação. Assim, os efeitos do IP natural de soja (SKTI) e do peptídeo racionalmente desenhado GORE2 (Val-Leu-Arg) foram avaliados neste trabalho em três níveis: a modulação gênica causada pelos IPs, o estresse oxidativo através de enzimas chave (catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione *S*-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD)) e sob uma perspectiva morfológica do intestino. A presença de IP na dieta de *Anticarsia gemmatalis* foi responsável por 1474 genes diferencialmente expressos, dos quais 643 e 831 genes foram responsivos ao SKTI e ao GORE2, respectivamente. Dentre os genes modulados pelos IP, 62 codificam para proteases, sendo 31 genes responsivos ao SKTI e 33 ao GORE2. Além disso, os IP causaram estresse oxidativo e alterações histológicas no intestino médio do inseto. A resposta por meio de enzimas antioxidantes do inseto foi menos eficiente para o GORE2, provocando danos mais intensos ao epitélio intestinal. O fato de a *A. gemmatalis* responder de forma mais eficiente ao SKTI mostra uma melhor adaptabilidade ao inibidor natural da soja quando comparada ao tripeptídeo, revelando um potencial valioso para o GORE2 como inseticida, pois a maquinaria celular foi menos responsiva ao reconhecimento e superação dos efeitos negativos do tripeptídeo. Nesse sentido, o tripeptídeo GORE2 apresenta-se como uma alternativa eficiente no controle de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: coevolução, interação planta-praga, resistência

**Transcriptome, oxidative stress response and histological alterations of the soybean pest
Anticarsia gemmatalis to natural and rationally designed protease inhibitors**

ABSTRACT

The physiological effects of PIs are not limited to nutritional damage to the insect. They lead to biochemical responses that can range from redirecting protein synthesis to produce new proteases to increasing the production of enzymes involved in detoxification pathways. Thus, the effects of the natural soybean PI (SKTI) and the rationally designed peptide GORE2 (Val-Leu-Arg) were evaluated in this work at three levels: gene modulation caused by IPs, oxidative stress through key enzymes (catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione *S*-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD)) and from a morphological perspective of the intestine. The presence of PI in the diet of *Anticarsia gemmatalis* handled 1474 differentially expressed genes, of which 643 and 831 genes responded to SKTI and GORE2, respectively. Among the genes modulated by PI, 62 code for proteases, being 31 genes responsive to SKTI and 33 to GORE2. In addition, PI caused oxidative stress and histological changes in the insect's midgut. The insect's antioxidant enzyme response was less efficient for the GORE2, causing more intense damage to the intestinal epithelium. The fact that *A. gemmatalis* responds more efficiently to SKTI shows a better adaptability to the natural soybean inhibitor when compared to the tripeptide, revealing a valuable potential for the GORE2 as an insecticide, as the cellular machinery was less responsive to the recognition and overcoming of the negative effects of tripeptide. In this sense, the tripeptide GORE2 presents itself as an efficient alternative in the control of *A. gemmatalis*.

Keywords: coevolution, plant-pest interaction, resistance

1. INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga chave em soja, responsável por severa desfolha na cultura e grandes perdas econômicas (LIMA et al., 2020; WALKER et al., 2000). O controle dessa lagarta tem sido realizado por inseticidas orgânicos (FIAZ et al., 2018; LEVY et al., 2007), às vezes associado ao manejo integrado de pragas (BUENO et al., 2011; PANIZZI, 2013) e variedades de soja transgênica que expressam proteínas entomotóxicas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; PAULA et al., 2014). No entanto, o uso excessivo de agrotóxicos afeta animais não-alvo, compromete o lençol freático e a cadeia alimentar, com consequências para a saúde humana (CAMPOS et al., 2019; SOUSA et al., 2020). Além disso, os inseticidas convencionais selecionaram populações resistentes (COELHO et al., 2020; HOROWITZ et al., 2020; JAHAN et al., 2008), tornando cada vez mais urgente o desenvolvimento de tecnologias alternativas de controle de pragas.

Diante desse problema, os inibidores de protease (IP) surgiram como uma alternativa às moléculas não persistentes no meio ambiente e são mais seguros para organismos não alvos, incluindo inimigos naturais de pragas agrícolas. IPs são proteínas ou metabólitos capazes de interagir com enzimas proteolíticas, comprometendo a digestibilidade e a utilização protéica do animal (PONTUAL et al., 2012). Essa redução na atividade catalítica afeta o desenvolvimento e o sucesso reprodutivo do inseto (FRANCO et al., 2004). Apesar de causar danos ao inseto, os IPs naturais de origem proteica (por exemplo, SKTI - soybean Kunitz trypsin inhibitor) são moléculas grandes que possuem sítios de clivagem para outras proteases (SINGH et al., 2020; YANG et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Além disso, os insetos expressam isoformas insensíveis a muitos IPs naturais (COURA et al., 2022; SILVA-JÚNIOR et al., 2021). Para superar os mecanismos adaptativos do inseto, projetamos racionalmente o tripeptídeo GORE2 (Val-Leu-Arg) para se ligar efetivamente à tríade catalítica de tripsina-like do intestino de *A. gemmatalis* como um potente IP (DE ALMEIDA BARROS et al., 2021). Além disso, iniciamos a análise dos dipeptídeos racionalmente desenhados, mostrando que aqueles contendo Arg na posição P₁ são mais eficientes para a inibição e interação com tripsinas de lepidópteros-praga (MERIÑO-CABRERA et al., 2022).

Os efeitos fisiológicos dos IPs não se limitam ao dano nutricional ao inseto. Eles levam a respostas bioquímicas que podem variar desde o redirecionamento da síntese de proteínas até a produção de novas proteases (COURA et al., 2022) para aumentar a produção de enzimas envolvidas nas vias de desintoxicação do corpo (FARAHANI et al., 2020). O sucesso evolutivo dos insetos na Terra resulta em grande parte de um sistema de defesa complexo e eficiente

baseado em enzimas antioxidantes. Em níveis muito baixos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel vital na sinalização e defesa celular (LIJUN et al., 2005; WANG et al., 2006); no entanto, níveis mais altos são prejudiciais ao DNA e às proteínas. Durante o estresse oxidativo, o inseto se protege contra ROS pela catálise de enzimas antioxidantes. Por causa disso, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes em insetos é frequentemente associado à resistência a inseticidas (JAHAN et al., 2008).

Enzimas envolvidas no estresse oxidativo de lepidópteros respondem a estressores bióticos, como parasitas (DUBOVSKIY et al., 2008; FARAHANI et al., 2020) e plantas resistentes (AUCOIN; PHILOGÈNE; ARNASON, 1991; WAR et al., 2011, 2012). Essas enzimas também respondem a estressores abióticos, como excesso de radiação UV (ALI et al., 2017b), temperatura e fome (ALI et al., 2017a; FARAHANI et al., 2020), além da exposição a inseticidas organofosforados (SHADNIA et al., 2005; YU et al., 2011). Nesse sentido, as enzimas catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione *S*-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) são os principais biomarcadores de estresse oxidativo em insetos (ALI et al., 2017b; FARAHANI et al., 2020; JIA et al., 2011; MENG et al., 2009; PERIĆ-MATARUGA et al., 2019). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do IP natural de soja (SKTI) e do inibidor GORE2 (Val-Leu-Arg) sob três níveis: a modulação dos genes envolvidos no mecanismo de defesa do inseto; o produto gênico final, ou seja, a atividade de enzimas antioxidantes e desintoxicantes e as respostas a nível celular, mediante alterações histológicas causadas no intestino do inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos e preparo da dieta artificial contendo IPs

As lagartas de *A. gemmatalis* foram obtidas do Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e mantidas em condições controladas de 25 ± 2 °C de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 h de fotofase. Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial de acordo com Greene et al. (1976). As larvas de quinto ínstar foram separadas em gaiolas de 3 x 5 cm e alimentadas *ad libitum* em dieta (controle) e dietas suplementadas com concentração de IPs subletais: 0,12% (p/p) de serina-protease Kunitz (SKTI) (tratamento 1), conforme descrito por Chougule et al. (2008), e 0,12% (p/p) de GORE2 (tratamento 2). Após 24 h, as lagartas foram coletadas de cada tratamento e controle. Os intestinos foram removidos e armazenados a -80 °C.

2.2. Extração do RNA e sequenciamento

Os tratamentos contendo lagartas controle, alimentadas com GORE2 e alimentadas com SKTI, foram compostos por três réplicas biológicas e técnicas. O RNA total de cada tratamento foi isolado do intestino médio de *A. gemmatalis* por meio do reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As contaminações de DNA foram removidas das amostras de RNA por DNase I livre de RNase (New England Biolabs). A pureza e a quantificação do RNA total foram avaliadas por um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e um Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies). A integridade do RNA foi verificada pelo RNA Nano 6000 Assay Kit, do sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O RNA total de alta qualidade isolado das réplicas biológicas, independentes para cada população de *A. gemmatalis* foi utilizado individualmente para construir bibliotecas de cDNA.

As bibliotecas de transcriptoma foram geradas usando o NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o agrupamento, a biblioteca foi sequenciada por BGI Genomics (Hong Kong) na plataforma DNBseq. A limpeza e a filtragem de dados foi realizada pela BGI Genomics usando SOAPnuke versão 2.1.4 (CHEN et al., 2018), removendo adaptadores e leituras com 50% das bases com pontuação de phred menor que 20.

2.3. Análise de qualidade e montagem

A qualidade dos dados do sequenciamento foi avaliada pelos relatórios gerados no software FastQC versão 0.11.7 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) e combinados usando o MultiQC versão 1.12 (<https://github.com/ewels/MultiQC>) (EWELS et al., 2016). As leituras foram processadas para remover as sequências dos adaptadores das bibliotecas usando a configuração “auto-detect” do software TrimGalore versão 0.6.7 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). Em seguida, as sequências foram trimadas e filtradas usando o software Trimmomatic versão 0.39 (<https://github.com/usadellab/Trimmomatic>) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) com os seguintes parâmetros: HEADCROP:15; LEADING:3; TRAILING:3; SLIDINGWINDOW:4:20; MINLEN:50. As sequências trimadas foram processadas pelo software Rcorrector, versão 1.0.4 (<https://github.com/mourisl/Rcorrector>) (SONG; FLOREA, 2015), usando as configurações padrão e aplicando um método de correção das sequências baseado na análise de *k*-mers.

A montagem *ab initio* do transcriptoma foi feita usando o software Trinity versão 2.8.5 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq>) (GRABHERR et al., 2011), selecionando as configurações padrão e filtrando os transcritos com um tamanho mínimo de 500 nucleotídeos. As estatísticas descritivas da montagem foram obtidas usando o script “TrinityStats.pl”. A montagem também foi avaliada por meio do mapeamento das leituras nas sequências dos transcritos usando o software Bowtie2 v2.2.6 (<https://github.com/BenLangmead/bowtie2>) (LANGMEAD, 2009), selecionando as configurações padrão “--end-to-end” e “--sensitive”.

Após a montagem, os transcritos foram reunidos em conjuntos Unigenes de sequências não redundantes usando a ferramenta cd-hit-est do software CD-HIT versão 4.8.1 (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/>) (FU et al., 2012), selecionando uma identidade mínima de 98% para o agrupamento das sequências.

2.4. Predição das ORFs e anotação funcional das proteínas

As sequências dos Unigenes foram analisadas para identificar os quadros de leituras aberto (*open read frames* - ORFs) usando a ferramenta TransDecoder.LongOrfs versão 5.5.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>) (HAAS et al., 2013) e considerando somente as ORFs um tamanho mínimo de 300 nucleotídeos.

As sequências das proteínas codificadas pelas ORFs foram comparadas com as proteínas das espécies dos gêneros *Bombyx*, *Danaus*, *Heliconius* e *Helicoverpa* disponíveis no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniprotKb, <http://www.uniprot.org>) (UniProt Consortium, 2014) usando a ferramenta BLASTp versão 2.11.0 (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências das proteínas também foram comparadas com os modelos de Markov ocultos (Hidden Markov Models, HMMs) das famílias dos domínios do banco de dados Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (FINN et al., 2014) usando o HMMER versão 3.1b2 (<https://github.com/EddyRivasLab/hmmer>) (FINN et al., 2015). Somente foram considerados significativos os alinhamentos que apresentaram um valor de E-value $\leq 1 \times 10^{-10}$. Os alinhamentos do BLASTp também foram avaliados quanto à similaridade de sequências, selecionando aqueles que apresentaram o produto cobertura x similaridade $\geq 40\%$.

A predição das proteínas codificadas pelos Unigenes foi feita usando a ferramenta TransDecoder.predict e agrupando a predição das ORFs com os resultados das pesquisas de similaridade usando BLASTp e HMMER. As sequências dos Unigenes foram funcionalmente

anotadas pela ferramenta TRAPID versão 2.0 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/trapid_02/) (VAN BEL et al., 2013), selecionando o banco de dados EggNOG versão 4.5.1 (HUERTA-CEPAS et al., 2016, 2017) e considerando um valor de E-value $\leq 1 \times 10^{-10}$ para a atribuição de família de genes, a identificação de domínios funcionais e anotação de termos de ontologia (GO).

2.5. Análise dos transcritos diferencialmente expressos

A quantificação da abundância dos transcritos foi realizada pelo software Kallisto versão 0.44.0 (<https://github.com/pachterlab/kallisto>) (BRAY et al., 2016), realizando o pseudoalinhamento das reads contra as sequências dos unigenes,

A análise da expressão diferencial de genes, entre os tratamentos SKTI e GORE2 foi conduzida pelo pacote DESeq2 versão 3.15 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), visando quantificar o número de sequencias alinhadas em cada transcrito a partir dos dados obtidos pelo Kallisto. Os parâmetros usados foram p -valor ajustado $< 0,01$ e $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ ($|\text{FC}| \geq 2$).

Os genes identificados como diferencialmente expressos foram submetidos a análise com BLAST2GO (<http://www.blast2go.de>) (CONESA et al., 2005) realizando uma anotação automática contra o banco de dados nr de artrópodes do NCBI com um E-value de 1×10^{-10} . O enriquecimento de vias metabólicas dos genes diferencialmente expressos foi avaliado pela ferramenta KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) (XIE et al., 2011), usando como referência os genomas de *Helicoverpa armígera* e *Bombyx mori*. pelo teste estatístico hipergeométrico.

2.6. Extração de proteínas do intestino da lagarta

Os intestinos médios das lagartas de quinto ínstar foram dissecados e colocados em 1 mL de solução de ácido clorídrico 10^{-3} M a 4 °C, sempre mantendo a proporção de cinco intestinos por 1 mL de solução, seguido de maceração em TissueLyser II (Qiagen). O extrato foi centrifugado a 10000 g por 30 min a 4 °C, e os pellets foram descartados. Os sobrenadantes contendo o material solúvel foram separados e armazenados a -20 °C.

2.7. Ensaio de enzimas antioxidantes e desintoxicantes

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com o método de Aebi (1984). A mistura de reação continha 100 μL de amostra em um volume total de 1,5 mL de H_2O_2 30 mM e tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). As leituras de absorvância foram obtidas a 240 nm em modo automático com uma leitura por segundo por 120 s (Molecular Devices, Mod. SpectraMax ABS Plus). Os valores de atividade específica da catalase foram expressos em $\text{mmol s}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada de acordo com o método de Shannon et al. (1966) com pequenas modificações. A reação ocorreu com a adição de 0,1 mL de extrato enzimático em 1,45 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5), H_2O_2 0,8 mM e Guaiacol 5 mM. A absorvância foi lida a 470 nm por 120 s com uma leitura por segundo no espectrofotômetro (Molecular Devices, Mod. SpectraMax ABS Plus). A atividade final da enzima foi expressa em U por grama de proteína. Uma unidade enzimática (U) foi definida como uma mudança na absorvância de 0,1 unidades por minuto sob condições de teste.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. 50 μL de extrato enzimático foram adicionados à mistura de reação, que continha 50 μL de CDNB, 150 μL de 50 mM de glutathione reduzida (GSH) e 2,5 mL de 100 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,5). A mistura reacional foi cuidadosamente homogeneizada e a formação do complexo GSH-CDNB foi monitorada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Mod. SpectraMax ABS Plus) a 340 nm por 120 s, com leitura automática a cada segundo. A atividade foi determinada usando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada usando um kit colorimétrico comercial (Ref. CS0009, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Todas as atividades enzimáticas foram obtidas em triplicata.

2.8. Análise estatística

As análises de dados de todos os ensaios enzimáticos descritos foram realizadas usando o software R. As diferenças entre os grupos experimentais foram calculadas por ANOVA de uma via. O valor $p < 0,05$ foi utilizado como padrão de significância estatística para teste de hipóteses.

2.9. Análises histológicas do intestino médio da lagarta

Para análise histológica, cinco lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com IPs e controle foram coletadas, dissecadas e transferidas para a solução fixadora de Zamboni por 12 h a 4 °C (FIAZ et al., 2018). Os intestinos médios foram desidratados em série gradativa de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) e embebidos em historesina (Leica) seguindo as instruções do fabricante. Secções de três µm de espessura foram obtidas com micrótomo de rotação e coradas com hematoxilina (8 min) e eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de qualidade e montagem do transcriptoma de referência

O sequenciamento (RNAseq) das bibliotecas isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* permitiu gerar um transcriptoma com 48 milhões de reads, com o tamanho de 100 nt e um conteúdo CG médio de 48%. Após a remoção dos adaptadores e trimagem das reads, 44 milhões de reads com tamanhos variando entre 50 e 85 nt foram selecionadas.

A montagem do transcriptoma de referência identificou 51825 transcritos. O comprimento médio dos transcritos obtidos foi de 2243,6 nt e o N50 foi de 3246 nt. Esse transcriptoma foi validado pelo mapeamento das reads das bibliotecas, no qual 86% das reads alinharam nos transcritos e 14,31% das reads não alinharam em nenhuma das sequências obtidas. Além disso, 20,33% das reads alinharam exatamente uma única vez e 65,36% das reads tiveram múltiplos alinhamentos. As sequências dos transcritos foram agrupadas em 42372 unigenes, que possuem um tamanho médio de 1467 nt e um N50 de 2894 nt.

3.2. Anotação funcional

Um total de 42372 Unigenes foram identificados como candidatos a gene e 51802 *open read frame* (ORFs) foram localizadas. Destas, um total de 25906 proteínas foram anotadas quanto à similaridade, contra o banco de dados de proteína do Uniprot, satisfazendo um total de 50% de anotações. As espécies *Bombyx mori* e *Danaus plexippus* corresponderam a aproximadamente 70% dos *best hit* no banco de dados EggNog (Figura 1). Além disso, 13731 GO foram anotados com base nos termos de Gene Ontology e 13223 termos KO de enzimas para o banco de dados KEGG. As enzimas mais frequentes nos transcritos foram pertencentes às classes das hidrolases (E.C. 3), transferases (E.C. 2) e oxiredutases (E.C. 1). As tripsinas-

like (KO1312) tiveram 145 ocorrências, sendo o código mais contabilizado (Figura 2). Um total de 32673 genes foram contabilizados como domínios proteicos pelo banco de dados Pfam.

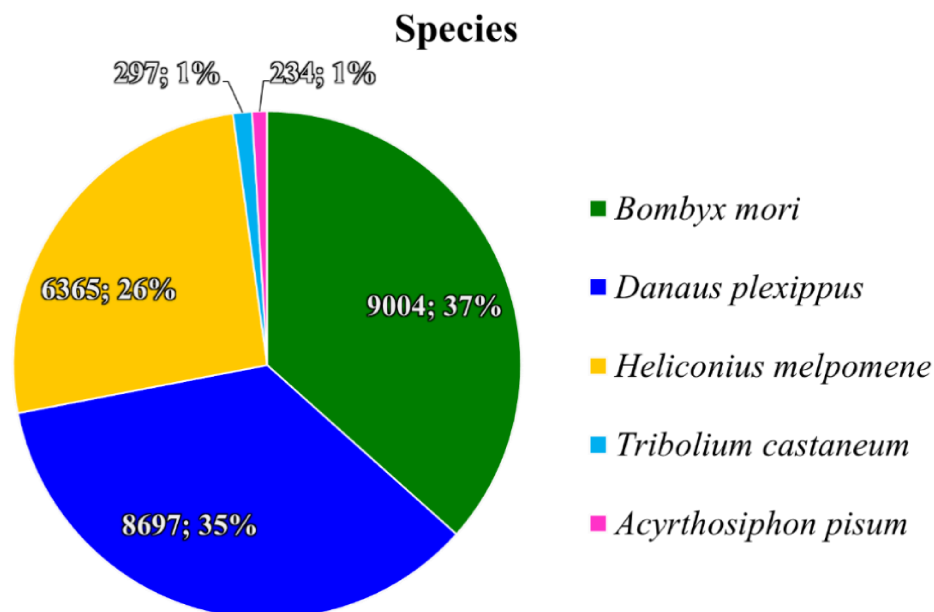


Figura 1. Distribuição da anotação funcional para a similaridade entre diferentes espécies, calculada a partir da base de dados EggNog pela ferramenta TrapID.

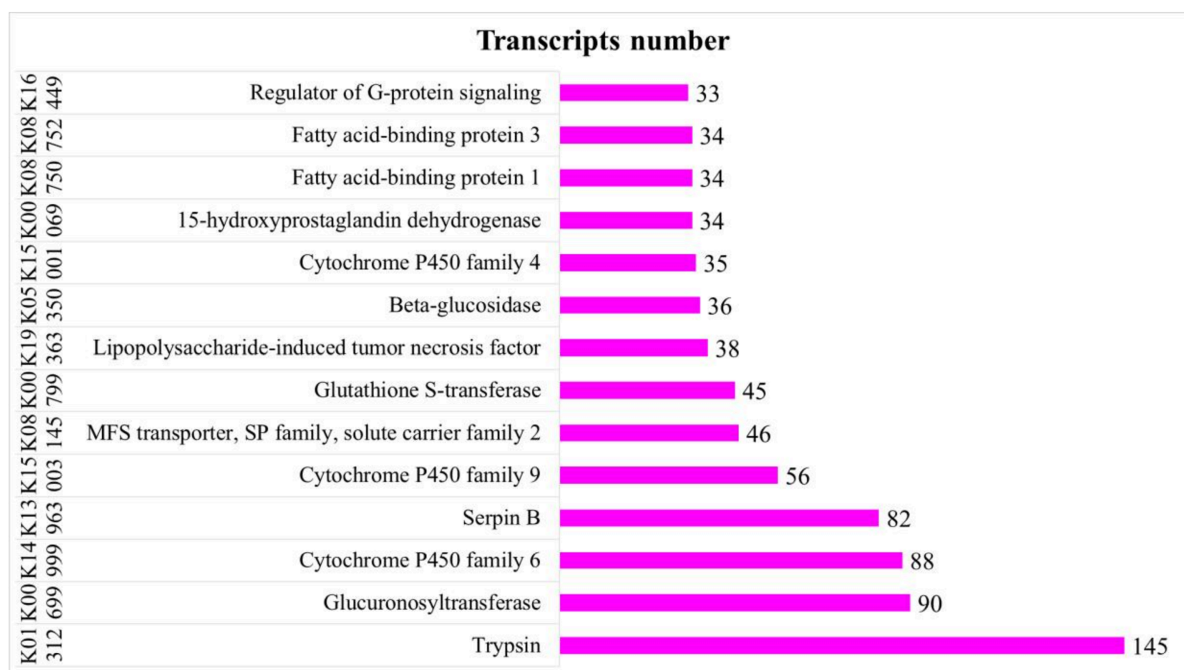


Figura 2. Domínios protéicos mais frequentes representados na sequência do transcriptoma de *Anticarsia gemmatalis* identificados pelo KEGG.

3.3. Análise dos genes diferencialmente expressos (DEG)

No total, 1474 genes diferencialmente expressos foram encontrados quando as lagartas foram alimentadas com SKTI e GORE2, dos quais 266 genes foram *down*-regulados e 377 foram *up*-regulados no tratamento contendo SKTI na dieta. Por outro lado, 487 genes foram *up*-regulados enquanto 344 genes foram *down*-regulados no tratamento com lagartas alimentadas com o tripeptídeo GORE2. Ao todo, 643 genes foram responsivos ao tratamento com SKTI enquanto o GORE2 foi responsável pela modulação de 831 genes (Figura 3).

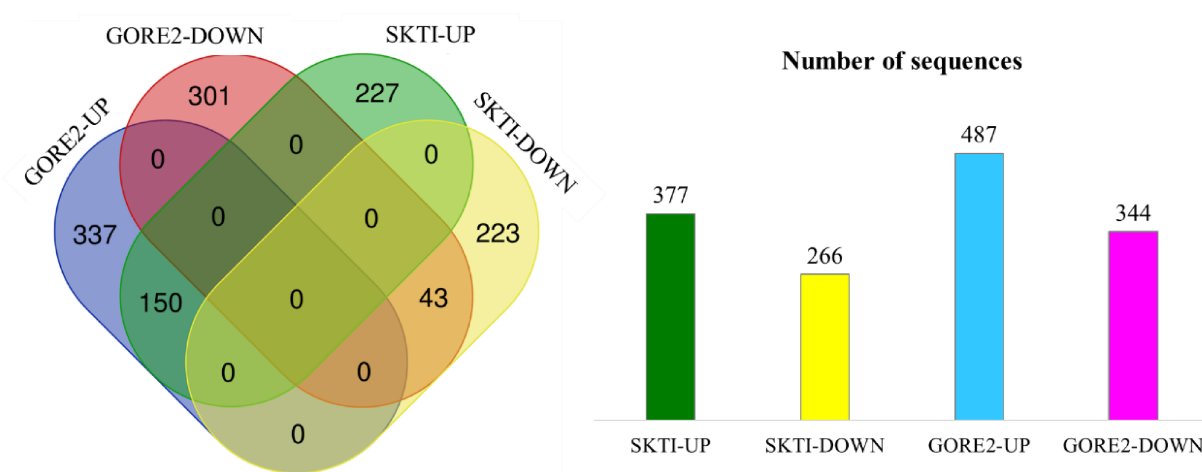


Figura 3. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os tratamentos analisados. O diagrama representa o número de elementos específicos divididos entre 1, 2, 3 e 4 comparações. Os valores absolutos de genes *up* e *down*-regulados para as lagartas alimentadas com SKTI e GORE2 estão agrupados no gráfico de colunas.

A análise dos DEGs revelou 64 genes correspondentes a proteases (Tabela 1), dos quais 31 foram *up*-regulados e 7 foram *down*-regulados pelo SKTI. Por outro lado, as lagartas tratadas com GORE2 tiveram aumento da expressão gênica para 25 proteases e diminuição para 18 proteases (figura 4).

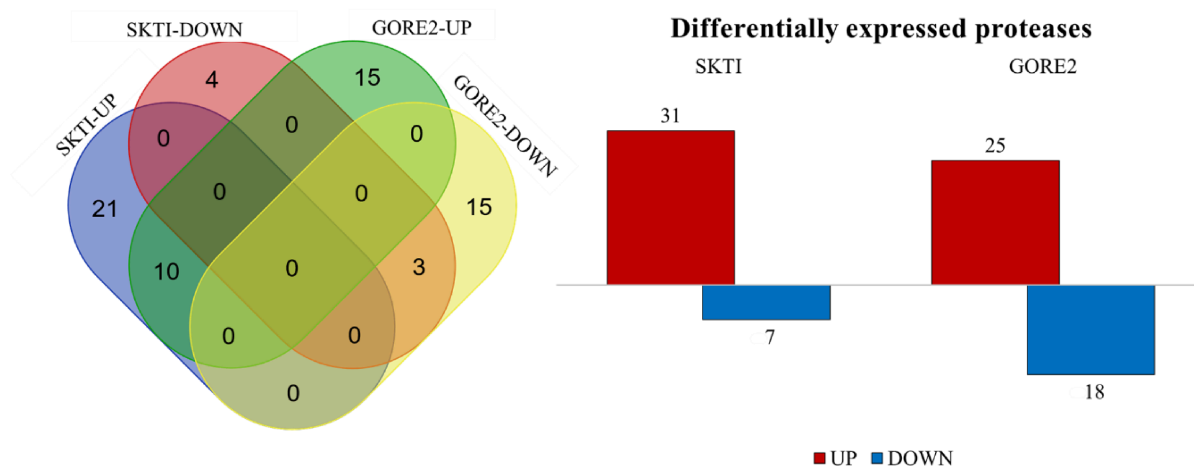


Figura 4. Número de genes que codificam para proteases com expressão diferencial em intestino de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com SKTI e GORE2.

3.4. Atividade enzimática antioxidante

Observamos evidências de estresse oxidativo em lagartas de *A. gemmatalis* quando alimentadas com dieta artificial mais IP em concentrações subletais por 24 h. A atividade de CAT no intestino da lagarta aumentou significativamente (4 vezes) após 24 h de exposição ao IP (Figura 5A). No entanto, não houve diferença nas atividades de CAT entre lagartas alimentadas com SKTI e aquelas alimentadas com GORE2.

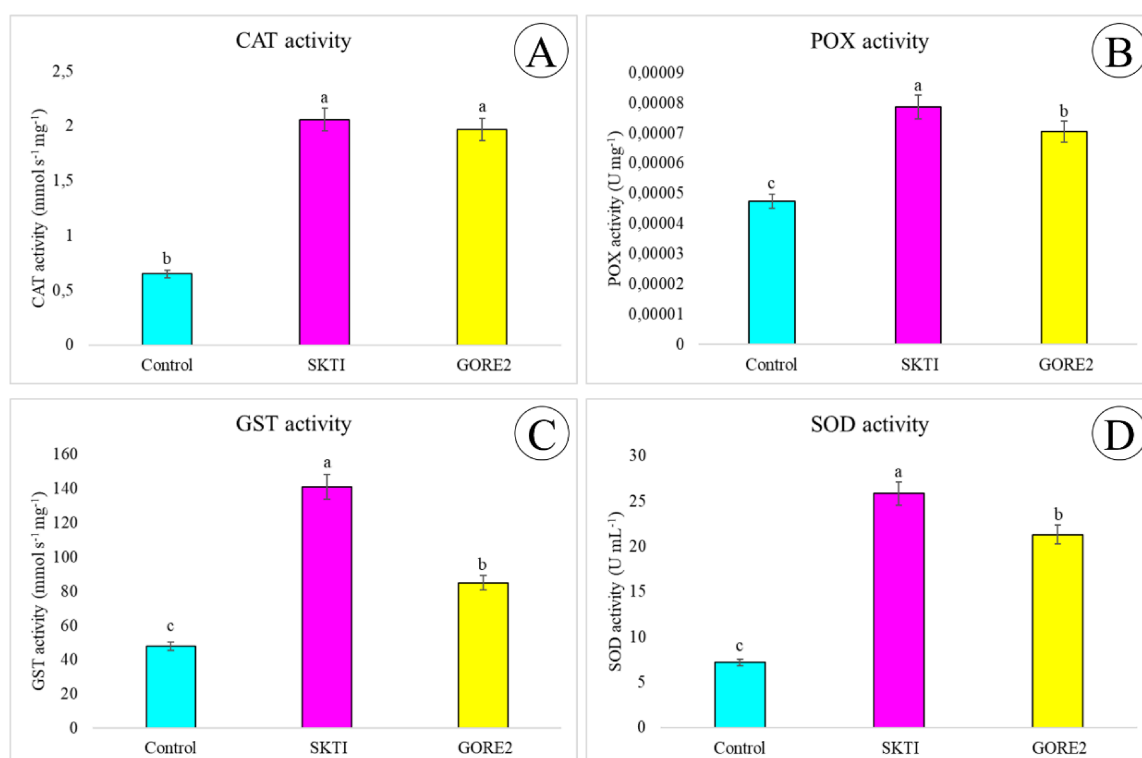


Figura 5. Efeito da exposição de *Anticarsia gemmatalis* aos inibidores de protease SKTI e GORE2 em quatro antioxidantes e enzimas desintoxicantes: (A) Catalase; (B) Peroxidase; (C) Glutathiona S-transferase; (D) Superóxido dismutase. Letras diferentes nas barras mostram uma diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A atividade de POX aumentou em resposta a tratamentos contendo IP (Figura 5B). Além disso, houve diferença significativa entre os tratamentos SKTI e GORE2, sendo a atividade POX maior para a dieta contendo SKTI.

A atividade de GST foi 2,9 vezes maior nos intestinos de lagartas alimentadas com SKTI em comparação com o controle. As lagartas alimentadas com GORE2 mostraram um aumento de 1,7 vezes, também em relação ao controle (Figura 5C). Também houve diferença significativa entre os tratamentos de lagartas expostas ao IP, com atividade de GST sendo 40% menor para GORE2 do que para SKTI.

As lagartas tratadas com IP também responderam com aumento da atividade de SOD tanto para aquelas alimentadas com SKTI quanto para aquelas tratadas com GORE2 (Figura 5D). Os aumentos nas atividades de SOD para as lagartas alimentadas com SKTI e GORE2, em relação ao controle, foram de 3,5 vezes e 2,9 vezes, respectivamente.

3.5. Histologia

As lagartas apresentaram alterações histológicas no intestino médio quando expostas a dietas contendo IP (Figura 6). A organização morfológica do epitélio intestinal controle foi uma monocamada de células digestivas caliciformes com a presença de borda estriada bem definida, além de citoplasma homogêneo e núcleos com cromatina condensada (Figura 6a). Os intestinos de *A. gemmatalis* alimentados com SKTI por 24 h apresentaram desorganização da borda estriada e vacuolização (Figura 6b). O epitélio das lagartas alimentadas com GORE2 apresentou vacuolização mais intensa, além de bordas estriadas mais desorganizadas (Figura 6c) quando comparado ao tratamento composto por lagartas alimentadas com SKTI.

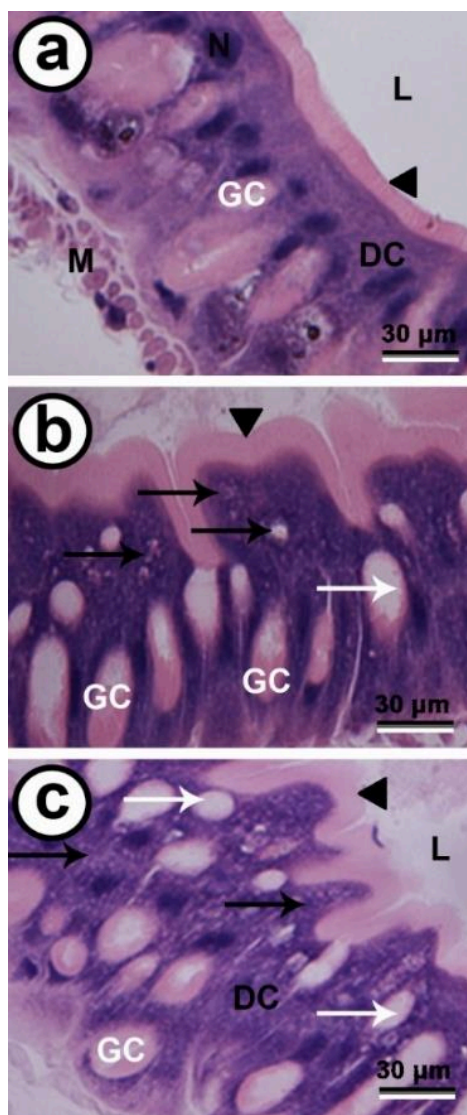


Figura 6. Micrografias de luz do intestino médio da lagarta *Anticarsia gemmatalis*. [a] Epitélio do grupo controle mostrando a borda estriada (ponta de seta) das células digestivas (DC) com citoplasma homogêneo e núcleos (N) com cromatina descondensada, células caliciformes (GC) com borda estriada clara, camadas musculares (M) e lúmen (L). [b] Epitélio de lagarta alimentada com SKTI mostrando borda estriada (ponta de seta) das células digestivas (DC) com citoplasma mostrando vacuolização (setas pretas) e células caliciformes (GC) com borda estriada desorganizada (setas brancas). [c] Epitélio de lagarta alimentado em GORE2 mostrando borda estriada (ponta de seta) das células digestivas (DC) que apresentam citoplasma fortemente vacuolizado (setas pretas), células caliciformes (GC) com borda estriada desorganizada (setas brancas).

4. DISCUSSÃO

Estudos anteriores se concentraram na função básica e imediata dos IPs: a diminuição da hidrólise de proteínas no intestino de insetos-praga. De fato, esse tem sido o foco do uso de PIs como pesticidas. No entanto, os efeitos fisiológicos causados pelos IPs vão muito além e parecem ser mais complexos do que uma simples redução do potencial proteolítico no intestino dos artrópodes. Neste trabalho, os IPs foram responsáveis por modulações na expressão de

genes importantes, envolvidos em processos biológicos, moleculares e de componentes celulares. Sob o ponto de vista enzimático, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, evidenciaram estresse oxidativo. A lagarta da soja foi mais eficiente na defesa contra SKTI, apresentando uma resposta defensiva mais intensa e eficiente quando comparada ao GORE2, apresentando uma melhor resposta de desintoxicação ao IP natural da soja. Além disso, o dano histológico foi mais extenso no intestino de lagartas alimentadas com GORE2 do que com SKTI.

A tecnologia RNAseq tem sido amplamente utilizada na caracterização e identificação de genes relacionados a mecanismos de resistência de insetos (DHANIA et al., 2019; NANOTH VELLICHIRAMMAL et al., 2015; XU et al., 2015) devido à elevada reprodutibilidade e precisão para quantificar diferentes taxas de expressão gênica (CONESA et al., 2016; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). A montagem do transcriptoma foi capaz de identificar 42372 unigenes, com 25906 proteínas anotadas no GO. Esse resultado foi superior a trabalhos realizados com outras lepidópteras (GAZARA et al., 2017; PERERA et al., 2015; SHAO et al., 2020; TANG et al., 2017). As espécies com maiores *hits* de similaridade foram *Bombyx mori*, *Danaus plexippus* e *Heliconius melpomene*, correspondendo a 98% dos genes identificados. De fato, as três lepidópteras têm uma grande quantidade de dados depositados. Esses resultados podem facilitar a pesquisa molecular em *A. gemmatalis* e outras espécies.

As tripsinas-like foram as proteínas mais frequentes representadas na sequência do transcriptoma com base nas identificações pelo KEGG, com 145 transcritos anotados, uma presença maior que a encontrada em outras lepidópteras como a *Spodoptera frugiperda* (CHEN et al., 2022; SILVA-BRANDÃO et al., 2021) e *Pieris rapae* (XIANG et al., 2018). Esse número reforça a importância da sub-subclasse das serino endopeptidases na ordem Lepidoptera como alvo para o desenvolvimento de IP eficiente no controle de pragas agrícolas importantes. As glucuronosyltransferase também foram representadas no RNAseq com alta frequência, chegando a 90 transcritos. Essas enzimas são conhecidas por participarem da desintoxicação de aleloquímicos de plantas em insetos (AHMAD; HOPKINS, 1993; AHN; VOGEL; HECKEL, 2012; KREMPL et al., 2016) e outros estudos relacionam a resistência a inseticidas devido à capacidade de essa enzima metabolizar xenobióticos tóxicos (BULL; WHITTEN, 1972; KREMPL et al., 2016). A terceira família de enzimas mais representada foi a do Citocromo P450, que é uma hemoproteína de fundamental importância na adaptação do inseto ao sistema de defesa de plantas, além do crescimento e desenvolvimento do inseto (NELSON, 2011; POTTIER et al., 2012; ZHOU et al., 2010).

O intestino médio de Lepidoptera exibe hidrolases que são responsáveis pela digestão e, dentre as principais, estão as tripsinas, quimotripsinas e elastases (DA SILVA JÚNIOR et al., 2020; SILVA-JÚNIOR et al., 2021). Por isso, as serino proteases são responsáveis pela digestão primária nesses insetos e estão envolvidas na degradação de toxinas (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006; YAO et al., 2012) e IP de origem proteica como o SKTI (SINGH et al., 2020; YANG et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Assim, a modulação de genes que codificam para essas serino proteases pode estar envolvida na inativação proteolítica do SKTI em *A. gemmatalis*.

O tripeptídeo foi responsável pela expressão diferencial de um conjunto maior de genes, quando comparado com o SKTI. No entanto, lagartas desafiadas com SKTI tiveram maior número de genes que codificam para proteases sendo *up*-regulados. Por outro lado, os genes *down*-regulados para proteases foram mais abundantes para o GORE2. O fato de a lagarta ter aumentado a expressão de proteases com maior intensidade quando desafiada com o inibidor natural da soja reforça uma das mais frequentes contra-respostas dos insetos generalistas como mecanismos de adaptação para lidar com as defesas das plantas (BAYÉS et al., 2006; VOLPICELLA et al., 2003). Lagartas alimentadas com dietas ricas em IP respondem aumentando a abundância de isoformas insensíveis a inibidores (COURA et al., 2022; JONGSMA et al., 1995). Um estudo realizado com *Helicoverpa armigera* mostrou que lagartas expostas ao SKTI na dieta tiveram aumento de mRNA que codificam proteases (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004).

O aumento geral na expressão das serino proteases pode ser atribuído a duas abordagens: universal ou seletiva. Na abordagem universal o inseto modula positivamente todos os genes que codificam enzimas digestivas, mesmo encontrando IP em sua dieta. Na abordagem seletiva apenas os genes das hidrolases insensíveis ao IP seriam mantidas. Essa abordagem seletiva implica um mecanismo de feedback ainda desconhecido que informa quais proteases devem ser mantidas. Esse mecanismo seletivo explicaria o fato de o GORE2 não elicitar tão fortemente as vias de sinalização do inseto. O inseto produz um amplo repertório de proteases em ambas as estratégias, a fim de garantir a produção de algumas isoformas insensíveis aos IP. Essa abordagem pode parecer bioenergeticamente cara para o inseto, mas aumenta consideravelmente as chances de adaptação. Nossos resultados mostraram que houve maior aumento na expressão de genes que codificam para proteases não pertencentes à família das tripsinas-*like*. Bown et al. (2004) também mostraram que *Helicoverpa armigera* apresentou uma abordagem seletiva para suplantar os efeitos negativos IP em sua dieta.

O aumento que observamos na atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, POX e GST indica estresse oxidativo, pois essas enzimas defensivas trabalham cooperativamente para lidar com as quantidades relativamente altas de ROS dentro da célula (Foyer et al., 1994). Ambas as enzimas e ROS desempenham um papel importante na homeostase, imunidade e desintoxicação. A extensa literatura sugere que as ROS são geradas continuamente após a exposição a estressores ambientais (BAGCHI et al., 1995; LEDIRAC et al., 2005; MELCHIORRI et al., 1998). Os inseticidas estão entre os fatores ambientais mais importantes e também podem induzir mudanças fisiológicas significativas e estresse oxidativo em insetos (MÜLLER, 2018; YU et al., 2011).

A atividade da CAT foi maior no intestino das lagartas alimentadas com IPs quando comparadas ao controle. No entanto, as atividades de CAT entre lagartas expostas ao SKTI e ao GORE2 não apresentaram diferença significativa entre elas após 24 h de exposição. Isso pode ter ocorrido devido à grande produção de peróxidos e superóxidos, que causam estresse oxidativo. Níveis muito altos de H_2O_2 limitam o potencial catalítico da CAT através da formação de radicais hidroxila em excesso. A CAT também é sensível ao $O_2^{\cdot-}$ e pode ser inibida por altos níveis desse superóxido (KARTHI; SANKARI; SHIVAKUMAR, 2014).

Quando o aumento da atividade da CAT é observado juntamente com o aumento da atividade da SOD, considera-se que isso ocorreu para a eliminação de H_2O_2 (MUNDAY; WINTERBOURN, 1989; SIES, 1991). Essa ação cooperativa foi observada à medida que a SOD apresentou um aumento da atividade nos intestinos das lagartas expostas aos IPs. A rápida indução da atividade de SOD pode ter levado à conversão de radicais superóxido em H_2O_2 , e uma maior concentração intracelular de H_2O_2 induz a atividade de CAT e POX (DMOCHOWSKA-ŚLEZAK et al., 2015; FELTON; SUMMERS, 1995; ŁUKASIK; GOŁAWSKA; WÓJCICKA, 2009).

Além disso, SOD apresentou maior atividade em lagartas alimentadas com SKTI em relação ao tripeptídeo GORE2. O fato de o inseto responder de forma mais eficiente ao SKTI mostra um valioso potencial inseticida para o GORE2, pois a maquinaria celular foi menos responsiva para reconhecer e superar os efeitos negativos do tripeptídeo. A SOD é a primeira enzima antioxidante na defesa contra ROS, e o aumento da atividade da SOD é a principal resposta celular à produção do ânion superóxido (EMRE et al., 2013; KAYIS et al., 2015). A enzima catalisa a dismutação de radicais de ânion superóxido em peróxidos de hidrogênio e oxigênio molecular, desempenhando um papel crucial na defesa antioxidante contra essas ROS (SANKARAPANDI; ZWEIER, 1999). Nesse sentido, contornar o sistema de defesa do inseto implica em estimular o mínimo possível as vias metabólicas de desintoxicação do sistema

fisiológico. A importância das principais enzimas antioxidantes já foi destacada por estudos envolvendo inseticidas sintéticos que visavam suprimir a atividade da SOD (ALTUNTAS; DELIBAS; SUTCU, 2002; BÜYÜKGÜZEL, 2009; SOBEKOVÁ et al., 2009).

Altuntaş (2015) demonstrou que metabólitos vegetais aumentam a atividade da SOD em lepidópteros para prevenir o estresse oxidativo, mesmo em baixas doses. Outros estudos também mostraram que a SOD pode eliminar rapidamente as ROS induzidas por pesticidas e aumentar a tolerância a inseticidas em *Galleria mellonella*, *Oxya chinensis* e *Lymantria dispar* (BÜYÜKGÜZEL, 2009; WU et al., 2017; ZENG et al., 2019). A atividade da SOD também foi induzida sob concentrações subletais de clorantraniliprole em *Agrotis ipsilon* (HE et al., 2019; LI et al., 2021) e em *Bombyx mori* (MAO et al., 2020), sendo relacionado à resistência a inseticidas.

A atividade da GST apresentou comportamento semelhante à SOD nas lagartas tratadas com PI. Houve um aumento significativo na atividade enzimática em relação ao controle após 24 h de exposição. Além disso, a atividade de GST foi maior nas lagartas alimentadas com o inibidor natural de soja em relação ao GORE2. GST é uma enzima que catalisa a conjugação de GSH com metabólitos eletrofílicos para superar a toxicidade aleloquímica em espécies de lepidópteros (BÜYÜKGÜZEL; HYRŠL; BÜYÜKGÜZEL, 2010; CHEN et al., 2019; SU et al., 2018). GST pode desintoxicar várias classes químicas de inseticidas, como organofosforados, piretróides, carbamatos e hidrocarbonetos clorados (KONANZ; NAUEN, 2004). Portanto, a GST é frequentemente identificada como um biomarcador de resistência, como demonstrado para as larvas de *Lymantria dispar* (LINDROTH; ANSON; WEISBROD, 1990).

Navarro-Roldán et al. (2020) revisaram 92 casos de mecanismos de desintoxicação em lepidópteros e descobriram que a GST estava envolvida em apenas 32% dos casos. Estudos anteriores também mostraram que vários aleloquímicos de plantas atuam como ativadores de GST ou substratos de GST em insetos fitófagos (PISKORSKI; INEICHEN; DORN, 2011; THIBOLDEAUX; LINDROTH; TRACY, 1998; YU; ABO-ELGHAR, 2000). Nesse contexto, o GST tornou-se um importante alvo de supressão no projeto racional de inseticidas sintéticos para minimizar os efeitos da resposta do inseto alvo (COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; PAPADOPOULOS et al., 2004; WU et al., 2009). Portanto, um composto nocivo ao inseto que apresenta baixa ativação de GST é relevante no estudo de inseticidas mais eficientes.

A POX apresentou comportamento semelhante às demais enzimas envolvidas no processo de desintoxicação celular. Houve aumento da atividade da POX no intestino das lagartas quando expostas aos IPs; entretanto, os insetos alimentados com dieta mais GORE2 responderam menos intensamente ao estresse oxidativo quando comparados aos tratados com

SKTI. Os resultados de POX são consistentes com os padrões observados para as demais enzimas antioxidantes avaliadas. Outra implicação importante da menor atividade de POX em lagartas alimentadas com GORE2 é a suscetibilidade a maior dano celular, observado no intestino do inseto, como será discutido mais adiante. As prostaglandinas derivadas de POX atuam na sinalização do sistema imune celular, podendo comprometer a integridade tecidual de Lepidoptera como *Spodoptera exigua* (PARK; STANLEY; KIM, 2014).

Alterações nas atividades de CAT, POX, GST e SOD têm mostrado importantes adaptações metabólicas que implicam na capacidade de desintoxicação dos insetos (Ding et al., 2005; Heng-Moss et al., 2004; Vontas et al., 2001). A regulação positiva de muitas dessas enzimas antioxidantes em resposta a inseticidas é responsável pela resistência de várias espécies de insetos (Coleman et al., 2002; Hemingway & Karunaratne, 1998; Vontas et al., 2001). A adaptação de insetos-praga aos IPs atraiu pesquisadores para entender as respostas bioquímicas envolvidas e projetar melhores abordagens para o uso de IPs como pesticidas (BOLTER; JONGSMA, 1995; BRIOSCHI et al., 2007).

O contraste estabelecido entre os dois IPs estudados foi importante porque SKTI é uma proteína natural de *Glycine max*, principal fonte alimentar de *A. gemmatalis*. Ao longo da coevolução entre a planta e o inseto, a expressão de IPs teve como objetivo mitigar a herbivoria (JONGSMA; BOLTER, 1997); por outro lado, a lagarta desenvolveu estratégias para vencer o sistema de defesa da planta. As respostas fisiológicas versáteis exibidas pelo inseto facilitaram sua adaptação à defesa da planta baseada em PI. Esse desempenho foi evidenciado em nossos resultados quando *A. gemmatalis* respondeu de forma mais eficiente ao IP natural de soja (ou seja, SKTI). Isso sugere que a dificuldade em recrutar enzimas antioxidantes em lagartas alimentadas com GORE2 torna a lagarta mais suscetível. Consequentemente, IPs não vegetais podem ser explorados como uma medida mais eficaz para evitar as adaptações coevolutivas específicas na interação planta-praga (HARSULKAR et al., 1999). Parte do desafio enfrentado no desenvolvimento de inseticidas eficientes baseia-se na busca de moléculas que causem danos fisiológicos e sejam neutralizadas com baixa eficiência pelo sistema de defesa do organismo alvo.

Estudos anteriores relataram uma forte correlação entre a expressão do gene CAT e longevidade em *Drosophila melanogaster* (ORR; SOHAL, 1994). Diminuição da atividade CAT ou interrupção da expressão do gene CAT levou à morte após a eclosão (GRISWOLD et al., 1993; ORR; SOHAL, 1994). POX também foi responsável por aumentar a tolerância ao estresse em insetos (MITTLER; POULOS, 2007). Vários inseticidas convencionais, especialmente organofosforados, organoclorados e piretróides, são conhecidos por diminuir as

atividades de enzimas como SOD (BÜYÜKGÜZEL, 2009), GST (COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; PAPADOPOULOS et al., 2004; WU et al., 2009) e CAT (SOWJANYA SREE et al., 2010). Insetos resistentes a essas inseticidas apresentam atividade aumentada de enzimas antioxidantes (COLEMAN; VONTAS; HEMINGWAY, 2002; ISHAAYA; CASIDA, 1974). Portanto, analisar o potencial inibitório de um IP é muito importante quando se considera um projeto racional. Mas isso é apenas a ponta do iceberg. É importante que os IPs modifiquem o sistema de defesa do inseto para minimizar o surgimento de populações resistentes.

Além de burlar os mecanismos de defesa do inseto, o GORE2 causou danos mais significativos ao intestino médio do inseto quando comparado ao SKTI. Alterações semelhantes na morfologia celular, como o aumento da vacuolização em tratamentos contendo IP, foram apontadas por outros estudos que utilizaram inseticidas convencionais (FIAZ et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018). O aumento da atividade secretora também foi relatado no intestino médio de *A. gemmatalis* (FIAZ et al., 2018) e em larvas de *Aedes aegypti* (Gaban et al., 2015) quando tratadas com inseticidas. Essa intensa vacuolização foi observada em *A. gemmatalis* tratada com tebufenozida, um inseticida que mimetiza o hormônio ecdisona (BEAULATON; LOCKSHIN, 1977; ROMANELLI et al., 2014).

A presença de vacúolos nas células do intestino médio é comum em insetos (ALVES; SERRÃO; MELO, 2010; FERNANDES et al., 2015), mas seu número aumentado no citoplasma por causa de inseticidas tem sido caracterizado como um precedente de autofagia (HARIRI et al., 2000; SANTOS et al., 2015). Os muitos vacúolos citoplasmáticos observados e a desorganização da borda estriada no intestino médio de *A. gemmatalis* são semelhantes às alterações observadas em Lepidoptera e Diptera quando desafiados com *B. thuringiensis* (LOEB et al., 2001; MATHAVAN; SUDHA; PECHIMUTHU, 1989; REY et al., 1998), sugerindo uma resposta de desintoxicação ao estressor e início do processo de morte celular (DOS SANTOS et al., 2015). Estresses como a diminuição de aminoácidos livres causados pela ação imediata do IP, estresse oxidativo, danos ao DNA causados por ROS e células danificadas podem ativar a via de autofagia (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010).

As desorganizações morfológicas no lúmen do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com GORE2 sugerem um efeito citotóxico deste IP, que pode causar apoptose (IHARA et al., 1998). A eliminação das células por morte seria, portanto, uma resposta ao dano às células epiteliais do intestino médio após 24 h da ingestão do IP. A apoptose é fundamental para muitos processos biológicos importantes (OTTAVIANI; MALAGOLI, 2016) como desenvolvimento, homeostase tecidual, resposta a danos no DNA (AMUNDSON; MYERS; FORNACE, 1998) e resposta imune (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003). Danos

ao sistema digestivo do inseto por toxinas que ativam respostas defensivas também culminaram em apoptose em *Heliothis virescens* (FORCADA et al., 1999; MARTÍNEZ-RAMÍREZ; GOULD; FERRÉ, 1999).

As enzimas antioxidantes compõem as defesas que mantêm o equilíbrio das ROS nas células normais. A redução na atividade de CAT, POX, SOD e GST pode levar ao acúmulo de ROS, resultando em apoptose celular (Jacobson, 1996; Wertz & Hanley, 1996). A produção de ROS leva à peroxidação dos lipídios da membrana na presença de oxigênio (SLATER, 1984) e os peróxidos lipídicos formados são metabolizados pela GST em insetos (AHMAD et al., 1991; KONNO; SHISHIDO, 1992).

Portanto, o dano histológico mais intenso observado em lagartas alimentadas com GORE2 pode ser explicado pela baixa resposta do inseto a esta enzima antioxidante. Impacto celular no intestino médio foi relatado para *Alabama argillacea* (SOUSA et al., 2010) e *Plutella xylostella* (DA SOLIDADE RIBEIRO et al., 2013) similarmente após a exposição a inseticidas.

Portanto, o fato de o tripeptídeo desencadear uma menor resposta das enzimas antioxidantes não significa que esse IP poupe o inseto. Pelo contrário, o GORE2 causa danos mais graves à lagarta, provocando menor ativação de vias de desintoxicação do inseto.

Até o momento, não existem plantas transgênicas comercialmente disponíveis expressando IPs, mas o uso de pequenos peptídeos pode ter vantagens em larga escala. Além das vantagens adaptativas contornadas pelo tripeptídeo, seu tamanho reduzido torna a produção economicamente viável para pulverização e bioenergeticamente favorável para expressão localizada em plantas geneticamente modificadas. Essa abordagem pode representar uma mudança de paradigma no desenvolvimento de novos agroquímicos ecologicamente corretos.

5. CONCLUSÃO

O trabalho avaliou os danos causados por dois IPs em três níveis: expressão gênica diferencial, estresse oxidativo através de enzimas-chave e de uma perspectiva morfológica intestinal. A presença de IP na dieta de *A. gemmatalis* causou modulação de genes importantes relacionados à resistência do inseto, estresse oxidativo e alterações histológicas no intestino médio do inseto. Além disso, o GORE2 gerou um estresse oxidativo menos intenso que o SKTI, mas um dano morfológico mais intenso. Nesse sentido, o tripeptídeo GORE2 apresenta-se como uma alternativa eficiente no controle deste Lepidoptera.

REFERÊNCIAS

AEBI, Hugo. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 105, n. C, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>. Acesso em: 9 fev. 2022.

AHMAD, S. A.; HOPKINS, T. L. β -Glucosylation of plant phenolics by phenol β -glucosyltransferase in larval tissues of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 581–589, 1993. DOI: 10.1016/0965-1748(93)90031-M.

AHMAD, Sami; DUVAL, Dawn L.; WEINHOLD, Leanne C.; PARDINI, Ronald S. Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity. **Insect Biochemistry**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 563–572, 1991. DOI: 10.1016/0020-1790(91)90111-Q.

AHN, Seung Joon; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 133–147, 2012. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.11.006.

ALI, A.; RASHID, M. A.; HUANG, Q. Y.; WONG, C.; LEI, C. L. Response of antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to thermal stress. **Bulletin of Entomological Research**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. 382–390, 2017. a. DOI: 10.1017/S0007485316001000. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/abs/response-of-antioxidant-enzymes-in-mythimna-separata-lepidoptera-noctuidae-exposed-to-thermal-stress/66668A0318DBEBA1A7F26EE218E2CA0A>. Acesso em: 11 mar. 2022.

ALI, Arif; RASHID, Muhammad Adnan; HUANG, Qiu Ying; LEI, Chao Liang. Influence of UV-A radiation on oxidative stress and antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 8392–8398, 2017. b. DOI: 10.1007/s11356-017-8514-7. Disponível em: <https://europemc.org/article/med/28185177>. Acesso em: 21 out. 2021.

ALTSCHUL, Stephen F.; GISH, Warren; MILLER, Webb; MYERS, Eugene W.; LIPMAN, David J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

ALTUNTAŞ, H. Determination of gibberellic acid (GA3)-induced oxidative stress in a model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 100–105, 2015. DOI: 10.1093/ee/nvu020. Disponível em: <https://academic.oup.com/ee/article/44/1/100/2464823>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ALTUNTAS, Irfan; DELIBAS, N.; SUTCU, R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: Role of vitamins E and C. **Human and Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 681–685, 2002. DOI: 10.1191/0960327102ht304oa. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1191/0960327102ht304oa>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ALVES, Stênio Nunes; SERRÃO, José Eduardo; MELO, Alan Lane. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. **Micron**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 592–597, 2010. DOI: 10.1016/j.micron.2010.04.004.

AMUNDSON, Sally A.; MYERS, Timothy G.; FORNACE, Albert J. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: Putting on the brakes after genotoxic stress. **Oncogene**, [S. l.], v. 17, n. 25, p. 3287–3299, 1998. DOI: 10.1038/sj.onc.1202576. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1202576>. Acesso em: 13 abr. 2022.

AUCOIN, Richard R.; PHILOGÈNE, Bernard J. R.; ARNASON, John T. Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous lepidoptera. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 139–152, 1991. DOI: 10.1002/arch.940160206. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.940160206>. Acesso em: 18 nov. 2021.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, [S. l.], v. 104, n. 1–3, p. 129–140, 1995. DOI: 10.1016/0300-483X(95)03156-A.

BAYÉS, Alex; DE LA VEGA, Mónica Rodríguez; VENDRELL, Josep; AVILES, Francesc X.; JONGSMA, Maarten A.; BEEKWILDER, Jules. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 654–664, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.05.010.

BEAULATON, Jacques; LOCKSHIN, Richard A. Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, lepidoptera) with particular reference to cellular autophagy. **Journal of Morphology**, [S. l.], v. 154, n. 1, p. 39–57, 1977. DOI: 10.1002/jmor.1051540104. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmor.1051540104>. Acesso em: 13 abr. 2022.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BOLTER, Caroline J.; JONGSMA, Maarten A. Colorado potato beetles (*leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 1071–1078, 1995. DOI: 10.1016/0022-1910(95)00073-4.

BOWN, David P.; WILKINSON, Hillary S.; GATEHOUSE, John 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**, [S. l.], v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 278–290, 2004. DOI: 10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x>. Acesso em: 10 jun. 2022.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.

BRAY, Nicolas L.; PIMENTEL, Harold; MELSTED, Páll; PACHTER, Lior. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 525–527, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3519. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.3519>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BRIOSCHI, Daniela; NADALINI, Larissa D.; BENGTON, Mario H.; SOGAYAR, Mari

Cleide; MOURA, Daniel S.; SILVA-FILHO, Marcio C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 1283–1290, 2007. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.07.016. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174807001919>. Acesso em: 24 mar. 2022.

BUENO, Adeney de Freitas; BATISTELA, Marcelo José; BUENO, Regiane Cristina Oliveira de Freitas; FRANÇA-NETO, José de Barros; NAIME NISHIKAWA, Marcelo Akita; FILHO, Adeone Libério. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. **Crop Protection**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 937–945, 2011. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.02.021.

BULL, Don L.; WHITTEN, Chandler J. Factors Influencing Organophosphorus Insecticide Resistance in Tobacco Budworms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 561–564, 1972. DOI: 10.1021/jf60181a061. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60181a061>. Acesso em: 10 jun. 2022.

BÜYÜKGÜZEL, Ender. Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 152–159, 2009. DOI: 10.1603/029.102.0122. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/102/1/152/2199106>. Acesso em: 25 mar. 2022.

BÜYÜKGÜZEL, Ender; HYRŠL, Pavel; BÜYÜKGÜZEL, Kemal. Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 156, n. 2, p. 176–183, 2010. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.01.020.

CAMPOS, Estefânia V. R.; PROENÇA, Patrícia L. F.; OLIVEIRA, Jhones L.; BAKSHI, Mansi; ABHILASH, P. C.; FRACETO, Leonardo F. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 105, n. July 2017, p. 483–495, 2019. DOI: 10.1016/j.ecolind.2018.04.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>.

CHEN, Haoliang; XIE, Minghui; LIN, Lulu; ZHONG, Yongzhi; ZHANG, Feng; SU, Weihua. Transcriptome Analysis of Detoxification-Related Genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science**, [S. l.], v. 22, n. 1, 2022. DOI:

10.1093/jisesa/ieab108. Disponível em:
<https://academic.oup.com/jinsectscience/article/22/1/11/6520543>. Acesso em: 10 jun. 2022.

CHEN, Shi; ELZAKI, Mohammed Esmail Abdalla; DING, Chaohui; LI, Zheng fang; WANG, Jie; ZENG, Ren Sen; SONG, Yuan Yuan. Plant allelochemicals affect tolerance of polyphagous lepidopteran pest *Helicoverpa armigera* (Hübner) against insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 154, p. 32–38, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.12.009.

CHEN, Yuxin et al. SOAPnuke: A MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. **GigaScience**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–6, 2018. DOI: 10.1093/gigascience/gix120. Disponível em: <https://academic.oup.com/gigascience/article/7/1/gix120/4689118>. Acesso em: 7 jun. 2022.

CHOUGULE, Nanasaheb P.; DOYLE, Emily; FITCHES, Elaine; GATEHOUSE, John A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 563–572, 2008. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2007.12.005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18241882>. Acesso em: 31 mar. 2021.

COELHO, M.; GODOY, A. F.; BAPTISTA, Y. A.; BENTIVENHA, J. P. F.; LOURENÇÃO, A. L.; BALDIN, E. L. L.; CATCHOT, A. L. Assessing soybean genotypes for resistance to *helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 113, n. 1, p. 471–481, 2020. DOI: 10.1093/jee/toz269. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/113/1/471/5588651>.

COLEMAN, Michael; VONTAS, John G.; HEMINGWAY, Janet. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 269, n. 3, p. 768–779, 2002. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02682.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.0014-2956.2001.02682.x>. Acesso em: 25 mar. 2022.

CONESA, Ana et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–19, 2016. DOI: 10.1186/s13059-016-0881-8. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-0881-8>. Acesso em: 10 jun. 2022.

CONESA, Ana; GÖTZ, Stefan; GARCÍA-GÓMEZ, Juan Miguel; TEROL, Javier; TALÓN, Manuel; ROBLES, Montserrat. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti610. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/21/18/3674/202517>. Acesso em: 4 fev. 2022.

COSSIO-BAYUGAR, Raquel; BARHOUMI, Rola; BURGHARDT, Robert C.; WAGNER, G. Gale; HOLMAN, Patricia J. Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione S-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 1–9, 2002. DOI: 10.1006/pest.2001.2578.

COURA, Roberta Ribeiro et al. Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors. **Annals of Applied Biology**, [S. l.], v. 180, n. 3, p. 383–397, 2022. DOI: 10.1111/aab.12740. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aab.12740>. Acesso em: 18 nov. 2021.

CREAGH, Emma M.; CONROY, Helen; MARTIN, Seamus J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 193, p. 10–21, 2003. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2003.00048.x.

DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; DE OLIVEIRA, Eugênio E.; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. e21631, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21631>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DA SOLIDADE RIBEIRO, Lílian Maria; WANDERLEY-TEIXEIRA, Valéria; DE SIQUEIRA, Herbert Álvaro Abreu; DE OLIVEIRA, Andresa Cristina Batista; LEMOS, Ana Janaína Jeanine Martins; TEIXEIRA, Álvaro Aguiar Coelho. Midgut histopathology of resistant and susceptible *Plutella xylostella* exposed to commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Bulletin of Insectology**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 162–168, 2013. Disponível em: www.bulletinofinsectology.org. Acesso em: 13 abr. 2022.

DE ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; DA SILVA JÚNIOR, Neilier R.; DE OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V.; RAMOS, Humberto J. O.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6191>. Acesso em: 31 mar. 2021.

DHANIA, Narender K.; CHAUHAN, Vinod K.; CHAITANYA, R. K.; DUTTA-GUPTA, Aparna. Midgut de novo transcriptome analysis and gene expression profiling of *Achaea janata* larvae exposed with *Bacillus thuringiensis* (Bt)-based biopesticide formulation. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, [S. l.], v. 30, p. 81–90, 2019. DOI: 10.1016/j.cbd.2019.02.005.

DING, Yunchuan; HAWKES, Nicola; MEREDITH, Janet; EGGLESTON, Paul; HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 387, n. 3, p. 879–888, 2005. DOI: 10.1042/BJ20041850. Disponível em: [/biochemj/article/387/3/879/44323/Characterization-of-the-promoters-of-Epsilon](https://www.biochemj.org/article/387/3/879/44323/Characterization-of-the-promoters-of-Epsilon). Acesso em: 6 maio. 2022.

DMOCHOWSKA-ŚLĘZAK, Kamila; GIEJDASZ, Karol; FLISZKIEWICZ, Monika; ŻÓŁTOWSKA, Krystyna. Variations in antioxidant defense during the development of the solitary bee *Osmia bicornis*. **Apidologie**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 432–444, 2015. DOI: 10.1007/s13592-014-0333-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-014-0333-y>. Acesso em: 8 abr. 2022.

DOS SANTOS, M. C.; RESENDE JUNQUEIRA, A. M.; MENDES DE SÁ, V. G.; ZANÚNCIO, J. C.; SERRÃO, José Eduardo. **Effect of silicon on the morphology of the midgut and mandible of tomato leafminer *tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae**. 2015. Disponível em: <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/356>. Acesso em: 13 abr. 2022.

DUBOVSKIY, I. M.; MARTEMYANOV, V. V.; VORONTSOVA, Y. L.; RANTALA, M. J.; GRYZANOVA, E. V.; GLUPOV, V. V. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae).

Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, [S. l.], v. 148, n. 1, p. 1–5, 2008. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.02.003.

EMRE, Iskender; KAYIS, Tamer; COSKUN, Mustafa; DURSUN, Osman; COGUN, Hikmet Yeter. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated galleria mellonella larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 371–377, 2013. DOI: 10.1603/AN12137. Disponível em: <https://academic.oup.com/aesa/article/106/3/371/90679>. Acesso em: 8 abr. 2022.

EWELS, Philip; MAGNUSSON, Måns; LUNDIN, Sverker; KÄLLER, Max. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/19/3047/2196507>. Acesso em: 7 jun. 2022.

FARAHANI, Saeed; BANDANI, Ali R.; ALIZADEH, Houshang; GOLDANSAZ, Seyed Hossein; WHYARD, Steven. Differential expression of heat shock proteins and antioxidant enzymes in response to temperature, starvation, and parasitism in the Carob moth larvae, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. e0228104, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228104. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0228104>. Acesso em: 18 nov. 2021.

FELTON, Gary W.; SUMMERS, Clinton B. Antioxidant systems in insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 187–197, 1995. DOI: 10.1002/arch.940290208. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.940290208>. Acesso em: 8 abr. 2022.

FERNANDES, K. M.; GONZAGA, W. G.; PASCINI, T. V.; MIRANDA, F. R.; TOMÉ, H. V. V.; SERRÃO, J. E.; MARTINS, G. F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). **Medical and Veterinary Entomology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 245–254, 2015. DOI: 10.1111/mve.12122. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mve.12122>. Acesso em: 13 abr. 2022.

FIAZ, Muhammad; MARTÍNEZ, Luis Carlos; COSTA, Marilza da Silva; COSSOLIN, Jamile Fernanda Silva; PLATA-RUEDA, Angelica; GONÇALVES, Wagner Gonzaga; SANT’ANA,

Antônio Euzébio Goulart; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 156, n. March, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.080. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.080>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FINN, Robert D. et al. Pfam: The protein families database. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 42, n. D1, p. D222–D230, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1223. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/42/D1/D222/1062431>. Acesso em: 7 jun. 2022.

FINN, Robert D.; CLEMENTS, Jody; ARNDT, William; MILLER, Benjamin L.; WHEELER, Travis J.; SCHREIBER, Fabian; BATEMAN, Alex; EDDY, Sean R. HMMER web server: 2015 Update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. W1, p. W30–W38, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv397. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/43/W1/W30/2467897>. Acesso em: 7 jun. 2022.

FORCADA, Carmen; ALCÁCER, Encarna; GARCERÁ, Ma Dolores; TATO, Agustín; MARTÍNEZ, Rafael. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 51–63, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(199909)42:1<51::AID-ARCH6>3.0.CO;2-6.

FOYER, C. H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell & Environment**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 507–523, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1994.tb00146.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00146.x>. Acesso em: 8 abr. 2022.

FRANCO, Octávio L.; DIAS, Simoni C.; MAGALHÃES, Claudio P.; MONTEIRO, Ana C. S.; BLOCH, Carlos; MELO, Francislete R.; OLIVEIRA-NETO, Osmundo B.; MONNERAT, Rose G.; GROSSI-DE-SÁ, Maria Fátima. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 81–89, 2004. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.09.010.

FU, Limin; NIU, Beifang; ZHU, Zhengwei; WU, Sitao; LI, Weizhong. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 28, n. 23, p. 3150–

3152, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts565. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/23/3150/192160>. Acesso em: 7 jun. 2022.

GABAN, Cleusa Rocha Garcia; ARRUDA, Eduardo José De; DOURADO, Doroty Mesquita; SILVA, Lilliam May Grespan E. Da; VILA NOVA, Paulo César Cavalcante; CABRINI, Isafas. Morphological Changes in the Digestive System of *Aedes aegypti* L. Induced by [Cu(EDTA)]²⁻ Complex Ions. **Journal of Mosquito Research**, [S. l.], 2015. DOI: 10.5376/jmr.2015.05.0021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/308815082>. Acesso em: 13 abr. 2022.

GAZARA, Rajesh K.; CARDOSO, Christiane; BELLIENY-RABELO, Daniel; FERREIRA, Clélia; TERRA, Walter R.; VENANCIO, Thiago M. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of midgut tissues of four non-model insects pertaining to Hemiptera, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. **Gene**, [S. l.], v. 627, p. 85–93, 2017. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111917304596>. Acesso em: 10 jun. 2022.

GONÇALVES, Wagner Gonzaga; FERNANDES, Kenner Morais; SANTANA, Weyder Cristiano; MARTINS, Gustavo Ferreira; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Post-embryonic development of the Malpighian tubules in *Apis mellifera* (Hymenoptera) workers: morphology, remodeling, apoptosis, and cell proliferation. **Protoplasma**, [S. l.], v. 255, n. 2, p. 585–599, 2018. DOI: 10.1007/s00709-017-1171-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-017-1171-3>. Acesso em: 13 abr. 2022.

GRABHERR, Manfred G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011. DOI: 10.1038/nbt.1883. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.1883>. Acesso em: 31 mar. 2021.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 487–488, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/69/4/487/2212175>. Acesso em: 31 mar. 2021.

GRISWOLD, C. M.; MATTHEWS, A. L.; BEWLEY, K. E.; MAHAFFEY, J. W. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, [S.

l.], v. 134, n. 3, p. 781–788, 1993. DOI: 10.1093/genetics/134.3.781. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/134/3/781/6009305>. Acesso em: 8 abr. 2022.

HAAS, Brian J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, [*S. l.*], v. 8, n. 8, p. 1494–1512, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.084. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2013.084>. Acesso em: 7 jun. 2022.

HARIRI, Mehrdad; MILLANE, Ghania; GUIMOND, Marie Pierre; GUAY, Ginette; DENNIS, James W.; NABI, Ivan R. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, [*S. l.*], v. 11, n. 1, p. 255–268, 2000. DOI: 10.1091/mbc.11.1.255. Disponível em: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.11.1.255>. Acesso em: 13 abr. 2022.

HARSULKAR, Abhay M.; GIRI, Ashok P.; PATANKAR, Aparna G.; GUPTA, Vidya S.; SAINANI, Mohini N.; RANJEKAR, Prabhakar K.; DESHPANDE, Vasanti V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. **Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 121, n. 2, p. 497–506, 1999. DOI: 10.1104/pp.121.2.497. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/121/2/497/6096195>. Acesso em: 24 mar. 2022.

HE, Falin; SUN, Shiang; TAN, Haili; SUN, Xiao; QIN, Chao; JI, Shoumin; LI, Xiangdong; ZHANG, Jiwang; JIANG, Xingyin. Chlorantraniliprole against the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): From biochemical/physiological to demographic responses. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46915-0.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. P. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, [*S. l.*], v. 12, n. 1, p. 1–12, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/9513933>. Acesso em: 25 mar. 2022.

HENG-MOSS, Tiffany; SARATH, Gautam; BAXENDALE, Frederick; NOVAK, Dana; BOSE, Shauna; XINHI, N. I.; QUISENBERRY, Sharron. Characterization of oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. **Journal of Economic Entomology**, [*S. l.*], v. 97, n. 3, p. 1086–1095, 2004. DOI: 10.1093/jee/97.3.1086. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jee/article/97/3/1086/2218140>. Acesso em: 6 maio. 2022.

HOROWITZ, A. Rami; GHANIM, Murad; RODITAKIS, Emmanouil; NAUEN, Ralf; ISHAAYA, Isaac. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. **Journal of Pest Science**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 893–910, 2020. DOI: 10.1007/s10340-020-01210-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-020-01210-0>. Acesso em: 24 nov. 2021.

HUERTA-CEPAS, Jaime et al. EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. D1, p. D286–D293, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1248. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/44/D1/D286/2503059>. Acesso em: 7 jun. 2022.

HUERTA-CEPAS, Jaime; FORSLUND, Kristoffer; COELHO, Luis Pedro; SZKLARCZYK, Damian; JENSEN, Lars Juhl; VON MERING, Christian; BORK, Peer. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 2115–2122, 2017. DOI: 10.1093/molbev/msx148. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article/34/8/2115/3782716>. Acesso em: 7 jun. 2022.

IHARA, Tomomi; YAMAMOTO, Tsukiko; SUGAMATA, Masao; OKUMURA, Hiroki; UENO, Yoshio. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. **Virchows Archiv**, [S. l.], v. 433, n. 5, p. 443–447, 1998. DOI: 10.1007/s004280050272. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004280050272>. Acesso em: 13 abr. 2022.

ISHAAYA, Isaac; CASIDA, John E. Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 484–490, 1974. DOI: 10.1016/0048-3575(74)90073-X.

JACOBSON, Michael D. Reactive oxygen species and programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 83–86, 1996. DOI: 10.1016/S0968-0004(96)20008-8.

JAHAN, Fatima N.; RAHMAN, Mohammad S.; HOSSAIN, Mahboob; RASHID, Mohammad A. Antimicrobial activity and toxicity of *Quisqualis indica*. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 53–58, 2008. DOI: 10.3742/opem.2008.8.1.053.

Disponível em: www.opem.orgOPEM. Acesso em: 16 nov. 2021.

JIA, Fu Xian; DOU, Wei; HU, Fei; WANG, Jin Jun. Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 956–963, 2011. DOI: 10.1653/024.094.0432. Disponível em: <https://bioone.org/journals/florida-entomologist/volume-94/issue-4/024.094.0432/Effects-of-Thermal-Stress-on-Lipid-Peroxidation-and-Antioxidant-Enzyme/10.1653/024.094.0432.full>. Acesso em: 11 mar. 2022.

JONGSMA, Maarten A.; BAKKER, Petra L.; PETERS, Jeroen; BOSCH, Dirk; STIEKEMA, Willem J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 92, n. 17, p. 8041–8045, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.17.8041. Disponível em: <https://www.pnas.org>. Acesso em: 8 abr. 2022.

JONGSMA, Maarten A.; BOLTER, Caroline. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 885–895, 1997. DOI: 10.1016/S0022-1910(97)00040-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191097000401>. Acesso em: 31 mar. 2021.

KARTHI, Sengodan; SANKARI, R.; SHIVAKUMAR, Muthugounder S. Ultraviolet-B light induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Spodoptera litura*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 135, p. 1–6, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.04.008.

KATO, S.; NAITO, Z. Glutathione S-transferase. **Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, [S. l.], v. 57 Suppl, n. 22, p. 451–453, 1999. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)42083-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819420838>. Acesso em: 4 fev. 2022.

KAYIS, T.; COSKUN, M.; DURSUN, O.; EMRE, I. Alterations in Antioxidant Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and Ion Balance Induced by Dichlorvos in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [S. l.], v. 108, n. 4, p. 570–574, 2015. DOI: 10.1093/aesa/sav038. Disponível em: <https://academic.oup.com/aesa/article/108/4/570/72622>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KONANZ, Stefanie; NAUEN, Ralf. Purification and partial characterization of a glutathione

S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 49–57, 2004. DOI: 10.1016/j.pestbp.2004.03.004.

KONNO, Yasuhiko; SHISHIDO, Takashi. Distribution of Glutathione S-transferase Activity in Insect Tissues. **Applied Entomology and Zoology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 391–397, 1992. DOI: 10.1303/aez.27.391.

KREMPL, Corinna; SPORER, Theresa; REICHEL, Michael; AHN, Seung Joon; HEIDELFISCHER, Hanna; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G.; JOUSSEN, Nicole. Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 71, p. 49–57, 2016. DOI: 10.1016/j.ibmb.2016.02.005.

KROEMER, Guido; MARIÑO, Guillermo; LEVINE, Beth. Autophagy and the Integrated Stress Response. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.

LANGMEAD, Benjamin Thomas. **Highly Scalable Short Read Alignment with the Burrows-Wheeler Transform and Cloud Computing**. [s.l.] : University of Maryland, College Park, 2009. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/3dbe4cf8c99e49308a6f6b5e7bd4934e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>. Acesso em: 7 jun. 2022.

LEDIRAC, Nathalie; ANTHERIEU, Sebastian; D'UBY, Anne Dupuy; CARON, Jean Claude; RAHMANI, Roger. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: Key role of reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 86, n. 2, p. 444–452, 2005. DOI: 10.1093/toxsci/kfi192. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/86/2/444/1653598>. Acesso em: 2 fev. 2022.

LEVY, Sheila M.; FALLEIROS, Ângela M. F.; MOSCARDI, Flávio; GREGÓRIO, Elisa A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 183–186, 2007. DOI: 10.1016/j.jip.2007.04.007.

LI, Mao Ye; TU, Xiao Hui; CAO, Ye; LI, Shi Guang; LIU, Su. Characterisation of a copper/zinc superoxide dismutase from *Pieris rapae* and its role in protecting against oxidative stress induced by chlorantraniliprole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 174, p.

104825, 2021. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104825.

LIJUN, Li; XUEMEI, Liu; YAPING, Guo; ENBO, Ma. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 412–416, 2005. DOI: 10.1016/j.etap.2005.04.001.

LIMA, Ana T.; BASTOS, Felipe A.; TEUBNER, Fernando Jakes; NETO, Renato R.; COOPER, Andrew; BARROSO, Gilberto F. Strengths and Weaknesses of a Hybrid Post-disaster Management Approach: the Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. **Environmental Management**, Department of Biochemistry, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Ramat Aviv 69978, Israel. DOI - 10.1093/nar/gki370 SRC - Pubmed ID2 - 15980475 FG - 0, v. 65, n. 6, p. 711–724, 2020. DOI: 10.1007/s00267-020-01279-4. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008000700003&lng=en&tlng=en. Acesso em: 31 mar. 2021.

LINDROTH, Richard L.; ANSON, Blake D.; WEISBROD, Anne V. Effects of protein and juglone on gypsy moths: Growth performance and detoxification enzyme activity. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 2533–2547, 1990. DOI: 10.1007/BF01017476. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01017476>. Acesso em: 8 abr. 2022.

LOEB, Marcia J.; MARTIN, Phyllis A. W.; HAKIM, Razi S.; GOTO, Shintaro; TAKEDA, Makio. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 599–606, 2001. DOI: 10.1016/S0022-1910(00)00150-5.

LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, [S. l.], v. 15, n. 12, 2014. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.

ŁUKASIK, Iwona; GOŁAWSKA, Sylwia; WÓJCICKA, Agnieszka. Antioxidant defense mechanisms of cereal aphids based on ascorbate and ascorbate peroxidase. **Biologia**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 994–998, 2009. DOI: 10.2478/s11756-009-0164-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-009-0164-x>. Acesso em: 8 abr. 2022.

MAO, Tingting et al. Induction of ER stress, antioxidant and detoxification response by sublethal doses of chlorantraniliprole in the silk gland of silkworm, *Bombyx mori*. **Pesticide**

Biochemistry and Physiology, [S. l.], v. 170, p. 104685, 2020. DOI: 10.1016/j.pestbp.2020.104685.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, Amparo C.; GOULD, Fred; FERRÉ, Juan. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 239–246, 1999. DOI: 10.1080/09583159929811. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159929811>. Acesso em: 13 abr. 2022.

MATHAVAN, S.; SUDHA, P. M.; PECHIMUTHU, S. M. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: A histopathological and histochemical study. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 217–227, 1989. DOI: 10.1016/0022-2011(89)90010-4.

MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G. G.; REITER, R. J.; SEWERYNEK, E.; DANIELS, W. M. U.; PABLOS, M. I.; NISTICÒ, G. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 103–108, 1998. DOI: 10.1016/S0378-4274(98)00025-3.

MENG, Jian Yu; ZHANG, Chang Yu; ZHU, Fen; WANG, Xiao Ping; LEI, Chao Liang. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 588–592, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.03.003.

MITTLER, Ron; POULOS, Thomas L. Ascorbate Peroxidase. **Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants**, [S. l.], p. 87–100, 2007. DOI: 10.1002/9780470988565.ch4.

MÜLLER, Caroline. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects — Facts and knowledge gaps. **Basic and Applied Ecology**, [S. l.], v. 30, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1016/j.baae.2018.05.001.

MUNDAY, Rex; WINTERBOURN, Christine C. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 38, n. 24, p. 4349–4352, 1989. DOI: 10.1016/0006-2952(89)90641-2.

NANOTH VELLICHIRAMMAL, Neetha; WANG, Haichuan; EYUN, Seong Il; MORIYAMA, Etsuko N.; COATES, Brad S.; MILLER, Nicholas J.; SIEGFRIED, Blair D. Transcriptional analysis of susceptible and resistant European corn borer strains and their response to Cry1F protoxin. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-1751-6. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1751-6>. Acesso em: 10 jun. 2022.

NAVARRO-ROLDÁN, M. A.; BOSCH, D.; GEMENO, C.; SIEGWART, M. Enzymatic detoxification strategies for neurotoxic insecticides in adults of three tortricid pests. **Bulletin of Entomological Research**, [S. l.], v. 110, n. 1, p. 144–154, 2020. DOI: 10.1017/S0007485319000415. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/abs/enzymatic-detoxification-strategies-for-neurotoxic-insecticides-in-adults-of-three-tortricid-pests/A692780A3EE4C219163844CB09FD3C60>. Acesso em: 21 out. 2021.

NELSON, David R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1814, n. 1, p. 14–18, 2011. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.08.008.

ORR, William C.; SOHAL, Rajindar S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. **Science**, [S. l.], v. 263, n. 5150, p. 1128–1130, 1994. DOI: 10.1126/science.8108730. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.8108730>. Acesso em: 8 abr. 2022.

OTTAVIANI, Enzo; MALAGOLI, Davide. Cell Death Pathways in an Unconventional Invertebrate Model. **Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals**, [S. l.], p. 17–27, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-803252-7.00002-3.

PANIZZI, A. R. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 119–127, 2013. DOI: 10.1007/s13744-013-0111-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-013-0111-y>. Acesso em: 30 set. 2021.

PAPADOPOULOS, Athanasios I.; POLEMITOU, Irene; LAIFI, Pshychoula; YIANGOU, Astero; TANANAKI, Chrysoula. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera*

macedonica: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 139, n. 1–3, p. 93–97, 2004. DOI: 10.1016/j.cca.2004.09.010.

PARK, Jiyeong; STANLEY, David; KIM, Yonggyun. Roles of peroxinectin in PGE2-mediated cellular immunity in *spodoptera exigua*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e105717, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0105717. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105717>. Acesso em: 4 maio. 2022.

PAULA, Débora Pires; ANDOW, David A.; TIMBÓ, Renata Velozo; SUJII, Edison R.; PIRES, Carmen S. S.; FONTES, Eliana M. G. Uptake and transfer of a Bt toxin by a lepidoptera to its eggs and effects on its offspring. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. e95422, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095422. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095422>. Acesso em: 29 out. 2021.

PERERA, Omaththage P.; SHELBY, Kent S.; POPHAM, Holly J. R.; GOULD, Fred; ADANG, Michael J.; JURAT-FUENTES, Juan Luis. Generation of a transcriptome in a model lepidopteran pest, *Heliothis virescens*, using multiple sequencing strategies for profiling midgut gene expression. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e0128563, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128563. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128563>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PERIĆ-MATARUGA, Vesna; ILIJIN, Larisa; MRDAKOVIĆ, Marija; TODOROVIĆ, Dajana; PROKIĆ, Marko; MATIĆ, Dragana; VLAHOVIĆ, Milena. Parameters of oxidative stress, cholinesterase activity, Cd bioaccumulation in the brain and midgut of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars from unpolluted and polluted forests. **Chemosphere**, [S. l.], v. 218, p. 416–424, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.112. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518322197>. Acesso em: 11 mar. 2022.

PISKORSKI, Rafal; INEICHEN, Simon; DORN, Silvia. Ability of the Oriental Fruit Moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to Detoxify Juglone, the Main Secondary Metabolite of the Non-host Plant Walnut. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 1110–1116, 2011. DOI: 10.1007/s10886-011-0015-4. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-011-0015-4>. Acesso em: 8 abr. 2022.

PONTUAL, Emmanuel Viana; NAPOLEÃO, Thiago Henrique; DIAS DE ASSIS, Caio Rodrigo; DE SOUZA BEZERRA, Ranilson; XAVIER, Haroudo Satiro; NAVARRO, Daniela Maria do Amaral Ferraz; COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso; PAIVA, Patrícia Maria Guedes. Effect of moringa oleifera flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in aedes aegypti. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 135–152, 2012. DOI: 10.1002/arch.21012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21012>. Acesso em: 9 nov. 2021.

POTTIER, M. A.; BOZZOLAN, F.; CHERTEMPS, T.; JACQUIN-JOLY, E.; LALOUETTE, L.; SIAUSSAT, D.; MAÏBÈCHE-COISNE, M. Cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in the olfactory organ of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 568–580, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2012.01160.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2012.01160.x>. Acesso em: 10 jun. 2022.

REY, D.; LONG, A.; PAUTOU, M. P.; MEYRAN, J. C. Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems, after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 255–263, 1998. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1998.00370.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1570-7458.1998.00370.x>. Acesso em: 6 maio. 2022.

ROMANELLI, Davide; CASATI, Barbara; FRANZETTI, Eleonora; TETTAMANTI, Gianluca. A Molecular View of Autophagy in Lepidoptera. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/902315.

SANKARAPANDI, Sornampillai; ZWEIER, Jay L. Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper,zinc-superoxide dismutase and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 274, n. 49, p. 34576–34583, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.49.34576. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925819533634/fulltext>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SANTOS, Douglas Elias; AZEVEDO, Dihego Oliveira; CAMPOS, Lúcio Antônio Oliveira; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera:

Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. **Protoplasma**, [S. l.], v. 252, n. 2, p. 619–627, 2015. DOI: 10.1007/s00709-014-0707-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-014-0707-z>. Acesso em: 13 abr. 2022.

SHADNIA, Shahin; AZIZI, Ebrahim; HOSSEINI, Rohollah; KHOEI, Samideh; FOULADDEL, Shamileh; PAJOUMAND, Abdolkarim; JALALI, Nasser; ABDOLLAHI, Mohammad. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. **Human and Experimental Toxicology**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 439–445, 2005. DOI: 10.1191/0960327105ht549oa. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327105ht549oa>. Acesso em: 18 nov. 2021.

SHANNON, Leland M.; KAY, Ernest; LEW, Jow Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 241, n. 9, p. 2166–2172, 1966. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)96680-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818966809>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SHAO, Zuo Min; LI, Yi Jiangcheng; ZHANG, Xiao Rui; CHU, Jie; MA, Jia Hui; LIU, Zhi Xiang; WANG, Jun; SHENG, Sheng; WU, Fu An. Identification and functional study of chitin metabolism and detoxification-related genes in glyphodes pyloalis walker (Lepidoptera: Pyralidae) based on transcriptome analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1904, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051904. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1904>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SIES, Helmut. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 91, n. 3 SUPPL. 3, p. S31–S38, 1991. DOI: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.

SILVA-BRANDÃO, Karina Lucas; MURAD, Natália Faraj; PERUCHI, Aline; MARTINS, Carlos Henrique Zanini; OMOTO, Celso; FIGUEIRA, Antonio; BRANDÃO, Marcelo Mendes; TRIGO, José Roberto. Transcriptome differential co-expression reveals distinct molecular response of fall-armyworm strains to DIMBOA. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 518–526, 2021. DOI: 10.1002/ps.6051. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6051>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SILVA-JÚNIOR, Neilier R.; CABRERA, Yaremis M.; BARBOSA, Samuel L.; BARROS,

Rafael de A.; BARROS, Edvaldo; VITAL, Camilo E.; RAMOS, Humberto J. O.; OLIVEIRA, Maria Goreti A. Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. e21792, 2021. DOI: 10.1002/arch.21792. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21792>. Acesso em: 13 maio. 2021.

SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, Molecular Biology Research Laboratory, Department of Zoology, Deshbandhu College, University of Delhi, Kalkaji, New Delhi, India. DOI - 10.1111/1744-7917.12641 SRC - Pubmed ID2 - 30230264 FG - 0, v. 27, n. 2, p. 186–201, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12641>. Acesso em: 27 maio. 2021.

SLATER, T. F. [33] Overview of Methods Used for Detecting Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 105, n. C, p. 283–293, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05036-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6427549>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SOBEKOVÁ, Anna; HOLOVSKÁ, Katarína; LENÁRTOVÁ, Viera; FLEŠÁROVÁ, Slávka; JAVORSKÝ, P. The another toxic effect if carbamate insecticides. **Acta Biologica Hungarica**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 45–54, 2009. DOI: 10.1556/ABiol.60.2009.1.5. Disponível em: <https://akjournals.com/view/journals/018/60/1/article-p45.xml>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SONG, Li; FLOREA, Liliana. Rcorrector: Efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. **GigaScience**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 48, 2015. DOI: 10.1186/s13742-015-0089-y. Disponível em: <https://academic.oup.com/gigascience/article/4/1/s13742-015-0089-y/2707778>. Acesso em: 7 jun. 2022.

SOUSA, Maria Esmeralda C.; SANTOS, Fábio A. B.; WANDERLEY-TEIXEIRA, Valéria; TEIXEIRA, Álvaro A. C.; DE SIQUEIRA, Herbert Álvaro A.; ALVES, Luiz C.; TORRES, Jorge B. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 56, n. 12, p. 1913–1919, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191010002593>. Acesso em: 13 abr. 2022.

SOUSA, S.; MAIA, M. L.; CORREIRA-SÁ, L.; FERNANDES, V. C.; DELERUE-MATOS,

C.; CALHAU, C.; DOMINGUES, V. F. Chemistry and Toxicology Behind Insecticides and Herbicides. *In: Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 59–109. DOI: 10.1007/978-3-030-23396-9_3. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-23396-9_3.

SOWJANYA SREE, K. S.; SACHDEV, Bindiya; PADMAJA, V.; BHATNAGAR, Raj K. Electron spin resonance spectroscopic studies of free radical generation and tissue specific catalase gene expression in *Spodoptera litura* (Fab.) larvae treated with the mycotoxin, destruxin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [*S. l.*], v. 97, n. 3, p. 168–176, 2010. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.01.002.

SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok P.; GUPTA, Vidya S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Plant Molecular Biology Group, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Pune, India. DOI - 10.2478/s11658-006-0012-8 SRC - Pubmed ID2 - 16847755 FG - 0, v. 11, n. 1, p. 132–154, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11658-006-0012-8/html>. Acesso em: 27 maio. 2021.

SU, Qi; ZHOU, Zhixiong; ZHANG, Jianmin; SHI, Caihua; ZHANG, Guohui; JIN, Zhenyu; WANG, Wenkai; LI, Chuanren. Effect of plant secondary metabolites on common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Research**, [*S. l.*], v. 48, n. 1, p. 18–26, 2018. DOI: 10.1111/1748-5967.12238. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1748-5967.12238>. Acesso em: 8 abr. 2022.

TANG, Pei An; WU, Hai Jing; XUE, Hao; JU, Xing Rong; SONG, Wei; ZHANG, Qi Lin; YUAN, Ming Long. Characterization of transcriptome in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and gene expression analysis during developmental stages. **Gene**, [*S. l.*], v. 622, p. 29–41, 2017. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.018>. Acesso em: 10 jun. 2022.

THIBOLDEAUX, R. L.; LINDROTH, R. L.; TRACY, J. W. Effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, [*S. l.*], v. 120, n. 3, p. 481–487, 1998. DOI: 10.1016/S0742-8413(98)10070-1.

VAN BEL, Michiel; PROOST, Sebastian; VAN NESTE, Christophe; DEFORCE, Dieter; VAN DE PEER, Yves; VANDEPOELE, Klaas. TRAPID: An efficient online tool for the functional and comparative analysis of de novo RNA-Seq transcriptomes. **Genome Biology**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1186/gb-2013-14-12-r134. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-12-r134>. Acesso em: 7 jun. 2022.

VOLPICELLA, Mariateresa; CECI, Luigi R.; CORDEWENER, Jan; AMERICA, Twan; GALLERANI, Raffaele; BODE, Wolfram; JONGSMA, Maarten A.; BEEKWILDER, Jules. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 270, n. 1, p. 10–19, 2003. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03368.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1033.2003.03368.x>. Acesso em: 31 mar. 2021.

VONTAS, John G.; SMALL, Graham J.; HEMINGWAY, Janet. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 357, n. 1, p. 65–72, 2001. DOI: 10.1042/bj3570065. Disponível em: </biochemj/article/357/1/65/39593/Glutathione-S-transferases-as-antioxidant-defence>. Acesso em: 25 mar. 2022.

WALKER, David R.; ALL, John N.; MCPHERSON, Robert M.; BOERMA, H. Roger; PARROTT, Wayne A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Department of Crop and Soil Sciences, University of Georgia, Athens 30602-7272, USA. DOI - 10.1603/0022-0493-93.3.613 SRC - Pubmed ID2 - 10902306 FG - 0, v. 93, n. 3, p. 613–622, 2000. DOI: 10.1603/0022-0493-93.3.613. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/0022-0493-93.3.613>. Acesso em: 31 mar. 2021.

WANG, Gao-Ping; ZHANG, Qing-Wen; YE, Zhi-Hua; LUO, Li-Zhi. The role of nectar plants in severe outbreaks of armyworm *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. **Bulletin of entomological research**, [S. l.], v. 96, n. 5, p. 445–55, 2006. DOI: 10.1079/BER2006433. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092356>. Acesso em: 16 nov. 2021.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009. DOI: 10.1038/nrg2484. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg2484>. Acesso em: 10 jun. 2022.

WAR, Abdul Rashid; PAULRAJ, Michael Gabriel; WAR, Mohd Yousf; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Plant Signaling and Behavior**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 1769–1777, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17323. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.6.11.17323>. Acesso em: 18 nov. 2021.

WAR, Abdul Rashid; PAULRAJ, Michael Gabriel; WAR, Mohd Yousf; IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Herbivore-induced resistance in different groundnut germplasm lines to Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Physiologiae Plantarum**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 343–352, 2012. DOI: 10.1007/s11738-011-0833-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-011-0833-6>. Acesso em: 18 nov. 2021.

WERTZ, I.; HANLEY, M. Diverse molecular provocation of programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 359–364, 1996. DOI: 10.1016/s0968-0004(96)40002-0. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0968000496400020/fulltext>. Acesso em: 7 abr. 2022.

WU, Haihua; ZHANG, Yiwei; SHI, Xuekai; ZHANG, Jianzhen; MA, Enbo. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in *Oxya chinensis* mediates increased malathion tolerance. **Chemosphere**, [S. l.], v. 181, p. 352–359, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.087. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456037>. Acesso em: 11 abr. 2022.

WU, Shuang; DOU, Wei; WU, Jing Jing; WANG, Jin Jun. Purification and partial characterization of glutathione S-transferase from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 136–150, 2009. DOI: 10.1002/arch.20285. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.20285>. Acesso em: 25 mar. 2022.

XIANG, Mian; ZHANG, Xian; DENG, Yin; LI, Yangyang; YU, Jihua; ZHU, Jianquan; HUANG, Xinhe; ZHOU, Jiayu; LIAO, Hai. Comparative transcriptome analysis provides insights of anti-insect molecular mechanism of *Cassia obtusifolia* trypsin inhibitor against *Pieris*

rapae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. e21427, 2018. DOI: 10.1002/arch.21427. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.21427>. Acesso em: 10 jun. 2022.

XIE, Chen et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 39, n. SUPPL. 2, p. W316–W322, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr483. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/39/suppl_2/W316/2507217. Acesso em: 7 jun. 2022.

XU, Li Na; WANG, Yue Qin; WANG, Zhen Ying; HU, Ben Jin; LING, Ying Hui; HE, Kang Lai. Transcriptome differences between Cry1Ab resistant and susceptible strains of Asian corn borer. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-1362-2. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1362-2>. Acesso em: 10 jun. 2022.

YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. va.; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 55–61, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.

YAO, Jianxiu; BUSCHMAN, Lawrent L.; OPPERT, Brenda; KHAJURIA, Chitvan; ZHU, Kun Yan. Characterization of cDNAs Encoding Serine Proteases and Their Transcriptional Responses to Cry1Ab Protoxin in the Gut of *Ostrinia nubilalis* Larvae. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 44090, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044090. Disponível em: www.plosone.org. Acesso em: 25 jun. 2021.

YU, Quan You; FANG, Shou Min; ZUO, Wei Dong; DAI, Fang Yin; ZHANG, Ze; LU, Cheng. Effect of organophosphate phoxim exposure on certain oxidative stress biomarkers in the silkworm. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 101–106, 2011. DOI: 10.1603/EC10260. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/104/1/101/2199561>. Acesso em: 18 nov. 2021.

YU, S. J.; ABO-ELGHAR, G. E. Allelochemicals as inhibitors of glutathione S-transferases in the fall armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 173–183, 2000. DOI: 10.1006/pest.2000.2514.

ZENG, Jian Yong; BI, Bing; ZHANG, Fang Ming; CHENG, Gong; VUONG THI, Minh Dien;

ZHANG, Guo Cai. Cu/ZnSOD always responded stronger and rapider than MnSOD in *Lymantria dispar* larvae under the avermectin stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 156, p. 72–79, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.02.010.

ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-405>. Acesso em: 2 out. 2021.

ZHOU, Xiaojie; SHENG, Chengfa; LI, Mei; WAN, Hua; LIU, Dong; QIU, Xinghui. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 209–213, 2010. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.02.003.

TABELAS

Tabela 1. Proteases diferencialmente expressas no intestino de *Anticarsia gemmatalis* quando alimentadas com os inibidores SKTI e GORE2

Regulation	Description	Enzyme Code	SeqName	log2 FC	e-Value	p adj	GO IDs
SKTI-UP	serine protease 33	EC:3.4.21	CL1225.Contig1_All	11,9750225	5,10E-156	1,49E-27	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease	EC:3.4.21	CL1225.Contig3_All	10,70751206	3,40E-155	5,11E-35	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin-like protease	EC:3.4	CL1397.Contig1_All	5,418909696	4,98E-81	0,000514654	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	presequence protease, mitochondrial	EC:3.4	CL157.Contig1_All	7,147367106	0.0	2,83E-17	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	lon protease homolog, mitochondrial-like isoform X4	EC:3.4.21	CL1577.Contig6_All	2,448953637	0.0	1,41E-07	F:GO:0003677; C:GO:0005739; F:GO:0016787; P:GO:0030163; P:GO:0065003; F:GO:0140096; F:GO:0140657
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	CL16.Contig2_All	2,907698393	8,13E-78	0,001461125	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	CL2010.Contig1_All	3,968553061	6,02E-86	0,001017485	C:GO:0005576; F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C	EC:3.4.21	CL2410.Contig3_All	1,680681833	1,34E-103	0,001391058	C:GO:0005615; F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	CL2650.Contig2_All	3,813550071	2,55E-80	0,000220762	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	venom serine protease Bi-VSP-like isoform X2	EC:3.4.21	CL3952.Contig1_All	8,430010761	0.0	0,000152995	C:GO:0005576; F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	mitochondrial-processing peptidase subunit beta	EC:3.4.24	CL5050.Contig1_All	3,439106163	0.0	0,000547926	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	collagenase-like	EC:3.4	CL51.Contig11_All	2,599473031	2,19E-99	0,001383029	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig4_All	2,288541907	4,32E-100	0,001968344	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig5_All	3,76344362	1,48E-90	4,93E-25	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig6_All	2,3820552	1,13E-70	9,69E-07	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease	EC:3.4	CL51.Contig9_All	1,431517724	2,46E-102	0,006790245	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	carboxypeptidase B-like	EC:3.4.17	CL5209.Contig2_All	10,1788689	0.0	5,11E-45	F:GO:0016787; F:GO:0140096

SKTI-UP	carboxypeptidase B-like	EC:3.4.17	CL5825.Contig3_All	7,010970591	0.0	1,09E-05	C:GO:0005576; F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	CL6108.Contig1_All	1,918163492	2,58E-92	0,001461125	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	uncharacterized peptidase C1-like protein F26E4.3	EC:3.4	CL6268.Contig1_All	11,62414956	0.0	7,06E-07	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline B-like	EC:3	CL785.Contig1_All	4,022253309	2,14E-60	0,000685466	F:GO:0016787
SKTI-UP	trypsin-like serine protease	EC:3.4.21	Unigene12150_All	3,638221909	6,66E-18	0,003194793	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	Unigene12501_All	2,429827754	4,96E-90	0,003148514	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 isoform X1	EC:3.4.23	Unigene2216_All	5,68935337	0.0	4,14E-07	F:GO:0016787; P:GO:0023052; F:GO:0098772; F:GO:0140096
SKTI-UP	trypsin, alkaline C-like	EC:3.4	Unigene2276_All	3,146069419	7,19E-36	0,002415837	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	serine protease 59	EC:3.4.21	Unigene2402_All	11,91139868	3,93E-90	1,23E-20	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-UP	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1 homolog isoform X2	EC:3.4.24	Unigene2627_All	4,181955231	0.0	4,44E-17	F:GO:0016787; F:GO:0140096; F:GO:0140657
SKTI-UP	serine protease 36	EC:3.4.21	Unigene7719_All	4,548315715	3,51E-117	2,41E-05	F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-DOWN	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	EC:3.4.24	CL3059.Contig1_All	-8,462010975	0.0	0,00196197	F:GO:0016787; P:GO:0023052; F:GO:0140096
SKTI-DOWN	trypsin-like protease	EC:3.4.21	CL461.Contig1_All	-2,132838265	2,40E-104	0,0001261	C:GO:0005615; F:GO:0016787; F:GO:0140096
SKTI-DOWN	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32-like isoform X4	EC:3.4.19.12	Unigene4082_All	-4,387297501	0.0	6,98E-05	F:GO:0016787; P:GO:0030163; P:GO:0036211; F:GO:0140096
GORE2 - UP	presequence protease, mitochondrial	EC:3.4	CL157.Contig1_All	6,089406556	0.0	2,54E-11	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	dipeptidyl peptidase 3 isoform X2	EC:3.4.14.2	CL2216.Contig2_All	1,302839553	0.0	0,008377606	C:GO:0005737; F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	leukotriene A-4 hydrolase isoform X2	EC:3.4	CL3113.Contig3_All	10,2044005	0.0	1,70E-20	F:GO:0016787; F:GO:0140096

GORE2 - UP	methionine aminopeptidase 1D, mitochondrial isoform X1	EC:3.4.11	CL3143.Contig3_All	2,006182744	8,74E-169	0,008824794	F:GO:0016787; P:GO:0036211; F:GO:0140096
GORE2 - UP	proteasome subunit beta type-4	EC:3.4.25	CL3921.Contig1_All	8,088182282	1,28E-170	1,21E-06	C:GO:0005634; C:GO:0005737; F:GO:0016787; P:GO:0030163; C:GO:0032991; F:GO:0140096
GORE2 - UP	mitochondrial-processing peptidase subunit beta	EC:3.4.24	CL5050.Contig1_All	4,160957797	0.0	4,03E-06	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	collagenase-like	EC:3.4	CL51.Contig11_All	2,102057828	2,20E-99	0,000122163	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	trypsin alpha-3-like	EC:3.4.21	CL51.Contig3_All	1,66091933	1,16E-23	0,008761093	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig4_All	1,932342636	4,32E-100	4,88E-11	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig5_All	5,05220764	1,49E-90	7,26E-25	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	serine protease	EC:3.4.21	CL51.Contig6_All	1,577863011	1,14E-70	3,14E-16	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	carboxypeptidase B-like	EC:3.4.17	CL5209.Contig2_All	7,904137745	0.0	0,002140265	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	sentrin-specific protease 6-like isoform X3	EC:3.4	CL5231.Contig4_All	7,846312629	0.0	0,00101668	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	dipeptidyl peptidase 9 isoform X2	EC:3.4	CL6222.Contig1_All	9,017842177	0.0	0,000308924	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	pyroglutamyl-peptidase 1	EC:3.4.19	Unigene1265_All	7,550171361	2,21E-38	0,000547424	C:GO:0005829; F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 isoform X1	EC:3.4.23	Unigene2216_All	4,465360198	0.0	0,00682728	F:GO:0016787; P:GO:0023052; F:GO:0098772; F:GO:0140096
GORE2 - UP	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1 homolog isoform X2	EC:3.4.24	Unigene2627_All	3,478315673	0.0	1,83E-12	F:GO:0016787; F:GO:0140096; F:GO:0140657

GORE2 - UP	carboxypeptidase B-like	EC:3.4.17	Unigene5732_All	5,175631623	3,89E-32	0,004095005	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - UP	carboxypeptidase B-like	EC:3.4.17	Unigene6320_All	4,793606264	1,90E-153	2,34E-05	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	probable alpha-aspartyl dipeptidase	EC:3.4	CL1552.Contig1_All	-9,701270345	8,12E-122	4,03E-06	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	membrane alanyl aminopeptidase-like	EC:3.4.11	CL1713.Contig3_All	-26,87443177	0.0	3,30E-06	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	ubiquitin thioesterase otubain-like isoform X1	EC:3.4.19.12	CL1733.Contig2_All	-2,540511301	1,37E-167	1,16E-06	C:GO:0005634; F:GO:0016787; P:GO:0036211; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	dipeptidyl peptidase 3 isoform X2	EC:3.4.14.2	CL2216.Contig3_All	-1,490430532	0.0	4,00E-06	C:GO:0005737; F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	glutathione hydrolase 1 proenzyme-like isoform X2	EC:3.4.19.13	CL2266.Contig1_All	-4,530341979	0.0	0,008444935	P:GO:0006575; P:GO:0006790; F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	zinc carboxypeptidase-like	EC:3.4.17	CL2550.Contig3_All	-7,093489585	0.0	0,003747412	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	chymotrypsin-1 isoform X1	EC:3.4	CL3591.Contig1_All	-14,75108151	5,01E-83	0,000422577	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	zinc metalloproteinase nas-4-like isoform X1	EC:3.4.24	CL4422.Contig3_All	-7,572330767	5,08E-174	2,98E-12	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	aminopeptidase N	EC:3.4.11	CL5022.Contig1_All	-12,26843116	0.0	0,001496461	C:GO:0005886; F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1 homolog	EC:3.4.24	CL5330.Contig2_All	-1,165401994	0.0	0,009093881	F:GO:0016787; F:GO:0140096; F:GO:0140657
GORE2 - DOWN	collagenase-like isoform X1	EC:3	CL6019.Contig1_All	-2,317611091	9,52E-57	0,002938325	F:GO:0016787
GORE2 - DOWN	aminopeptidase N	EC:3.4.11	CL906.Contig5_All	-23,75848631	0.0	7,22E-05	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	aminopeptidase N	EC:3.4.11	Unigene1311_All	-13,08888841	0.0	0,000497904	F:GO:0016787; F:GO:0140096
GORE2 - DOWN	midgut aminopeptidase N4	EC:3.4.11	Unigene6594_All	-11,46871248	0.0	0,002265247	F:GO:0016787; F:GO:0140096

4. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho sistematiza e apresenta avanços na compreensão de respostas bioquímicas e fisiológicas do inseto quando desafiado com IP. O capítulo I revisa os avanços importantes no entendimento da interação inseto-planta, mostrando que o uso de IP é uma estratégia promissora no controle de pragas agrícolas e propôs estratégias para o desenho racional de IP eficientes. No entanto, os trabalhos que evidenciam os efeitos biológicos de sobrevivência e desenvolvimento do inseto necessitam de ferramentas que gerem respostas mais detalhadas. O entendimento da resposta adaptativa do inseto frente a IP requer um conhecimento mais aprofundado a nível molecular.

Identificar e descrever o arsenal de hidrolases presente no intestino da *A. gemmatalis* é um passo fundamental para direcionar o desenho racional de IP de forma eficiente e específica. A metodologia de análise proteômica de enzimas, proposta de forma inédita neste trabalho, permite a apresentação do proteoma intestinal da lagarta com uma cobertura maior que aquelas encontradas na literatura para outras espécies de lepidópteras. Com as estruturas primárias das serino-proteases reveladas, as análises de *docking* molecular evidenciam as interações mais prováveis entre os complexos EI formados.

Avaliamos também como o perfil proteômico varia quando a lagarta da soja é alimentada com IPs diferentes. Nessa abordagem, verificamos que as lagartas são mais responsivas aos processos de estresse quando tratadas com o inibidor natural da soja (SKTI) em relação ao IP sintético (Berenil). A resposta adaptativa do proteoma é acompanhada pelas atividades de proteases do intestino da *A. gemmatalis*, que é mais comprometida pelo Berenil. Essa eficiência pôde ser evidenciada pelas análises *in silico*, que revelam acessos a sítios catalíticos mais hidrofóbicos e estáveis entre o Berenil e as serino-proteases do inseto. Devido ao maior tempo de resposta fisiológica ao Berenil, este IP gera danos histológicos mais intensos quando comparado com o SKTI. As alterações do perfil proteômico mostram também um aumento na expressão de isoformas suprarreguladas como uma tentativa fisiológica de driblar os efeitos negativos dos IP.

Esses resultados e outros esforços do nosso grupo de pesquisa guiaram a proposição de um tripeptídeo racionalmente desenhado para inibir as tripsinas-like de *A. gemmatalis*. Este produto foi patenteado pelo importante potencial no manejo de insetos praga. Estudos prévios do nosso grupo concluíram que o IP proposto trazia prejuízo ao desenvolvimento do inseto. No entanto, faltava compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos.

De fato, este trabalho mostra que os efeitos fisiológicos dos IP vão além da simples inibição das proteases intestinais. As análises histológicas mostram que lagartas alimentadas com o tripeptídeo GORE2 possuem danos celulares mais extensos e intensos quando comparado aos efeitos causados pelo inibidor natural da soja (SKTI). Além de causar danos celulares mais severos, lagartas tratadas com GORE2 são menos competentes na desintoxicação fisiológica mediada por enzimas antioxidantes.

A coevolução entre as proteases dos herbívoros e os IP das plantas estabelece um novo paradigma para pesquisas de controle de pragas agrícolas, baseado em respostas bioquímicas e celulares. O conhecimento apresentado tem potencial de translação para outras espécies como estratégia de manejo de pragas agrícolas. Ainda é necessário estudar os efeitos da transformação de plantas projetadas para sintetizar localmente os IP, bem como os impactos nas relações ecológicas em campo. Esta linha de pesquisa promete ser desafiadora por muitos anos.

APÊNDICE A - Capítulo de livro I - Use of protease inhibitors as a promising alternative for pest control - Publicado no livro *Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective*. Ed. Springer Nature - https://doi.org/10.1007/978-981-19-0932-0_6

Chapter 6

Use of Protease Inhibitors as a Promising Alternative for Pest Control



Neilier Rodrigues Silva-Junior , Yaremis Beatriz Meriño Cabrera, Rafael de Almeida Barros, and Maria Goreti de Almeida Oliveira

Abstract Proteases are responsible for several processes essential to life and, controlling their activity is naturally important in many specific metabolic events. When a phytophagous insect feeds, the response machinery of a plant leads to the production of protease inhibitors (PIs), which can occur locally or systemically. Upon reaching the insect's intestine, PIs bind to specific proteases and compromise the insect's digestibility, reducing the absorption of dietary amino acids. The impaired nutritional balance affects the insect's development and can lead to death. In this sense, PIs have gained prominence as alternatives in the control of pest insects, minimizing the toxic effects on other animals and the environment. Conversely, insects express multiple isoforms of important digestive enzymes to circumvent the toxic effect of plant PIs. Our research group is dedicated to understanding the biochemical mechanisms involved in plant–pest interaction from an enzymatic, proteomic, and molecular biology point of view. Because of these efforts, dozens of articles were generated, besides PI patented for use as ecologically correct agricultural defensives. This chapter provides an updated overview of advances in PI research applied to insect pest control.

Keywords Protein · Peptides inhibitors · Plant–pest interaction · Insect pest control

6.1 Introduction

Proteases handle several processes essential to life. This diverse group of enzymes can cleave peptide bonds to finely control protein catabolism, selectively degrade damaged proteins, or promote mass hydrolysis of dietary proteins. Advances in enzymology and proteomics in recent decades have shown that proteases are

N. R. Silva-Junior (✉) · Y. B. Meriño Cabrera · R. de Almeida Barros ·
M. G. de Almeida Oliveira

Laboratory of Enzymology and Biochemistry of Proteins and Peptides, Department of
Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, UFV, BIOAGRO/
INCT-IPP, Viçosa, MG, Brazil
e-mail: malmeida@ufv.br

essential not only for providing free amino acids to the cell but also for modulating important processes, such as the removal of specific segments in zymogens (Stroud et al. 1977; Gorelick and Otani 1999; Donepudi and Grütter 2002; Plainkum et al. 2003) and immature proteins (Peng et al. 1989; Muramatsu and Fukazawa 1993; Khan and James 1998) or the removal of a signal peptide when the protein is already in the appropriate cell compartment (Hussain et al. 1982; Novak and Dev 1988; Friedmann et al. 2004; Lemberg 2011).

Proteolytic activity is also linked to the need to control specific metabolic events, such as the final processing of proteins before they play their role in the cell (Lum and Blobel 1997; Guttentag et al. 2003; Grau et al. 2005; Manolaridis et al. 2013), selectively removing proteins when they are no longer useful or recycling amino acids needed to synthesize new polypeptide chains (Ciechanover 1994; Bochtler et al. 1999). Besides intra- and intercellular processes, proteases mediate several molecular interactions that occur between different organisms in a given environment. Intracellular parasites, for example, secrete proteases that help their interactions and survival in the host cell (Alves and Colli 2007; Knox 2007; Laliberté and Carruthers 2008). Likewise, the hydrolysis of plant proteins in the intestine of herbivorous insects are extracellular processes that aim to provide free amino acids that will be absorbed to later make up new proteins (da Silva Júnior et al. 2020).

During the evolutionary process, insects gained complex protease systems, an essential process to get a better nutritional benefit (Silva-Júnior et al. 2021). If, on the one hand, an arsenal of proteases favors herbivory, co-evolution has selected plants with strategies to overcome the adverse effects of insect proteases (Zhu-Salzman and Zeng 2015; Pilon et al. 2017a; Meriño-Cabrera et al. 2018). Plants challenged by a pathogen or predator, for example, produce protease inhibitors (PI) that bind to proteolytic enzymes and prevent or limit their activity (Ryan 1990; Habib and Fazili 2007); this digestive deficiency implies less free amino acids to be absorbed and used as raw material in the synthesis of proteins necessary for the proper development of the insect. It is already well established that a wide variety of organisms use PIs not only to control endogenous proteolytic functions but also to ensure their protection against herbivory or infection. In this sense, PIs act for the complex set of molecular interactions that occur between different organisms in an ecosystem, acting as regulators of proteolytic events. Therefore, it is not surprising that PIs are being proposed as a tool for the control of herbivores and pathogens (Clemente et al. 2019).

Based on this, pest control strategies using PIs were developed to control nematodes (Turrà et al. 2009), viruses (Masoud et al. 1993) bacteria (Mishra et al. 2020), and phytophagous insects (Senthilkumar et al. 2010). The effects of dietary PIs on the fecundity and growth of herbivorous insects have been described for several species (Thomas et al. 1995; Telang et al. 2003; Jamal et al. 2015; Dantzger et al. 2015; Singh et al. 2020), and the implication of extracellular proteases in pathogenic processes has been documented in several cases (Dunaevsky et al. 2005; Armstrong 2006; Santos and Braga-Silva 2012). For this, the use of PIs of protein origin was proposed to be expressed through transgenics to protect plants from agricultural pests (Gatehouse et al. 1993; De Leo et al. 2002; Zhu-Salzman and

Zeng 2015). Today, the expression of PIs by genetically modified plants is a reality in the control of herbivores and plant parasites (Rahbé et al. 2003; Riglietti et al. 2008; Senthilkumar et al. 2010; Khalf et al. 2010). Therefore, this additional protection granted to economically important plants has a powerful appeal from the food, biofuel, textile industry and from the entire production chain that involves them.

6.2 Serine Proteases and Plant Protease Inhibitors

According to the enzymatic classification system created in 1956 (Knight 1962), serine proteases (EC 3.4.21) belong to the class of hydrolases, a sub-class of hydrolases that act on peptide bonds. The family name derives from the nucleophilic Ser residue in the active site of the enzyme, which attacks the peptide carbonyl group of the substrate to form a tetrahedral acyl-enzyme intermediate (Hedstrom 2002; Cox and Nelson 2008). At the end of the peptide bond hydrolysis, the complete organic reaction mechanism of the serine proteases involves the catalytic triad composed of Ser, His, and Asp (Matthews et al. 1967; Blow et al. 1969; Henderson 1971).

Serine proteases are the best studied peptidases and are considered the main responsible for protein digestion in the intestine of important pest insects, such as those belonging to the orders Lepidoptera (Pilon et al. 2017b; Zhao and Ee 2018; Meriño-Cabrera et al. 2018; Zhao et al. 2019; da Silva Júnior et al. 2020) and Coleoptera (Mochizuki 1998; Alarcón et al. 2002; Marshall et al. 2008). At this point, enzymes from the Trypsin-like, Chymotrypsin-like, and Elastase-like families stand out as the main representatives (Kuwar et al. 2015; da Silva Júnior et al. 2020). Because of this importance, several plant serine protease inhibitors have been described and characterized.

Protease inhibitors of protein origin are classified into 99 families according to the homology existing in the amino acid sequence of their representatives, at least in the inhibitory unit. There may also be subfamilies when there is evidence of a very old evolutionary divergence within the family. PIs are also grouped into clans, which represent a group of inhibitors in one or more families that show evidence of an evolutionary relationship from their similar tertiary structures (Rawlings et al. 2018).

Against this background, plant protease inhibitors (PPI) are usually small proteins found in plant storage tissues such as the root, but also in leaves (De Leo et al. 2002). In seeds, tubers, and other plant storage tissues, trypsin inhibitors represent about 10% of the total protein content (Mandal et al. 2002). These high levels of PPI are associated with plant resistance to insects and pathogens (Kim et al. 2009; Dunse et al. 2010). Although high levels of PPI are often found in Leguminosae, Solanaceae, and Gramineae (Brzin and Kidrič 1996; Xu et al. 2001; Sin and Chye 2004), the expression of these PPI depends on the stage of development of the plant, tissue, and presence of stressors, even presenting different isoforms in the same tissue (Sels et al. 2008).

Two very well-studied PPI families are Kunitz and Bowman-Birk. Members of the Kunitz family have in their primary structure some conserved residues, such as the four cysteine residues that form the two intrachain disulfide bonds (Pouvreau et al. 2003), besides being monomeric proteins containing from 150 to 200 amino acid residues and approximately 20 kDa (Norioka et al. 1988). Each molecule contains a unique binding site that interacts strongly with the protease against which the inhibitor is targeted (Salier 1990).

On the other hand, Bowman-Birk PPIs are polypeptide chains of approximately 8 kDa that can form oligomers, ranging from 54 to 133 amino acid residues (Birk 1985; Kennedy 1998). A Bowman-Birk basic unit contains a high proportion of cysteine residues and forms several intrachain disulfide bonds, leading to a rigidly folded conformation (Losso 2008). The monomeric unit contains two binding loops with reactive sites on the enzyme. Therefore, each inhibitor can inhibit up to two proteases with different inhibitory specificities (Qi et al. 2005).

Although PPIs are very well documented as plant defensive compounds, the damage caused to insects and pathogens goes far beyond just decreasing the activity of digestive proteases. The molecular mechanisms are not fully known, but metabolome, transcriptome, proteome, and histology studies have shown several effects on the physiology of insects subjected to PPI (Valueva and Mosolov 2004; Bayés et al. 2006; Quilis et al. 2007; Bobbarala 2009; Sabotič and Kos 2012; Radanovic and Anauate 2013; Quilis et al. 2014; Shao et al. 2016; Cingel et al. 2017; Shamsi et al. 2018).

6.3 Contributions in the Field from Our Research Group

The use of PIs as an agricultural defensive was suggested as far back as 1947, when Mikel and Standish (1947) observed that a soy-based diet limited the development of some insects. Just 25 years later, Green and Ryan (1972) demonstrated that damage to nightshade leaves induced PI synthesis, suggesting the protective role of this compound. In the following decades, the economic and environmental importance of developing alternative strategies for the ecologically correct control of agricultural pests increased interest in the development of IP for this purpose. However, the biochemical mechanisms involved in the interaction between insect physiology and PIs were not well known.

Given this scenario, our research group focused on understanding the biochemical mechanisms involved in the plant-pest interaction from the point of view of biochemistry and molecular biology, exploring techniques of enzymology, proteomics, metabolomics, and transcriptomics. The interaction between soybean (*Glycine max*) and soybean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) was used as a model to validate the biochemical mechanism of plant response via the Lipoxygenase pathway (Fig. 6.1). Soy was chosen for its importance in agricultural production in Brazil, and *A. gemmatalis* was chosen because, besides being a key soybean pest, it is an insect that is easy to breed and presents a good yield of biological material for

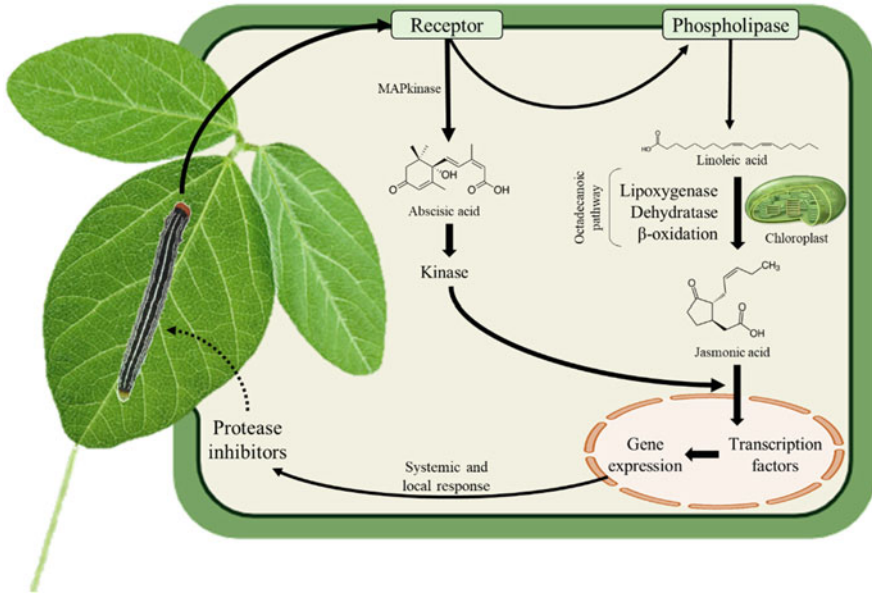


Fig. 6.1 Lipoxygenase pathway. The mechanical damage caused by the biting insect activates a cascade of intracellular messengers and leads to the formation of jasmonic acid. This plant hormone activates transcription factors that end with the production of protease inhibitors, compromising the insect's digestibility

studies involving biochemical analyses that require purification and characterization of the enzymes involved in the insect–plant interaction process.

The study of plant–insect interaction requires a thorough understanding of the arthropod and the plant under properly controlled conditions. In this sense, the determination of the enzymatic profile in the different larval instars of *A. gemmatilis* was an important step to determine the proteases responsible for the digestive process of the caterpillar throughout its development. For this, da Silva Júnior et al. (2020) showed that the proteolytic profile in the intestine of *A. gemmatilis* changes during larval development, with a predominance of cysteine protease activity in the third instar and serine protease in the fourth and fifth instars, suggesting modulation in gene expression accompanied by different nutrient demand throughout this internship. Previous studies involving Lepidoptera focused on the physiology and biochemistry of the insect only in the fifth instar, as this is the moment of the greatest voracity of the caterpillar. However, some studies show changes in the morphological profile in the intestine of some insects during development (Chougule et al. 2005; Kipgen and Aggarwal 2014; Zhao et al. 2019). This dataset suggests that both cysteine and serine proteases are important targets for the development of PIs, aiming to compromise larval development in different instars. Insects express an arsenal of isoforms for digestive enzymes, having as an important consequence the attempt to circumvent the negative effects of PIs (Kotkar et al.

2009; Lomate and Hivrale 2011; Crava et al. 2013). Therefore, knowledge of the primary and tertiary structures of proteins is of fundamental importance. Thinking about that, Silva-Júnior et al. (2021) described the proteomic profile of the intestine of *A. gemmatalis*, showing a large number of functional enzymes, their sequences and post-translational modifications (PTM) through proteomics techniques. The description of a proteomic profile of enzymes is a challenge because of the low concentrations of these hydrolases concerning other abundant proteins present in the sample. However, the conciliation of several proteomic methodologies allowed for high coverage of the intestinal proteome of the caterpillar as shown in the workflow in Fig. 6.2. Furthermore, research by our group showed the energies and points of interaction between enzymes and inhibitors by molecular docking are important information for the rational design of PIs (Meriño-Cabrera et al. 2019, 2020; de Almeida Barros et al. 2021; Silva-Júnior et al. 2021).

A deeper knowledge of the enzymatic kinetics of digestive proteases from *A. gemmatalis* allows a better understanding of the active centers, the mechanisms of reaction of these enzymes, and the PI that need to be applied as inhibitors of the complex arsenal of digestive proteases of the insect. In this sense, trypsins bound to the intestinal membrane of the soybean caterpillar were partially purified and identified by mass spectrometry (Reis et al. 2012). In addition, our research group also evaluated the contribution of endosymbiotic bacteria in the production of proteolytic enzymes in the intestine of *A. gemmatalis* (Pilon et al. 2013). The main trypsins of these bacterial isolates were purified and kinetically characterized (Pilon et al. 2017b) and this dataset allowed us to infer that endosymbiont bacteria synthesize trypsin, contributing to the insect's digestibility.

These works developed by our group brought a look towards the insect and its intestinal enzymology of *A. gemmatalis* under normal conditions, that is, free from PI treatments. However, the development of PIs, peptides, or organic peptide mimetics with inhibitory activity requires a thorough understanding of the enzyme-inhibitor complex. Inhibition kinetic studies are tools for understanding the multi-mechanistic enzyme system. Thus, we performed the kinetic characterization of trypsin-like inhibition of the insect against natural soybean PI (SKTI and SBBI) and synthetic PI (Benzamidine and Berenil) to understand the inhibition from the physiological structure/function point of view (Patarroyo-Vargas et al. 2020; Silva-junior and de Almeida Oliveira 2021). Our study showed, for the first time, the adaptation of trypsin-like enzymes in the intestine of *A. gemmatalis* against different inhibitors. The effect of PI was also evidenced when the caterpillar was challenged with Benzamidine (Pilon et al. 2018), Berenyl (Moreira et al. 2011; Paixão et al. 2013), synthetic peptides (Patarroyo-Vargas et al. 2018; de Oliveira et al. 2020; de Almeida Barros et al. 2021), SKTI, SBBI (Mendonça et al. 2020), ILTI and ApTI (Meriño-Cabrera et al. 2020).

If, on the one hand, the in-depth study of the pest insect is important, it is necessary to understand the physiology of the target plant and its response systems against the herbivore. With this in mind, we performed biological assays associated with metabolome analysis in two soybean genotypes contrasting for herbivory resistance in response to *A. gemmatalis* (Gomez et al. 2018). This approach allowed

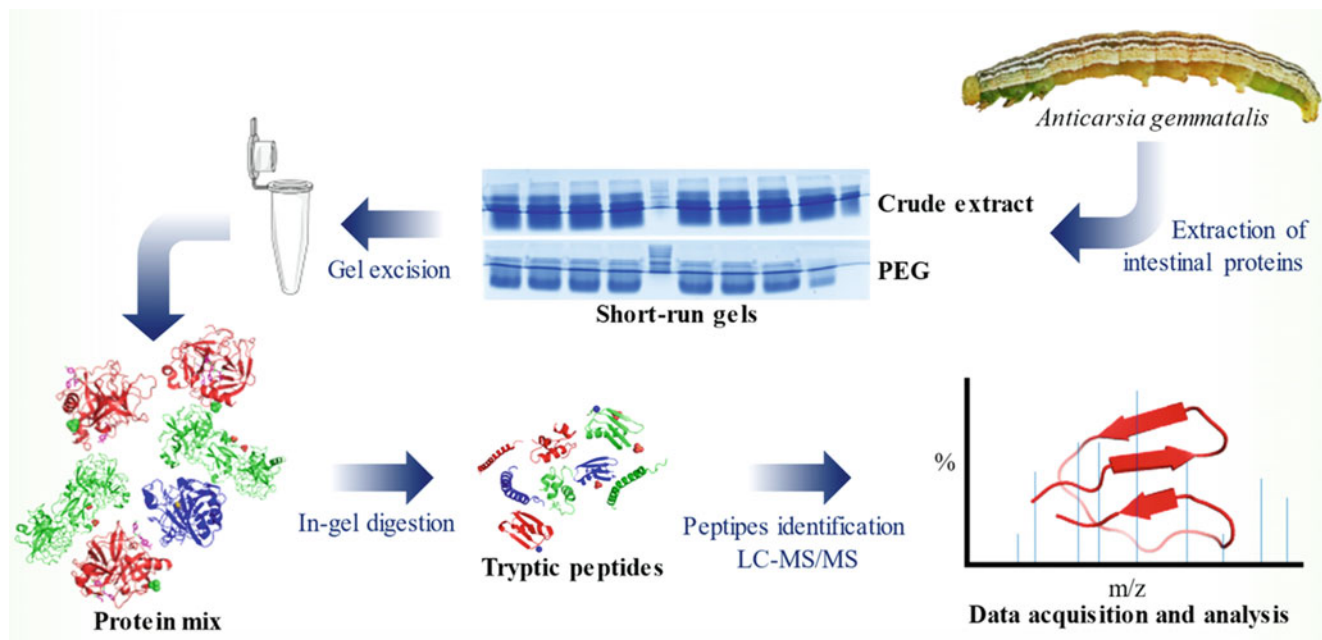


Fig. 6.2 The intestine extracted from *Anticarsia gemmatalis* was fractionated with polyethylene glycol to remove abundant proteins. The crude extract and the result of PEG precipitation were submitted to short-run SDS-PAGE. The proteins present in the gel were identified by mass spectrometry

showing flavonoid profiles from soybean leaf extract and efficiently identifying some new compounds related to resistance. With the metabolic profiles, it was possible to reconstruct the biosynthetic pathways of flavonoids, revealing upregulated glycoconjugate flavonoids in the resistant soybean genotype. These differences in abundance between genotypes suggest they handle resistance to herbivory in these varieties and open the door to a vast field of investigation aimed at increasing soybean resistance against insects. Still from the perspective of how the plant perceives and reacts to damage caused by the herbivore, we show that the response to flavonoids also occurs when the plant suffers artificial mechanical damage (da Silva Júnior et al. 2021). In addition, the deletion of genes in soybean seeds that code for proteins important to plant defense, such as the lipoxygenase enzyme and PI SKTI, does not interfere with the plant's ability to respond to wounds through the lipoxygenase pathway (da Silva Fortunato et al. 2007). These results have industrial and practical appeal since these proteins are undesirable in the seed, but fundamental in the plant's defense against agricultural pests.

Given the reality of climate change, it is important to foresee how the plant–insect interaction responds to environmental variations. Faustino et al. (2021) showed that soybean subjected to drought reduces herbivory and survival of *A. gemmatilis*. The group relied on gene expression, enzymatic kinetics, and metabolomic analysis to conclude that the drought signal alone is not enough to promote increased resistance to insect attack.

These results generated by our research group in the last decade made it possible to identify the target enzymes and map the active sites, allowing the development of potent peptide PIs to be sprayed, used as models for mimetic peptide production, or even as a model for transgenics in the agricultural pest control. We have developed promising protein inhibitors for agricultural pest control. Part of these contributions is compiled in Fig. 6.3.

6.4 Final Considerations

The agricultural *ex vivo* application of protease inhibitors is still limited because of the large molecular size, which turns them unstable in the environment. We believe that smaller scaffold peptides designed according to the active site of important digestive proteases and reactive domains of protease inhibitors could overcome this bottleneck. Besides that, novel designed peptides have an advantage over vegetable PIs that are not having co-evolved with insects, which might avoid adaptations. To counteract the complex set of proteases that insects possess in their midgut, exposing them to PIs for different classes of proteases could overcome the adaptative mechanisms more efficiently. Despite all the bottlenecks, PIs could be useful in integrated pest management as an alternative/supplementary approach if well explored.

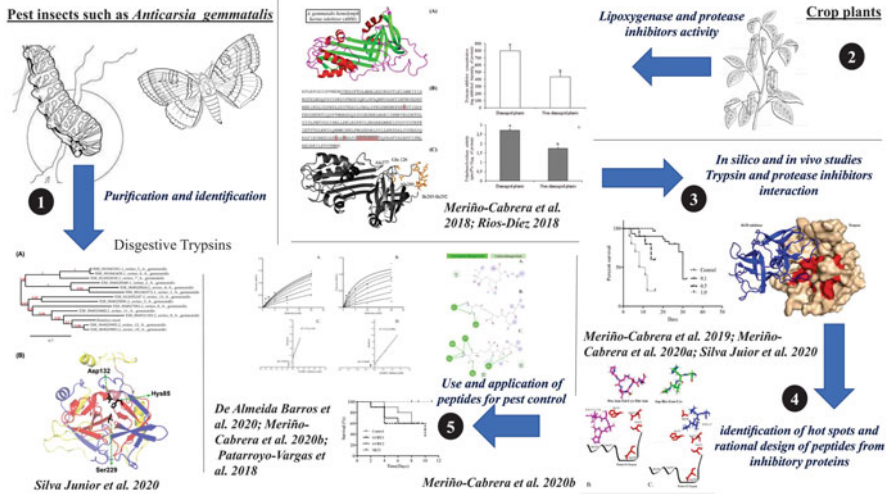


Fig. 6.3 Some researches carried out in our group are characterized by the study of the insect–plant interaction. *Anticarsia gemmatalis* represents the main object of study of our papers. And the plants are crops such as soybeans, tomatoes, and coffee, but mainly soybeans have been used because it is the host plant of *A. gemmatalis*. In insect pests, the activity of enzymes from the digestive tract of caterpillars has been evaluated and characterized, mainly trypsin, enzymes that catalyze the degradation of proteins, the activity has been determined in crude extracts from the intestine and in samples enriched as trypsin isoforms from affinity purification, as well as two-dimensional electrophoresis associated with mass spectrometry (1). In parallel, in the host plants of these pest insects, a metabolic defense pathway has been evaluated, which is the lipoxigenase pathway that activates the expression of protease inhibitors, as well as the purification and stability analysis of these inhibitors (2). From the results of several studies of insect–plant interaction, we started to evaluate the interaction of protein inhibitors and trypsin through in silico studies (protein modeling, protein–protein docking, and simulations by molecular dynamics) that allow predicting the inhibitory effect and its capacity of trypsin binding complementing the experimental study (in vitro and in vivo) (3). From these studies and analyzes of a region known as interface (protein–protein interaction site) several peptides (patent deposits) have been proposed with bioinsecticide application on *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera cosmioides* (4) corroborated from in vitro and in vivo tests (5)

References

- Alarcón FJ, Martínez TF, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano FJ (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 32(3):265–274
- Alves MJM, Colli W (2007) Trypanosoma cruzi: adhesion to the host cell and intracellular survival. In: IUBMB life. Wiley, New York, pp 274–279
- Armstrong PB (2006) Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host–pathogen interaction. *Immunobiology* 211:263–281
- Bayés A, de la Vega MR, Vendrell J, Aviles FX, Jongsma MA, Beekwilder J (2006) Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochem Mol Biol* 36(8):654–664

- Birk Y (1985) The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res* 25:113–131
- Blow DM, Birktoft JJ, Hartley BS (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221(5178):337–340
- Bobbarala V (2009) Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. *Indian J Sci Technol* 2(4):87–90
- Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:295–317
- Brzin J, Kidrič M (1996) Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13(1):421–468
- Chougule NP, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS (2005) Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem Mol Biol* 35(4):355–367
- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79:13–21
- Cingel A, Savić J, Lazarević J, Čosić T, Raspor M, Smigočki A, Ninković S (2017) Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development. *Insect Sci* 24(5):768–780
- Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA, Sánchez-López EF, Sander VA, Ramos-Duarte VA (2019) Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int J Mol Sci* 20:1345
- Cox M, Nelson DL (2008) *Lehninger principles of biochemistry*, 7th edn. W. H. Freeman and Company, New York
- Crava CM, Bel Y, Jakubowska AK, Ferré J, Escribe B (2013) Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 43(10):924–935
- da Silva Fortunato F, de Almeida Oliveira MG, Brumano MHN, Silva CHO, Guedes RNC, Moreira MA (2007) Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *J Pest Sci* 80(4):241–247
- da Silva Júnior NR, Vital CE, de Almeida Barros R, Faustino VA, Monteiro LP, Barros E, de Oliveira EE, de Oliveira Ramos HJ, de Almeida Oliveira MG (2020) Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Arch Insect Biochem Physiol* 103(1):e21631
- da Silva Júnior NR, Barros RA, Meriño-Cabrera YB, de Almeida Oliveira MG (2021) Does mechanical damage on soybean induces the production of flavonoids? In: *Current approaches in science and technology research*, vol 3. Book Publisher International, Hooghly, pp 56–66
- Dantzger M, Vasconcelos IM, Scorsato V, Aparicio R, Marangoni S, Macedo MLR (2015) Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry* 118:224–235
- de Almeida Barros R, Meriño-Cabrera Y, Vital CE, da Silva Júnior NR, de Oliveira CN, Lessa Barbosa S, Marques Gonçalves Assis JV, Ramos HJO, de Almeida Oliveira MG (2021) Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. *Pest Manag Sci* 77(4):1714–1723
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002) PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res* 30(1):347–348
- de Oliveira G, de Almeida Barros R, da Silva Júnior NR, Vital CE, Cordeiro G, da Silva CR, Vargas AMP, Campos WG, de Oliveira Ramos HJ, de Almeida Oliveira MG (2020) Inhibitory effects of tripeptides to enzymatic activity and life cycle parameters of *Anticarsia gemmatalis*. *Phytoparasitica* 48(5):823–831
- Donepudi M, Grütter MG (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys Chem* 101–102:145–153
- Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA (2005) Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Mol Biol* 39:608–613

- Dunse KM, Stevens JA, Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA (2010) Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(34):15011–15015
- Faustino VA, de Souza Gouveia A, Coutinho FS, da Silva Júnior NR, de Almeida Barros R, Meriño Cabrera Y, Vital CE, Loriato VAP, Martins LGC, Fontes EPB, de Oliveira Ramos HJ, Oliveira MGA (2021) Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatilis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. *Environ Exp Bot* 190:104594
- Friedmann E, Lemberg MK, Weihofen A, Dev KK, Dengler U, Rovelli G, Martoglio B (2004) Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem* 279(49):50790–50798
- Gatehouse AMR, Shi Y, Powell KS, Brough C, Hilder VA, Hamilton WDO, Newell CA, Merryweather A, Boulter D, Gatehouse JA (1993) Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 342(1301):279–286
- Gomez JD, Vital CE, Oliveira MGA, Ramos HJO (2018) Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One* 13(10):e0205010
- Gorelick FS, Otani T (1999) Mechanisms of intracellular zymogen activation. *Baillieres Best Pract Clin Gastroenterol* 13(2):227–240
- Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T, Ehrmann M (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(17):6021–6026
- Green TR, Ryan CA (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175(4023):776–777
- Guttentag S, Robinson L, Zhang P, Brasch F, Bühling F, Beers M (2003) Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(1):69–79
- Habib H, Fazili KM (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2(3):68–85
- Hedstrom L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102(12):4501–4523
- Henderson R (1971) Catalytic activity of -chymotrypsin in which histidine-57 has been methylated. *Biochem J* 124(1):13–18
- Hussain M, Ozawa Y, Ichihara S, Mizushima S (1982) Signal peptide digestion in *Escherichia coli* effect of protease inhibitors on hydrolysis of the cleaved signal peptide of the major outer-membrane lipoprotein. *Eur J Biochem* 129(1):233–239
- Jamal F, Pandey PK, Singh D, Ahmed W (2015) A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. *Process Biochem* 50(2):311–316
- Kennedy AR (1998) The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl):1406S–1412S
- Khalif M, Goulet C, Vorster J, Brunelle F, Anguenot R, Fliss I, Michaud D (2010) Tubers from potato lines expressing a tomato Kunitz protease inhibitor are substantially equivalent to parental and transgenic controls. *Plant Biotechnol J* 8(2):155–169
- Khan AR, James MNG (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 7:815–836
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahn KS, Park Y (2009) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* 10:2860–2872
- Kipgen L, Aggarwal KK (2014) Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Trop Insect Sci* 34(3):172–178
- Knight SG (1962) Report of the commission on enzymes of the International Union of Biochemistry. *AIBS Bull* 12(1):39
- Knox DP (2007) Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite Immunol* 29:57–71

- Kotkar HM, Sarate PJ, Tamhane VA, Gupta VS, Giri AP (2009) Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *J Insect Physiol* 55(8):663–670
- Kuwar SS, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG (2015) Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol* 59:18–29
- Labiberté J, Carruthers VB (2008) Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* 65:1900–1915
- Lemberg MK (2011) Intramembrane proteolysis in regulated protein trafficking. *Traffic* 12:1109–1118
- Lomate PR, Hivrale VK (2011) Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. *Arthropod Plant Interact* 5(4):359–368
- Losso JN (2008) The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48(1):94–118
- Lum L, Blobel CP (1997) Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev Biol* 191(1):131–145
- Mandal S, Kundu P, Roy B, Mandal RK (2002) Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants. *J Biol Chem* 277(40):37161–37168
- Manolaridis I, Kulkarni K, Dodd RB, Ogasawara S, Zhang Z, Bineva G, O'Reilly N, Hanrahan SJ, Thompson AJ, Cronin N, Iwata S, Barford D (2013) Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature* 504(7479):301–305
- Marshall SDG, Gatehouse LN, Becher SA, Christeller JT, Gatehouse HS, Hurst MRH, Boucias DG, Jackson TA (2008) Serine proteases identified from a *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae) midgut EST library and their expression through insect development. *Insect Mol Biol* 17(3):247–259
- Masoud SA, Johnson LB, White FF, Reeck GR (1993) Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 21(4):655–663
- Matthews BW, Sigler PB, Henderson R, Blow DM (1967) Three-dimensional structure of tosyl- α -chymotrypsin. *Nature* 214(5089):652–656
- Mendonça EG, de Almeida Barros R, Cordeiro G, da Silva CR, Campos WG, de Oliveira JA, de Almeida Oliveira MG (2020) Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. *Arch Insect Biochem Physiol* 103(1):e21637
- Meriño-Cabrera Y, Zanuncio JC, da Silva RS, Solis-Vargas M, Cordeiro G, Rainha FR, Campos WG, Picanço MC, de Almeida Oliveira MG (2018) Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. *Ann Appl Biol* 172(2):236–243
- Meriño-Cabrera Y, de Oliveira Mendes TA, Macedo MLR, de Almeida Oliveira MG (2019) Inhibition of digestive trypsin by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. *Ann Appl Biol* 175(3):336–349
- Meriño-Cabrera Y, de Oliveira Mendes TA, Castro JGS, Barbosa SL, Macedo MLR, de Almeida Oliveira MG (2020) Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatalis* trypsin by *Adenanthera pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. *Arch Insect Biochem Physiol* 104(3):e21687
- Mikel CE, Standish J (1947) Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum* (Herbst)
- Mishra UN, Reddy MV, Prasad DT (2020) Plant serine protease inhibitor (SPI): a potent player with bactericidal, fungicidal, nematicidal and antiviral properties. *Int J Chem Stud* 8(1):2985–2993
- Mochizuki A (1998) Characteristics of digestive proteases in the gut of some insect orders. *Appl Entomol Zool* 33(3):401–407



- Moreira LF, Campos WG, Ribeiro FR, Guedes RNC, Oliveira MGA (2011) Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). *Crop Prot* 30(10):1285–1290
- Muramatsu M, Fukazawa C (1993) A high-order structure of plant storage proprotein allows its second conversion by an asparagine-specific cysteine protease, a novel proteolytic enzyme. *Eur J Biochem* 215(1):123–132
- Norioka N, Hara S, Ikenaka T, Abe J (1988) Distribution of the Kunitz and the Bowman–Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agric Biol Chem* 52(5):1245–1252
- Novak P, Dev IK (1988) Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. *J Bacteriol* 170(11):5067–5075
- Paixão GP, Lourenção AL, Silva CR, Mendonça EG, Silva PL, Oliveira JA, Zanuncio JC, Oliveira MGA (2013) Biochemical responses of *anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. *J Agric Food Chem* 61(34):8034–8038
- Patarroyo-Vargas AM, Merino-Cabrera YB, Zanuncio JC, Rocha F, Campos WG, de Almeida Oliveira MG (2018) Kinetic characterization of *Anticarsia gemmatalis* digestive serine-proteases and the inhibitory effect of synthetic peptides. *Protein Pept Lett* 24(11)
- Patarroyo-Vargas AM, Cordeiro G, da Silva CR, da Silva CR, Mendonça EG, Visóto LE, Zanuncio JC, Campos WG, Oliveira MGA (2020) Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. *An Acad Bras Cienc* 92(Suppl 1):1–12
- Peng C, Ho BK, Chang TW, Chang NT (1989) Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol* 63(6):2550–2556
- Pilon FM, Visóto LE, Guedes RNC, Oliveira MGA (2013) Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 183(6):735–747
- Pilon AC, Valli M, Dametto AC, Pinto MEF, Freire RT, Castro-Gamboa I, Andricopulo AD, Bolzani VS (2017a) NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Sci Rep* 7(1):7215
- Pilon FM, da Rocha Silva C, Visóto LE, de Almeida Barros R, da Silva Júnior NR, Campos WG, de Almeida Oliveira MG (2017b) Purification and characterization of trypsin produced by gut bacteria from *Anticarsia gemmatalis*. *Arch Insect Biochem Physiol* 96(2):e21407
- Pilon AM, Campos WG, Silva CR, Cordeiro G, Silva CR, Oliveira MGA (2018) Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. *An Acad Bras Cienc* 90(4):3475–3482
- Plankum P, Fuchs SM, Wiyakrutta S, Raines RT (2003) Creation of a zymogen. *Nat Struct Biol* 10(2):115–119
- Pouvreau L, Gruppen H, Van Koningsveld GA, Van Den Broek LAM, Voragen AGJ (2003) The most abundant protease inhibitor in potato tuber (cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. *J Agric Food Chem* 51(17):5001–5005
- Qi RF, Song ZW, Chi CW (2005) Structural features and molecular evolution of Bowman–Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochim Biophys Sin Shanghai* 37:283–292
- Quilis J, Meynard D, Vila L, Avilés FX, Guiderdoni E, San Segundo B (2007) A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 5(4):537–553
- Quilis J, López-García B, Meynard D, Guiderdoni E, San Segundo B (2014) Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol J* 12(3):367–377
- Radanovic M, Anauate M (2013) P4–254: a phenomenological study of realistic picture copy in a case of advanced semantic dementia. *Alzheimers Dement* 9(4S_Part_20):P799
- Rahbé Y, Deraison C, Bonadé-Bottino M, Girard C, Nardon C, Jouanin L (2003) Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Sci* 164(4):441–450

- Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46(D1):D624–D632
- Reis DTC, dos Mares-Guia TR, de Oliveira JS, Santos AMC, Santoro MM, Oliveira MGA (2012) Purification of a membrane-bound trypsin-like enzyme from the gut of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Acta Sci Biol Sci* 34(3):263–270
- Riglietti A, Ruggiero P, Crecchio C (2008) Investigating the influence of transgenic tobacco plants codifying a protease inhibitor on soil microbial community. *Soil Biol Biochem* 40(12):2928–2936
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28(1):425–449
- Sabotić J, Kos J (2012) Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1351–1375
- Salier JP (1990) Inter- α -trypsin inhibitor: emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily. *Trends Biochem Sci* 15:435–439
- Santos ALS, Braga-Silva LA (2012) Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem* 13(1):155–162
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem* 46:941–950
- Senthilkumar R, Cheng CP, Yeh KW (2010) Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J* 8(1):65–75
- Shamsi TN, Parveen R, Ahmad A, Samal RR, Kumar S, Fatima S (2018) Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. *Acta Ecol Sin* 38:325–328
- Shao J, Zhao M, Tong M, Wei J, Wise MR, Stone P, Chamley L, Chen Q (2016) Increased levels of HMGB1 in trophoblastic debris may contribute to preeclampsia. *Reproduction* 152(6):775–784
- Silva-junior NR, de Almeida Oliveira MG (2021) Cinética De Inibição Das Proteases Digestivas De *Anticarsia Gemmatalis*:79–95
- Silva-Júnior NR, Cabrera YM, Barbosa SL, de Almeida Barros R, Barros E, Vital CE, Ramos HJO, Oliveira MGA (2021) Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. *Arch Insect Biochem Physiol* 107(3):e21792
- Sin SF, Chye ML (2004) Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* 219(6):1010–1022
- Singh S, Singh A, Kumar S, Mittal P, Singh IK (2020) Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect Sci* 27(2):186–201
- Stroud RM, Kossiakoff AA, Chambers JL (1977) Mechanisms of zymogen activation. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6:177–193
- Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri A, Gupta V (2003) Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63(6):643–652
- Thomas JC, Adams DG, Keppen VD, Wasmann CC, Brown JK, Kanost MR, Bohnert HJ (1995) Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. *Plant Cell Rep* 14(12):758–762
- Turrà D, Bellin D, Lorito M, Gebhardt C (2009) Genotype-dependent expression of specific members of potato protease inhibitor gene families in different tissues and in response to wounding and nematode infection. *J Plant Physiol* 166(7):762–774
- Valueva TA, Mosolov VV (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemist* 69:1305–1309

- Xu ZF, Qi WQ, Ouyang XZ, Yeung E, Chye ML (2001) A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Mol Biol* 47(6):727–738
- Zhao J, Ee KY (2018) Protease inhibitors. In: *Encyclopedia of food chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp 253–259
- Zhao A, Li Y, Leng C, Wang P, Li Y (2019) Inhibitory effect of protease inhibitors on larval midgut protease activities and the performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Front Physiol* 10:1–9
- Zhu-Salzman K, Zeng R (2015) Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annu Rev Entomol* 60(1):233–252

APÊNDICE B – Artigo I - Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors - Publicado na revista *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Ed. Wiley - <https://doi.org/10.1002/arch.21792>

Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors

Neilier R. Silva-Júnior¹  | Yaremis M. Cabrera¹ |
Samuel L. Barbosa¹ | Rafael de A. Barros¹ | Edvaldo Barros² |
Camilo E. Vital¹ | Humberto J. O. Ramos^{1,2}  |
Maria Goreti A. Oliveira¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Enzymology and Biochemistry of Proteins and Peptides, Universidade Federal de Viçosa, UFV, BIOAGRO/INCT-IPP, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Núcleo de Análise de Biomoléculas, NuBioMol, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCB, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Correspondence

Humberto J. de O. Ramos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Análise de Biomoléculas, NuBioMol, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

Email: humramos@ufv.br

Abstract

Although the importance of intestinal hydrolases is recognized, there is little information on the intestinal proteome of lepidopterans such as *Anticarsia gemmatalis*. Thus, we carried out the proteomic analysis of the *A. gemmatalis* intestine to characterize the proteases by LC/MS. We examined the interactions of proteins identified with protease inhibitors (PI) using molecular docking. We found 54 expressed antigens for intestinal protease, suggesting multiple important isoforms. The hydrolytic arsenal featured allows for a more comprehensive understanding of insect feeding. The docking analysis showed that the soybean PI (SKTI) could bind efficiently with the trypsin sequences and, therefore, insect resistance does not seem to involve changing the sequences of the PI binding site. In addition, a SERPIN was identified and the interaction analysis showed the inhibitor binding site is in contact with the catalytic site of trypsin, possibly acting as a regulator. In addition, this SERPIN and the identified PI sequences can be targets for the control of proteolytic activity in the caterpillar intestine and serve as a support for the rational design of a molecule with greater stability, less prone to cleavage by proteases and viable for the control of insect pests such as *A. gemmatalis*.

KEYWORDS

intestinal hydrolase, LC/MS profile, molecular docking, pest control, protease inhibitor, proteomics

1 | INTRODUCTION

Insects of the order Lepidoptera are among those that most negatively affect agricultural productivity in the world (Li et al., 2020; Romanazzi et al., 2020). The soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), is the main defoliating pest of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill, Fabaceae), causing severe damage in both the reproductive and vegetative stages of the plant (De Castro et al., 2013; Lima et al., 2020; Walker et al., 2000).

Faced with this challenge, agricultural pest control has focused on the use of synthetic insecticides over the past decades (Badran et al., 2016; Bel et al., 2019). However, its overuse and indiscriminate use have brought several environmental problems, contaminating groundwater, and compromising the food chain with consequences for human health (Campos et al., 2019; Pardo-López et al., 2013; Sousa et al., 2020). Besides the toxicity of these pesticides to nontarget individuals, resistant pest insects have been selected, calling attention to the urgent search for control alternatives (Coelho et al., 2020; Tavares et al., 2010). The Integrated Pest Management (IPM) programs emerged in this context to reduce the use of synthetic agrochemicals and the environmental damage caused by them (Panizzi, 2013).

More recently, bioinsecticides such as *Bacillus thuringiensis* toxin (Bt) (Badran et al., 2016; Bel et al., 2019), secondary metabolites (phytochemicals) (Gomez et al., 2018, 2020; Lourenço et al., 2018), and protease inhibitors (PI) specific for target pests have gained prominence as alternatives in insect control, minimizing toxic effects on other animals, and the environment (Meriño-Cabrera et al., 2018; Pilon et al., 2017; da Silva Júnior et al., 2020). PIs are naturally produced as a response strategy for plants, developed throughout the evolutionary process (Cotabarren et al., 2020; Singh et al., 2020). When the plant is subjected to herbivory, its response machinery leads to the production of PI by lipoxygenase pathway (Feussner & Wasternack, 2002; Gardner, 1991; Lima De Carvalho et al., 1999; Ryan, 1990; Thakur & Udayashankar, 2019), leading to the formation of jasmonic acid. This plant hormone activates genes responsible for the production of PI, which can occur locally or systemically. Upon reaching the insect's intestine, PIs bind to specific proteases and compromise the insect's digestibility, reducing the absorption of essential amino acids from the diet. Consequently, impaired nutritional balance affects the development of the insect, which can lead to death (De Oliveira et al., 2019).

Endogenous serine protease inhibitors are widely found in animal tissues. SERPINs form a large class of protease inhibitors, being mainly intracellular and undergoing a unique change in shape when they inhibit target proteases (Sanrattana et al., 2019). These PIs regulate processes such as coagulation, inflammation, and immunity (Lucas et al., 2018). So far, the known insect SERPINs are involved in insect immunity (Abraham et al., 2005). However, some SERPIN insect inhibitors can bind to hydrolytic enzymes and block substrate access to the region of the active center (Toubarro et al., 2013). Therefore, these molecules can be the target of molecular studies as a fresh alternative in pest control.

Insects express multiple isoforms of important digestive enzymes. This functional redundancy aims to circumvent the toxic effect of PIs from the plant (Lomate & Hivrale, 2011), besides having an important role in adapting the insect to the protein variation of the diet (Crava et al., 2013; Kotkar et al., 2009). In this sense, knowing which proteases isoforms are present in the insect's intestine pest is fundamental so that efficient PIs can be rationally proposed. Therefore, this study aimed to identify and describe the proteases of the *A. gemmatilis* intestine.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Insects and preparation of the artificial diet

A. gemmatilis caterpillars were obtained from the Insects Laboratory of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil and maintained under controlled conditions of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature, $70 \pm 10\%$ relative humidity and 12 h photophase. The caterpillars were fed after hatching the eggs until they reached the fifth instar of larval development on an artificial diet comprising 15.6 g of brewer's yeast, 25 g of wheat germ, 31.2 g of beans, 25 g of soy protein, 12.5 g of casein, 2.5 ml of vitamin solution (1.2% ascorbic acid, 0.03% calcium pantothenate, 0.015% niacin, 0.008%, riboflavin, 0.004% thiamine, and 0.004% HCl) and 10 g of agar (Greene et al., 1976).

2.2 | Extraction protein from the caterpillar intestines and quantification

Intestines larvae in the fifth instar were dissected and placed in 1 ml of 10^{-3} M hydrochloric acid solution at 4°C , always maintaining the ratio of five intestines per 1 ml solution. Cell lysis got the protein extract containing the protolithic enzymes resulting from three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing, followed by maceration on TissueLyser II (Qiagen). The extract was centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4°C , and the pellets were discarded. The supernatants containing the soluble material were separated and stored at -20°C .

2.3 | PEG fractionation

Part of the crude extract from the intestine of caterpillars in the fifth instar was fractionated with polyethylene glycol (PEG) for separation of the proteins of low and high abundance before 1DE-liquid chromatography/mass spectrometry (1DE-LC/MS) analysis (Figure 1). For this, 10 ml of the crude extract was added in 10 ml of 30% aqueous PEG4000 solution. The solution was mixed by vortex for 30 s, kept on ice for 30 min and centrifuged at $3200 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatant, containing low-abundance proteins, was collected and stored at -20°C until further analysis. The pellet was resuspended with 10 ml of 20% trichloroacetic acid (TCA). Subsequently, it was centrifuged at $6000 \times g$ for 30 min at 4°C . The supernatant was stored and the pellet was resuspended and washed for two cycles with 80% acetone on ice and centrifuged at $6000 \times g$ for 10 min at 4°C . Finally, the pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature. The different fractions were used in electrophoretic runs. The protein concentrations of samples from crude extract and PEG precipitation were quantified by the Bradford assay (1976). A standard curve was prepared with increasing concentrations of bovine serum albumin (BSA) between 0 and $15 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$.

2.4 | Short-run gels

Low and high-abundance proteins were applied in the unidimensional polyacrylamide gels (1DE) before the tryptic digestion (Figure 1). Electrophoresis was performed under denaturing conditions according to the method of Laemmli (1970). The separation gel used was 1.5 mm thick and had a 10% concentration of polyacrylamide buffered in 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8. Each channel received $50 \mu\text{g}$ of total proteins, derived from samples previously boiled with sample buffer composed of 277.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 44.4% glycerol, and 4.4% sodium dodecyl sulfate (SDS). The electrophoretic run occurred at 200 V until the proteins entered 1.0 cm in the separation gel and

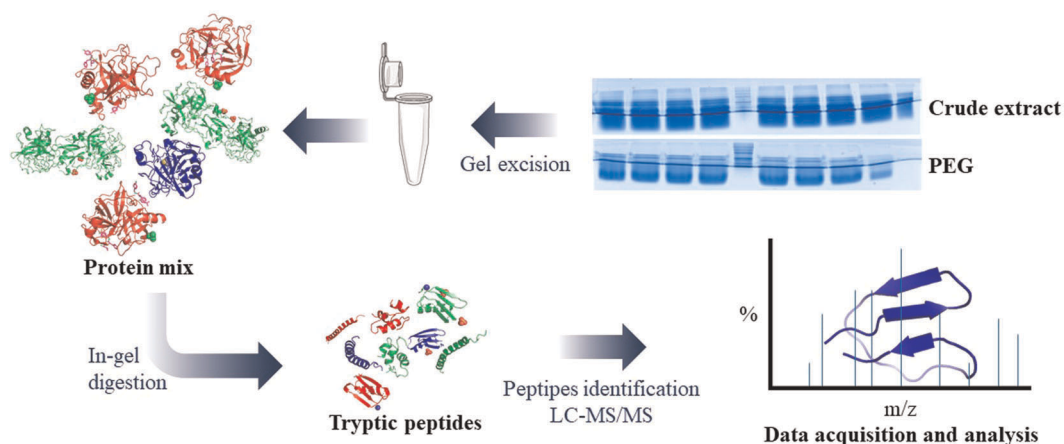


FIGURE 1 Workflow showing the strategy used for characterization of the intestine proteome of the caterpillars by 1DE-LC/MS. The gels containing samples of crude extract and treated with polyethylene glycol. The stained gel regions were excised and grouped in three, making up a repeat. Each repetition was digested separately and the triptych peptides identified by LC-MS/MS. LC-MS, liquid chromatography/mass spectrometry

the run was stopped. The gel was fixed in an aqueous solution of 10% methanol and 5% acetic acid for 2 h with stirring. The staining was carried out in the coomassie G250 solution for 48 h.

2.5 | In-gel digestion and mass spectrometry for protease identification

The regions of the gels containing proteins were excised and proceeded to the steps of tryptic digestion, as shown in Figure 1. Slices of the gel excised were discolored in 50 mM ammonium bicarbonate and 50% methanol (v/v), followed by acetonitrile addition for dehydration. The proteins were then reduced by adding 200 mM dithiothreitol (DTT) solution in 100 mM of ammonium bicarbonate for 30 min of incubation at 56°C, followed by alkylation with 200 mM of iodoacetamide solution containing 100 mM of ammonium bicarbonate for 30 min at room temperature. The pieces of gel containing proteins were washed with 100 mM of ammonium bicarbonate solution, dehydrated with acetonitrile and dried using vacuum centrifugation. The gels were rehydrated using trypsin digestion solution overnight (20 h) at 37°C. The digested peptides were extracted using an extraction buffer (50% acetonitrile and 5% formic acids) and dried using vacuum centrifugation. The samples were desalted using C18 ZipTips (Millipore) and dried using vacuum centrifugation.

The peptides were dissolved in 20 μ l of 0.1% formic acid and analyzed using a nanoAcquity (Waters) UPLC system equipped with trapping (nanoAcquity UPLC 2G-V/MTrap 5 μ m Symmetry C18 180 μ m \times 20 mm) and an analytical column (nanoAcquity UPLC 1.7 μ m BEH130 100 μ m \times 100 mm) operating at a flow rate of 0.3 μ l min^{-1} . The solvent used was: (A) formic acid 0.1% in water and (B) formic acid 0.1% in acetonitrile in a gradient of time/% B: 0/2; 1/2; 300/30; 305/85; 310/85; 315/2; 320/2. The eluted peptides were automatically injected into a mass spectrometer Q-ToF MAXIS 3G (Bruker Daltonics) using a nanoESI ionization needle (CaptiveSpray), dry gas 3 L min^{-1} , at 150°C, 2000 V.

The scanning of the ions from the mass spectrometer was carried out between 300 and 1500 m/z in positive mode, and the data were acquired through LC-MS/MS analysis. The mass spectrometer operated in auto-MSn mode. The acquisition of data from the LC/MS instrument was controlled using Hystar software (Bruker Daltonics) and the spectra were processed with Data Analysis software (Bruker) using the default settings for proteomics. The spectra were analyzed by PEAKS 7.0 program with a local Client license, connected to a remote server for

protein identification. The parameters used in the program were: a translated ESTs database from the midgut of *A. gemmatalis*, containing DNA contigs from transcribed RNA sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/308354); methionine oxidation as a variable modification of cysteine carbamidomethylation as a fixed modification; one missed cleavage, charge states of 2+, 3+, and 4+; trypsin-like cleavage enzyme, and a mass error of 50 ppm. For protein identification, we considered a false discovery rate (FDR) less than 1.0% along with at least three unique peptides.

2.6 | Functional annotation of the identified protein

The filtered list of identified ORFs by LC/MS from *A. gemmatalis* ESTs database was exported from the Peaks package as a fasta file and used as input for a homology search against *Bombyx mori* genes database. The exported DNA sequences were aligned using the blastn tool of the Lepbase (the Lepidopteran genome database, <http://blast.lepbase.org/>) using default search parameters. We selected all genes that code for hydrolase and PI. Subsequently, the outputs that had the highest score were manually sieved to ensure better accuracy and cancel redundancies in the identifications. The names and functional classifications of the homologous proteins described for *B. mori* were extracted from UniProt and Lepbase.

2.7 | Multiple sequences alignment and phylogenetic reconstruction

To explore sequence diversity and analyze sequence variability, especially for trypsin active and regulatory, the consensus boundaries of the core trypsin domain in the sequences, included in the phylogenetic analyzes, were determined from full-length sequences identified in the previous part. For this, it was combining the outputs of Pfam (Finn et al., 2016) and ScanProsite (de Castro et al., 2006) protein domain prediction search engines. The trypsin amino acid sequences were aligned with the resolved three-dimensional structure using PROMALS3D (Pei et al., 2008), a multiple sequence alignment program that incorporates structural information to improve alignment accuracy.

The phylogenetic reconstruction implemented for the analysis of several trypsins of *A. gemmatalis* was performed by PhyML, a maximum likelihood (ML)-based program which optimizes a seed Neighbor-Joining tree by using a simple hillclimbing algorithm, implemented in the Phylogeny.fr web server (<http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/alacarte.cgi>) (Dereeper et al., 2010). The protein tree was visualized and optimized with the TreeDyn tool also implemented on the Phylogeny for a web server. The program ConSurf (Lima et al., 2020) was employed to estimate conservation of amino acid residues of *A. gemmatalis* trypsin. For this purpose, the multiple sequence alignment output of the entire trypsin homologous amino acid sequences analyzed in this study was used as input to the program to project the conservation grades of residues on the known three-dimensional structure of the *A. gemmatalis* 2 trypsin (XM_004928940.1).

2.8 | Molecular modeling and docking

Besides the hydrolases identified by analyzing the intestinal proteome of *A. gemmatalis*, a serine protease inhibitor (SERPIN) has been identified, and its potential for inhibiting trypsins has been evaluated through interaction analysis using protein modeling and molecular docking. The Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor (SKTI) was used as a control protein to compare the strength and type of interaction of the endogenous SERPIN. The three-dimensional structures were predicted for the 13 trypsin-like sequences and the two inhibitor proteins (SERPIN and SKTI) using the Phyre2 server (Kelley et al., 2015). This technique is approximately 80% accurate if the backbone is correct

(Kelley et al., 2015). The models quality were measured by evaluation of geometry and stereochemistry, energy distribution, and other characteristics of the 3D models using the webserver PROSA (Protein Structure Analysis) analysis package (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) and analyze Ramachandran Plot.

The docking between trypsins and inhibitors was performed using the program CLUSPRO (Kozakov et al., 2013, 2017), getting in total 26 docked systems. The binding mode between inhibitors and proteins was visualized and analyzed using the program PyMOL (Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrodinger, LLC). The conservation of amino acids from inhibitors involved in potential interactions with the trypsins was carried out using the webserver WebLogo (Crooks et al., 2004).

3 | RESULTS

3.1 | Sample treatment, SDS-PAGE, and identification

It was possible to verify difference in protein patterns between the crude extract (A) and after the precipitation with PEG (B) (Figure 2), showing that the sample treatment with PEG was efficient. Besides, the efficiency of PEG fractionation can also be verified in the chromatograms (Figure 3). The chromatograms got for the crude extract samples (Figure 3a) and precipitated with PEG (Figure 3b) presented different profiles.

The analysis of both samples was performed separately by LC/MS, which revealed a total of 572 ORFs using *A. gemmatalis* transcripts as reference. When compared with the *B. mori* bank, 219 nonredundant homologous proteins were identified. Seventeen and five isoforms were identified for trypsin and chymotrypsin respectively (Table 1). We identified 43 serine proteases (EC 3.4.12 and 3.4.16), corresponding to 79% of the identified and characterized proteases. Altogether, we identified 98 hydrolases (EC 3), 6 PI and 13 uncharacterized proteins (Figure 4). Of the 98 hydrolases identified, 54 correspond to peptidases (EC 3.4).

Besides grouping the hydrolases into their respective subclass, we also classified the proteins identified with known function into five functions, based on the Gene Ontology (GO). Those with unknown cell function corresponded to 11%. From this functional classification, we observed that 31% of the identified proteins are

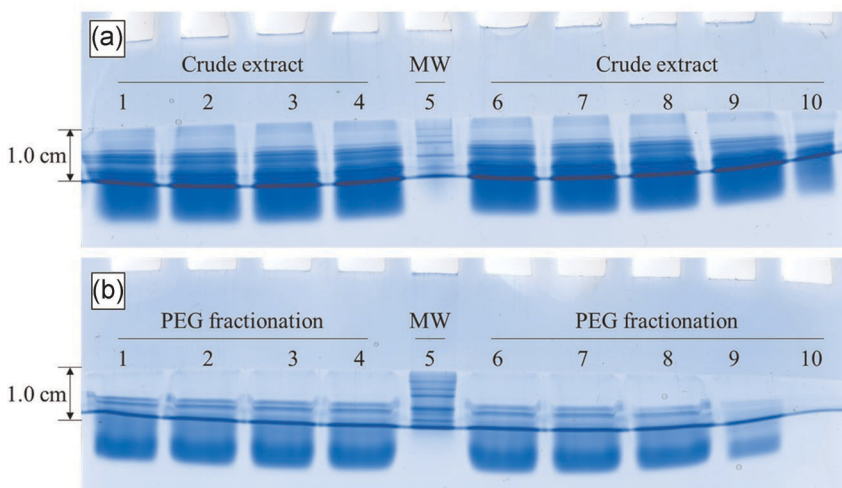


FIGURE 2 Protein analysis by a short-run SDS-PAGE strategy of *Anticarsia gemmatalis* intestines. In the lane 5 molecular weight standard. In the lanes 1–4 and 6–10 proteins from crude extract (a) and PEG fractionation (b). PEG, polyethylene glycol; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

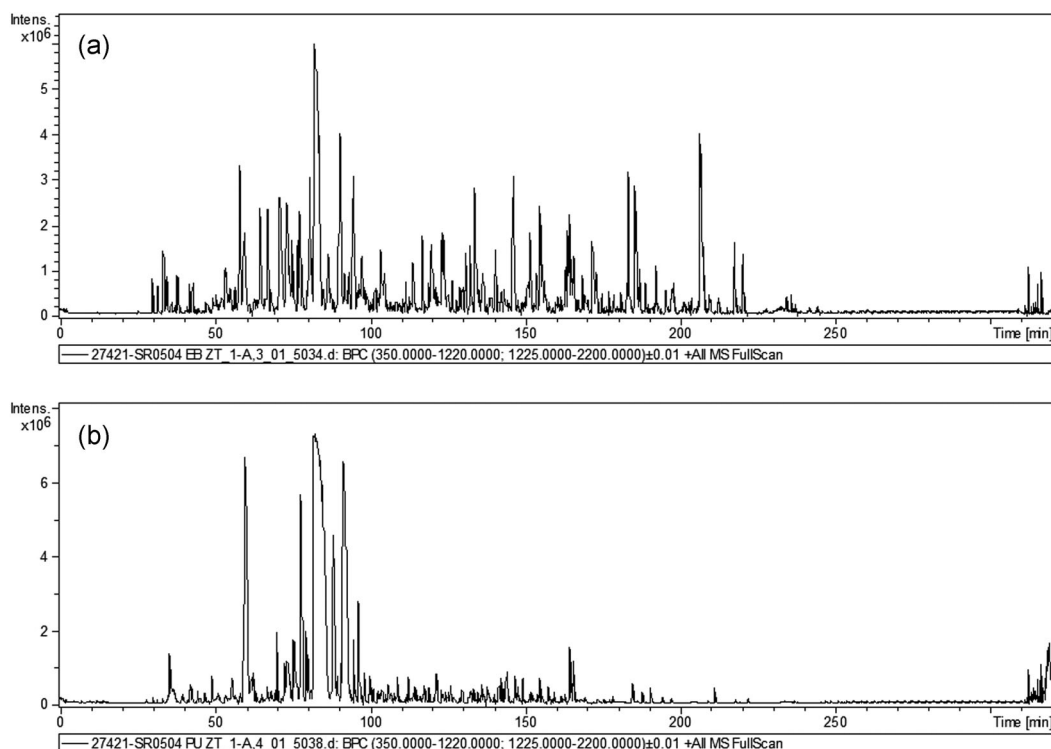


FIGURE 3 Total ion Chromatograms (TIC) got from the LC-MS/MS platform of complex samples of crude extract (a) and after fractionation with PEG (b). LC-MS, liquid chromatography/mass spectrometry; PEG, polyethylene glycol

related to metabolic and cell signaling processes (Figure 5), such as ribosomal proteins, membrane signaling, and involved in cell respiration. The secreted enzymes comprised the most expressive slice of the identified proteins (53%). Transmembrane proteins represented 2% of the identifications and contain isoforms of serine proteases that contribute substantially to the total proteolytic activity in the caterpillar intestine which is the major focus of this study. Structural and reserve proteins represented 1% of those identified (Figure 5).

3.2 | Multiple sequences of alignment and phylogenetic reconstruction

Because the highest percentage of identified proteins was represented by serine endopeptidases (34.5%), and from this group of proteins all were trypsin-like enzymes, they were chosen for further structural analysis for their high expression in the gut of *A. gemmatilis* and possible inhibition targets.

For the visualization of the results, only one trypsin was used (NM_001043572.1), but all the analyzes were made in all 13 identified sequences.

Our inspection of the multiple sequence and structure alignment using Promals3D with 13 trypsin of insect *A. gemmatilis* showed the invariant residues of the active-site catalytic triad (Figure 6). The first line in each block (Figure 6) shows conservation indices for positions with a conservation index above 4, when 9 is the maximum value. The conservation indexes by the catalytic residues were 6, 9, and 8 by the Hys, Asp, and Ser, respectively. The consensus predicted secondary structure by Asp and Ser was Beta-strand (e), and Hys is part of an Alpha-helix (h) (Figure 6).

TABLE 1 Identification of hydrolase from the fifth instar *Anticarsia gemmatilis* intestines by liquid chromatography-mass spectrometry

Sub-subclass	Description	Query <i>A. gemmatilis</i>	Gene <i>Bombyx mori</i>	Score	Identities
Carboxylic-ester hydrolases	Bile salt-activated lipase-like	GFUV01000494.1_527	LOC101737366	96.8649 (106)	149/209 (71.29)
Carboxylic-ester hydrolases	Time interval measuring enzyme-esterase A4	GFUV01000849.1_899	LOC692772	131.129 (144)	226/330 (68.48)
Glicosidases	Alpha amylase	GFUV01000649.1_693	LOC100500759	96.8649 (106)	80/98 (81.63)
Glicosidases	Alpha amylase	GFUV01001924.1_2019	LOC100500759	86.0446 (94)	91/119 (76.47)
Glicosidases	Beta-fructofuranosidase	GFUV01001357.1_1425	LOC100145905	286.219 (316)	921/ 1404 (65.60)
Glicosidases	Glucosidase	GFUV01000088.1_98	LOC692627	302.449 (334)	291/372 (78.23)
Glicosidases	Maltase 2-like	GFUV01000649.1_693	LOC101738762	102.275 (112)	189/275 (68.73)
Glicosidases	Maltase A1-like	GFUV01000649.1_693	LOC101738628	206.87 (228)	301/424 (70.99)
Glicosidases	Myrosinase 1	GFUV01005532.1_5832	LOC101741245	183.427 (202)	378/553 (68.35)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01000088.1_98	LOC101737930	77.0278 (84)	83/110 (75.45)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01000103.1_114	LOC101737249	147.359 (162)	378/571 (66.20)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01000398.1_429	LOC101737249	242.938 (268)	545/802 (67.96)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01000811.1_860	LOC101741385	105.882 (116)	225/330 (68.18)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01001071.1_1129	LOC101738689	179.82 (198)	329/473 (69.56)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01001367.1_1435	LOC101736497	235.724 (260)	668/998 (66.93)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01002356.1_2471	LOC101736636	169.0 (186)	160/203 (78.82)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01002650.1_2772	LOC101737930	77.0278 (84)	83/110 (75.45)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01003681.1_3834	LOC101737930	210.477 (232)	246/331 (74.32)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01004009.1_4191	LOC101736379	167.196 (184)	289/412 (70.15)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01004362.1_4545	LOC101736636	179.82 (198)	210/282 (74.47)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01004616.1_4830	LOC101737249	215.887 (238)	348/498 (69.88)

TABLE 1 (Continued)

Sub-subclass	Description	Query <i>A. gemmatalis</i>	Gene <i>Bombyx mori</i>	Score	Identities
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01004824.1_5038	LOC101738689	77.0278 (84)	135/195 (69.23)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01005158.1_5372	LOC101747172	69.8143 (76)	156/233 (66.95)
Glicosidases	Myrosinase 1-like	GFUV01005622.1_5922	LOC101736636	125.719 (138)	115/144 (79.86)
Glicosidases	Uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	GFUV01000144.1_155	LOC733140	609.022 (674)	738/ 1002 (73.65)
Glicosidases	Uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161	GFUV01005558.1_5858	LOC733140	208.674 (230)	229/298 (76.85)
Ether hydrolases	Juvenile hormone epoxide hydrolase-like protein 5	GFUV01000754.1_800	LOC100415790	412.454 (456)	738/ 1071 (68.91)
Aminopeptidases	Aminopeptidase N	GFUV01000653.1_697	LOC692370	246.544 (272)	461/670 (68.81)
Aminopeptidases	Aminopeptidase N3	GFUV01000223.1_242	LOC100127057	562.134 (622)	946/ 1353 (69.92)
Aminopeptidases	Aminopeptidase N3	GFUV01005935.1_6235	LOC100127057	250.151 (276)	291/393 (74.05)
Aminopeptidases	Putative aminopeptidase W07G4.4	GFUV01002991.1_3133	LOC101742623	508.033 (562)	807/ 1145 (70.48)
Aminopeptidases	Xaa-Pro aminopeptidase 1	GFUV01003879.1_4060	LOC101742084	104.078 (114)	232/347 (66.86)
Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases	Venom dipeptidyl peptidase 4-like	GFUV01001023.1_1077	LOC101742792	178.016 (196)	158/198 (79.80)
Serine-type carboxypeptidases	Carboxypeptidase B-like	GFUV01000837.1_887	LOC101745363	439.505 (486)	641/902 (71.06)
Serine-type carboxypeptidases	Carboxypeptidase B-like	GFUV01001100.1_1158	LOC101740853	295.235 (326)	450/638 (70.53)
Serine-type carboxypeptidases	Carboxypeptidase B-like	GFUV01001531.1_1607	LOC101740853	470.162 (520)	822/ 1185 (69.37)
Serine-type carboxypeptidases	Carboxypeptidase B-like	GFUV01001656.1_1737	LOC101745363	390.814 (432)	560/779 (71.89)
Serine-type carboxypeptidases	Carboxypeptidase Q-like	GFUV01001131.1_1192	LOC101744086	769.521 (852)	973/ 1331 (73.10)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Sub-subclass	Description	Query <i>A. gemmatalis</i>	Gene <i>Bombyx mori</i>	Score	Identities
Metalloproteases	Zinc carboxypeptidase-like	GFUV01000385.1_415	LOC101745066	116.702 (128)	375/576 (65.10)
Metalloproteases	Zinc carboxypeptidase-like	GFUV01001070.1_1128	LOC101745066	73.4211 (80)	64/80 (80.00)
Omega peptidases	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8-like	GFUV01006063.1_6363	LOC101736709	143.752 (158)	121/149 (81.21)
Serine endopeptidases	35 kDa protease	GFUV01002854.1_2983	LOC692590	95.0615 (104)	232/347 (66.86)
Serine endopeptidases	Brachyurin-like	GFUV01000120.1_131	LOC101740293	221.297 (244)	428/623 (68.70)
Serine endopeptidases	Brachyurin-like	GFUV01000120.1_131	LOC101740293	221.297 (244)	428/623 (68.70)
Serine endopeptidases	Brachyurin-like	GFUV01000161.1_176	LOC101740147	69.8143 (76)	116/168 (69.05)
Serine endopeptidases	Brachyurin-like	GFUV01002171.1_2280	LOC101738048	203.264 (224)	274/382 (71.73)
Serine endopeptidases	Cathepsin B	GFUV01004118.1_4300	LOC692390	239.331 (264)	242/315 (76.83)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-2-like	GFUV01000022.1_25	LOC101737248	179.82 (198)	245/335 (73.13)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-like elastase family member 1	GFUV01002250.1_2359	LOC692380	75.2244 (82)	94/129 (72.87)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-like elastase family member 1	GFUV01004555.1_4769	LOC692380	187.033 (206)	314/454 (69.16)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-like serine protease	GFUV01000464.1_495	LOC732967	96.8649 (106)	184/271 (67.90)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-like serine protease	GFUV01002278.1_2387	LOC732967	105.882 (116)	125/170 (73.53)
Serine endopeptidases	Chymotrypsin-like serine protease	GFUV01002651.1_2773	LOC732967	104.078 (114)	122/165 (73.94)
Serine endopeptidases	Serine protease	GFUV01000011.1_13	LOC692357	86.0446 (94)	143/205 (69.76)
Serine endopeptidases	Serine protease	GFUV01000036.1_41	LOC692357	93.2581 (102)	125/169 (73.96)
Serine endopeptidases	Serine protease	GFUV01000098.1_109	LOC692447	95.0615 (104)	181/265 (68.30)
Serine endopeptidases	Serine protease	GFUV01000228.1_247	LOC692447	68.0109 (74)	74/96 (77.08)
Serine endopeptidases	Serine protease	GFUV01003174.1_3317	LOC692357	192.443 (212)	252/341 (73.90)
Serine endopeptidases	Serine protease inhibitor 21	GFUV01000723.1_769	LOC100272186	176.213 (194)	599/924 (64.83)

TABLE 1 (Continued)

Sub-subclass	Description	Query <i>A. gemmatalis</i>	Gene <i>Bombyx mori</i>	Score	Identities
Serine endopeptidases	Transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000027.1_31	LOC101735750	127.522 (140)	161/220 (73.18)
Serine endopeptidases	Transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000161.1_176	LOC101735750	109.488 (120)	193/279 (69.18)
Serine endopeptidases	Transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000278.1_304	LOC101735750	98.6682 (108)	189/274 (68.98)
Serine endopeptidases	Transmembrane protease serine 9-like	GFUV01000792.1_838	LOC101735750	66.2076 (72)	108/156 (69.23)
Serine endopeptidases	Transmembrane protease serine 9-like	GFUV01004166.1_4348	LOC101735750	116.702 (128)	301/454 (66.30)
Serine endopeptidases	Trypsin alpha-3-like	GFUV01004150.1_4332	LOC101739308	111.292 (122)	267/399 (66.92)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline A-like	GFUV01000428.1_459	LOC101737834	95.0615 (104)	128/178 (71.91)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01000200.1_218	LOC101738353	132.932 (146)	402/605 (66.45)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01000683.1_727	LOC101738353	179.82 (198)	157/193 (81.35)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01000813.1_862	LOC101747046	136.539 (150)	254/372 (68.28)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01000954.1_1007	LOC101736414	78.8312 (86)	138/201 (68.66)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01000974.1_1027	LOC101738353	125.719 (138)	251/369 (68.02)
Serine endopeptidases	trypsin, alkaline C-like	GFUV01001099.1_1157	LOC101738353	147.359 (162)	238/335 (71.04)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01001224.1_1286	LOC101738353	98.6682 (108)	138/191 (72.25)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01001333.1_1396	LOC101736414	68.0109 (74)	63/80 (78.75)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01001769.1_1859	LOC101738624	77.0278 (84)	187/279 (67.03)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01001775.1_1865	LOC101738353	203.264 (224)	204/264 (77.27)
Serine endopeptidases	Trypsin, alkaline C-like	GFUV01005229.1_5443	LOC101738353	111.292 (122)	107/135 (79.26)
Serine endopeptidases	Venom serine protease-like, transcript variant X1	GFUV01001559.1_1635	LOC101744823	132.932 (146)	267/395 (67.59)
Serine endopeptidases	Venom serine protease-like, transcript variant X1	GFUV01003194.1_3337	LOC101744823	136.539 (150)	247/361 (68.42)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Sub-subclass	Description	Query <i>A. gemmatalis</i>	Gene <i>Bombyx mori</i>	Score	Identities
Metalloendopeptidases	Collagenase-like	GFUV01000489.1_522	LOC101735472	80.6345 (88)	120/168 (71.43)
Hydrolases acting in nitriles	Aliphatic nitrilase	GFUV01000757.1_803	LOC100329149	987.729 (1094)	919/ 1167 (78.75)
Hydrolases acting on phosphorous-nitrogen bonds	Phosphohistidine phosphatase	GFUV01000316.1_343	LOC692960	109.488 (120)	153/215 (71.16)
-	Antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01001446.1_1515	LOC692739	78.8312 (86)	174/257 (67.70)
-	Antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01001743.1_1833	LOC692739	118.505 (130)	379/583 (65.01)
-	Antitrypsin, transcript variant 3	GFUV01002634.1_2756	LOC692739	78.8312 (86)	141/205 (68.78)
-	Serine protease inhibitor 2	GFUV01006839.1_7139	LOC692573	100.472 (110)	120/161 (74.53)
-	Uncharacterized LOC100500745	GFUV01002171.1_2280	LOC100500745	91.4547 (100)	155/225 (68.89)
-	Uncharacterized LOC101735686	GFUV01000435.1_466	LOC101735686	223.101 (246)	340/480 (70.83)
-	Uncharacterized LOC101735686	GFUV01004411.1_4594	LOC101735686	141.949 (156)	157/207 (75.85)
-	Uncharacterized LOC101735686	GFUV01005222.1_5436	LOC101735686	131.129 (144)	160/216 (74.07)
-	Uncharacterized LOC101736728	GFUV01004657.1_4871	LOC101736728	315.072 (348)	326/427 (76.35)
-	Uncharacterized LOC101737875, transcript variant X5	GFUV01000735.1_781	LOC101737875	279.005 (308)	491/713 (68.86)
-	Uncharacterized LOC101743712	GFUV01003921.1_4102	LOC101743712	152.769 (168)	168/224 (75.00)
-	Uncharacterized LOC101743760	GFUV01006166.1_6466	LOC101743760	152.769 (168)	253/361 (70.08)
-	Uncharacterized LOC101744336	GFUV01000685.1_729	LOC101744336	675.746 (748)	828/ 1128 (73.40)
-	Uncharacterized LOC105842978	GFUV01001986.1_2088	LOC105842978	100.472 (110)	132/178 (74.16)

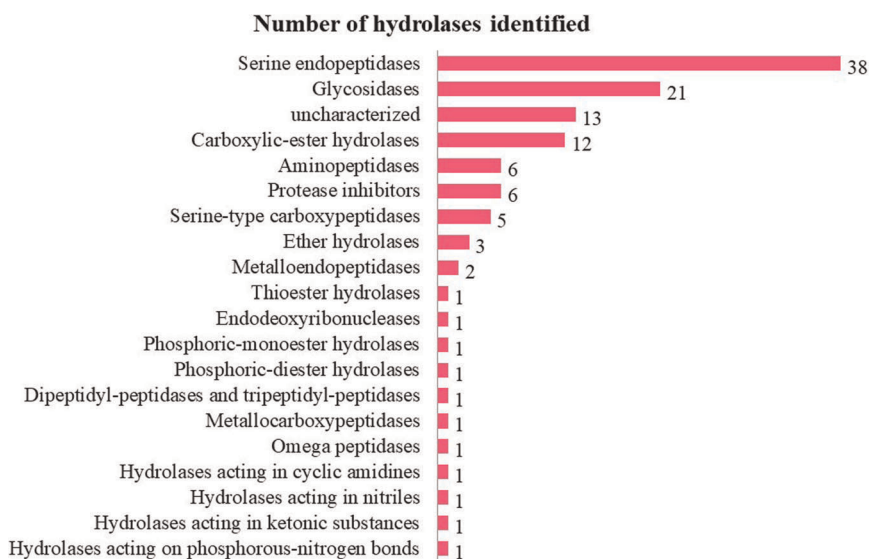


FIGURE 4 Functional classification of the hydrolases identified by LC/MS according to EC (enzyme classification) at subclass level

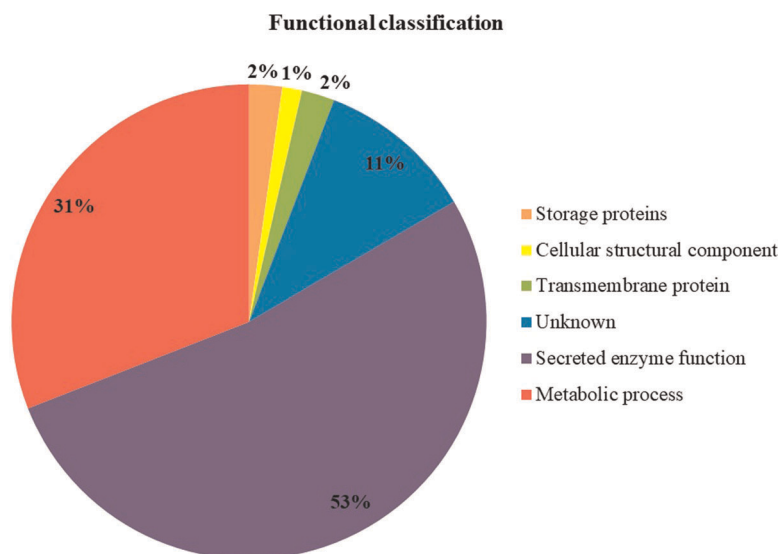


FIGURE 5 Ontological and functional classification of enzymes identified in the intestine of *Anticarsia gemmatilis*

To examine the relationships among trypsin proteins identified in *A. gemmatilis* gut and trypsin of *B. mori*, 14 sequences were aligned and used to construct a phylogeny (Figure 7a). The phylogenetic analysis revealed that these sequences clustered in distinct clades separated with high bootstrap support (above 0.7) (Figure 7a). Overall, the sequence alignment of *A. gemmatilis* displays multiple highly conserved amino acids, like showed in the consurf analysis (Figure 7b). The degree of conservation of the three catalytically important amino acids is shown in the predicted three-dimensional structure of the *A. gemmatilis* trypsin (Figure 7b) where they appear to be in the most conserved region.

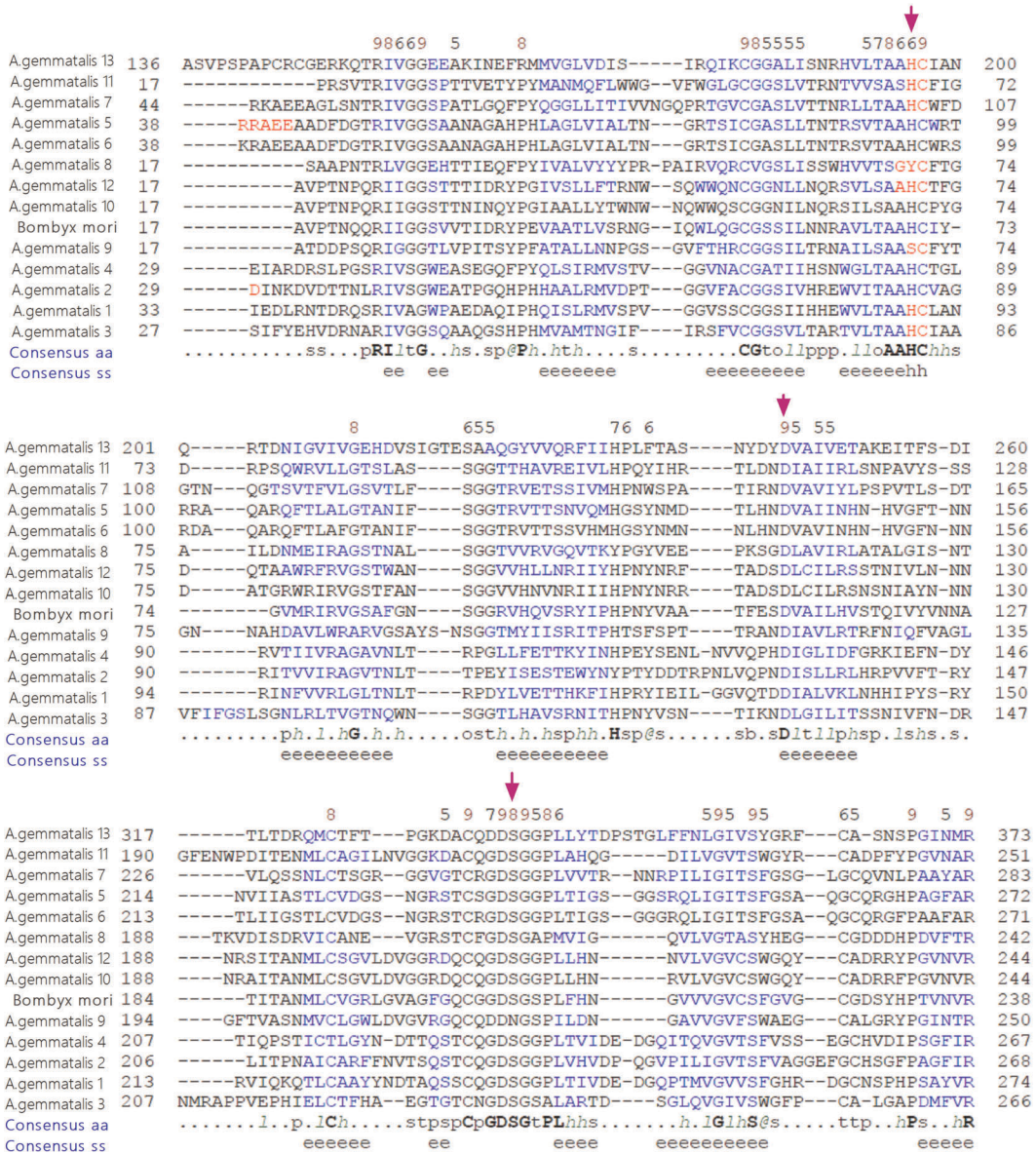


FIGURE 6 Multiple sequence alignments of the 13 sequences of the *Anticarsia gemmatalis* and *Bombyx mori* sequence according to the secondary structure using the server Promals3D (<http://prodata.swmed.edu/promals/promals.php>). The black box showed the amino acid changes

3.3 | Tertiary structure prediction and assessment of the models

Three-dimensional modeling of all (13 sequences) *A. gemmatalis* trypsins was estimated by the Protein Homology/ analogY Recognition Engine 2.0 (PHYRE2) (Figure 8a,b). PHYRE2 uses profile-profile matching and secondary structure for the prediction of tertiary structure. This server also uses the alignment of hidden Markov models via HHsearch (Söding, 2005; Söding, et al., 2005) to significantly improve the accuracy of alignment and detection rate. The models of the trypsins by PHYRE2 were predicted with 100% confidence and identity above 30% (Table S1).

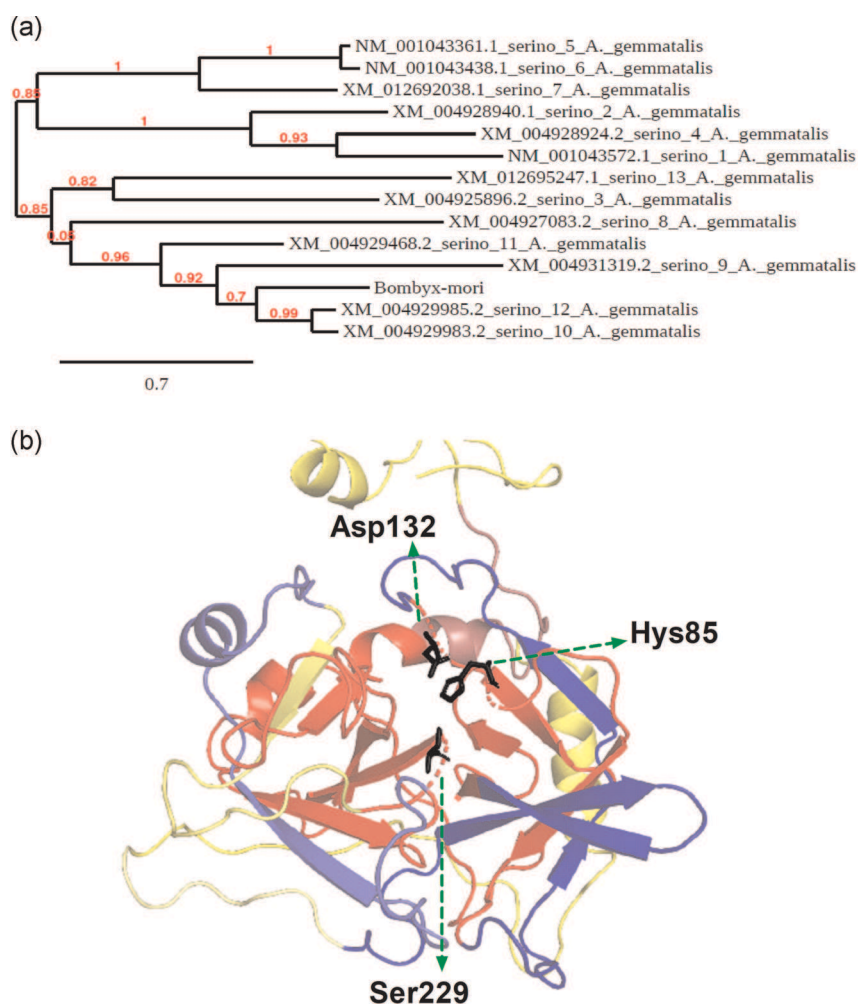


FIGURE 7 (a) Phylogenetic tree: an unrooted Bayesian inference tree constructed from the alignment of amino acid sequences presented in Figure 6. (b) Tertiary structure of *A. gemmatalis* 1 trypsin identified in this study (NM_001043572.1). Graphic visualization of the protein color-coded by conservation score, where the region in red corresponds to the most highly conserved region. Trypsin is represented as a cartoon. The three conserved amino acid residues (His, Asp and Ser) are indicated in sticks. Only one (NM_001043572.1) of the trypsin structures is used for visualization as a consensus model of the 13 identified sequences, but all analyzes were performed for all sequences

The first validation of the stereochemical quality was carried out using Ramachandran plot analysis computed with PROCHECK by checking residue-by-residue of the protein structures. The analysis showed that residues of *A. gemmatalis* trypsins in the most favored region added to the allowed region were above 95% and the outlier region was between 3.7% and 1.9% (Table S1). The plot revealed that the tertiary structure of all trypsins has good chains stereochemistry.

The interaction energy per residue was also calculated by the PROSA program. The PROSA Z-Score shows overall model quality. Global analysis of the model trypsins with PROSA showed a Z-Score between -2.51 to -6.19 (Table S1), showing no significant deviation from typical native structures of similar size as the template.

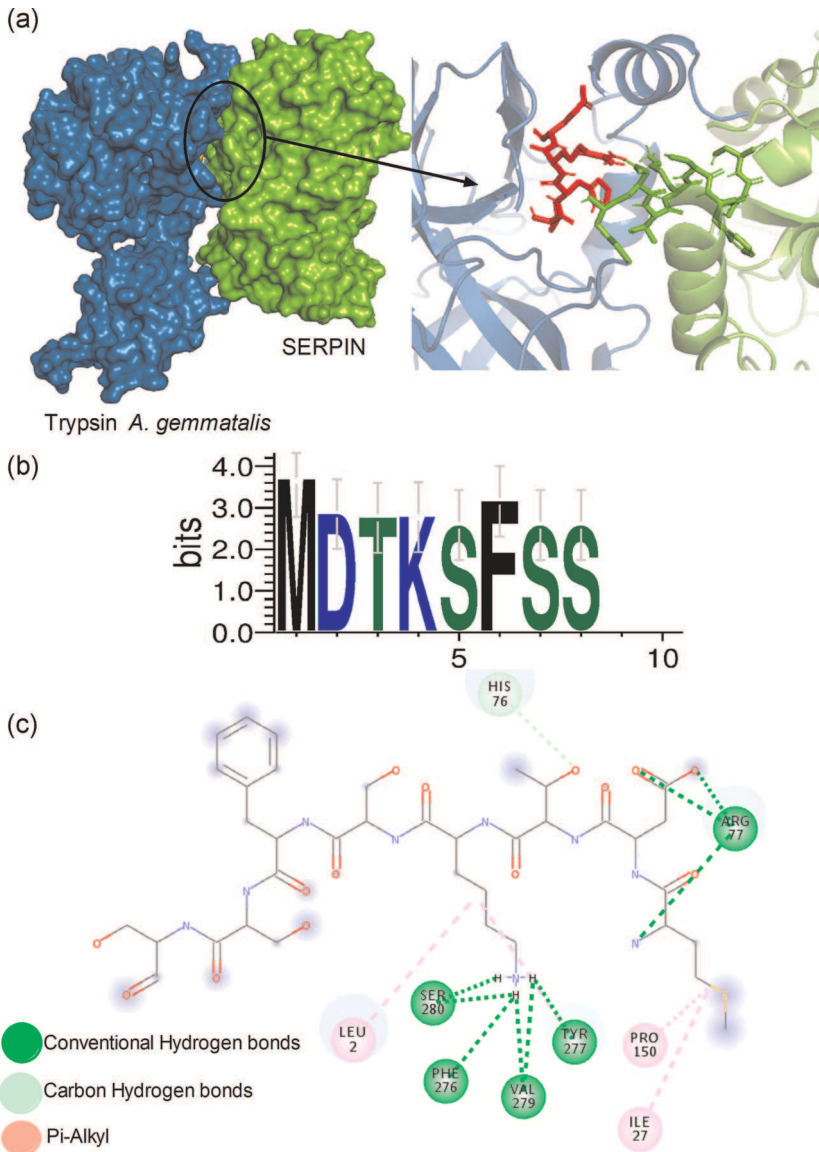


FIGURE 8 (a) General and local overview of the best-ranked docking pose of serino proteases inhibitor (SERPIN) binding with digestive trypsin *Anticarsia gemmatalis* serino. Surface shape representing the trypsin in blue, and the SERPIN in green. In the right, catalytic amino acids in red sticks and the reactive residues as green sticks involved in the trypsin-SERPIN interaction. (b) Sequence logo of the more representative reactive motifs present in SERPIN that bind to the *Anticarsia gemmatalis* trypsins. The height of each letter is proportional to the frequency of the corresponding residue at that position. (c) Pharmacophoric profile of the SERPIN-trypsin complex after docking molecular. Color ball and pointed line indicate the interaction type between SERPIN reactive sequence and residues side chain of trypsin. Only one (NM_001043572.1) of the trypsin structures is used for visualization as a consensus model of the 13 identified sequences, but all analyzes were performed for all sequences

3.4 | Docking protein-protein

To examine the interactions between the trypsins and the protein inhibitors (SERPIN and SKTI), computational studies were carried out using the online docking server ClusPro (Kozakov et al., 2017) to identify potential interaction sites on the proteins. For each docking, the software produced the top 10 binding models. The best model was chosen according to the results of the PROSA, Ramachandran, Verify3D, WHATCHECK validation analyzes, and the weighted score given by ClusPro (Table S1). After trypsin sequences alignment, the amino acids from the catalytic site were identified and its participation in the interaction with each inhibitor was verified (Figures 8 and 9). All trypsins bind to inhibitors (SKTI and SERPIN) through residues of the S1 specificity site or residues of the catalytic triad.

The graphical representation of the standard residues from the alignment of the trypsin-bounded inhibitors sequences was performed using WEBLOGO; the participants residues in the binding to trypsins were shown like the fragment of the complete sequence with the largest number of continuous residues (Figures 8b and 9b). SERPIN showed, three possible reactive sites by interaction with the *A. gemmatalis* trypsins (13 proteins), 69% of the interactions were performed by the motif containing the amino acid residues between the 1 and 9 position of protein chain (Met-Asp-Tyr-Lys-Ser-Phe-Ser-Ser) (Figure 8b). In the analysis of SKTI inhibitor residues binding to all selected *A. gemmatalis* trypsins were found two reactive sites, 62% of the interactions were performed by the motif containing the amino acid residues between the 80 and 86 position of protein chain (Ala-Val-Ile-Met-Leu-Cys-Val) (Figure 9b).

The importance of interface residues of the trypsin-protein inhibitors complex was clarified by docking and was demonstrated that catalytic residues are involved in binding with SERPIN and SKTI forming hydrogen bonding interaction (Figures 8c and 9c). In the SERPIN-trypsins interface, 60% of the interaction are conventional hydrogen bonds (Figure 8c), and 66% by SKTI-trypsins interface (Figure 9c). Apart from hydrogen bonding, several interactions such as pi-sigma, pi-Alkyl, and carbon-hydrogen were involved to inhibit the catalytic activity of *A. gemmatalis* trypsin upon inhibitor binding (Figures 8c and 9c).

4 | DISCUSSION

The design of new PIs showing more efficient capabilities to control caterpillar infestation requires knowledge of the proteases sequences presents in the insect intestines. However, the proteomic characterization of the insect's intestinal enzymes is a challenge since these biomolecules are found in very low concentrations in the physiological environment, ranging from 10^{-5} to 10^{-10} M (Srere, 1967). Besides, abundant gene products, such as structural proteins, make it difficult to detect low abundance enzymes by suppressing signals on the mass spectrometer. To overcome it, our chosen PEG fractionation followed by *in-gel* digestion improved proteome coverage and digestion efficiency which involves immobilizing the proteins in denaturing conditions, ensuring better access of trypsin to the hydrolysis sites. In addition, alkylation and reduction of proteins present in the sample are facilitated in *in-gel* digestion. Iodoacetamide and DTT could be completely washed from the gel, avoiding interferences in digestion and the acquisition of mass spectra. Distinct patterns of retention times can lead to quantitative and qualitative interpretations about the analyte. Besides, this parameter can be studied independently or with the spectra provided by MS/MS, increasing confidence in the identification of peptides (Le Maux et al., 2015; Palmblad et al., 2004; Strittmatter et al., 2004). Furthermore, *in-gel* digestion may have been important for removed the PEG binding in the proteins before the proteolytic cleavage and to attain a more efficient intestine protease denaturation. It enabled the identification of a greater number of peptides derived from the enzymes present in the intestine of *A. gemmatalis*. In fact, da Silva Júnior et al., (2020) identified 14 genes that code for proteases from unfractionated samples of the crude extract of *A. gemmatalis*, extracted from 7 bands of SDS-PAGE, while using the PEG precipitation strategy we identified 54. As also shown by Xi et al. (2006) and Lima et al. (2019), fractionation

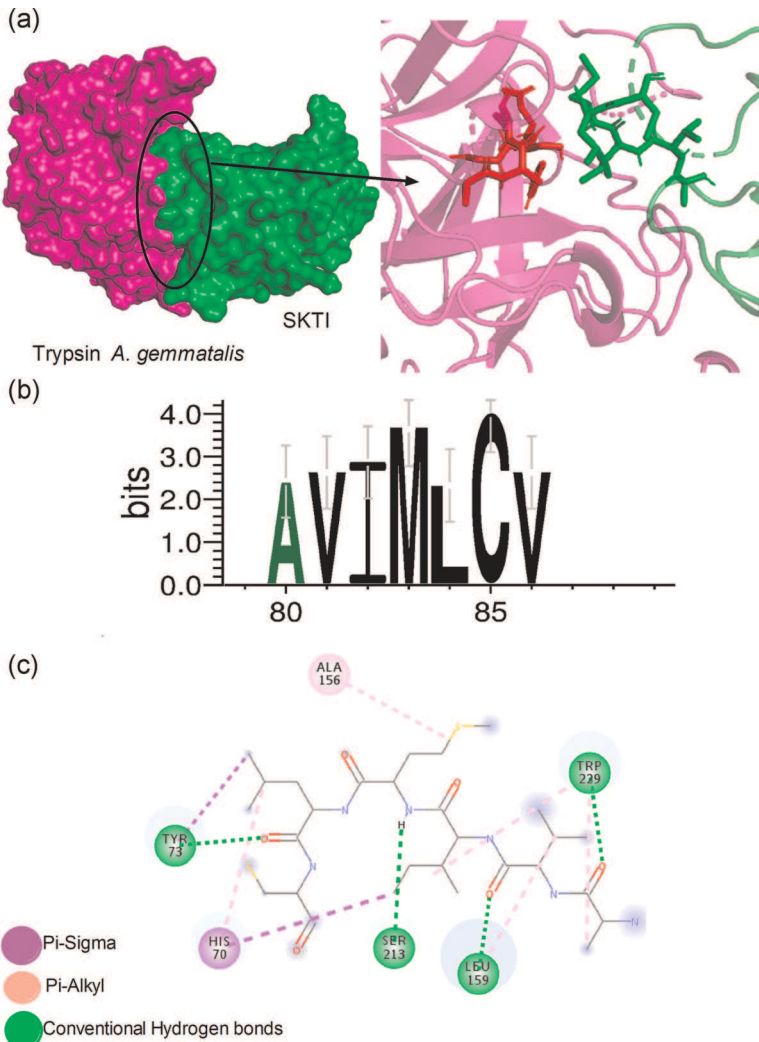


FIGURE 9 (a) General and local overview of the best-ranked docking pose of Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) binding with digestive trypsin *Anticarsia gemmatalis* serino. Surface shape representing the trypsin in magenta, and the SKTI in green. In the right, catalytic amino acids in red sticks and the reactive residues as green sticks involved in the trypsin-SKTI interaction. (b) Sequence logo of the more representative reactive motifs present in SKTI that bind to the *Anticarsia gemmatalis* trypsins. The height of each letter is proportional to the frequency of the corresponding residue at that position. (c) Pharmacophoric profile of the SKTI-trypsin complex after docking molecular. Color ball and pointed line indicate the interaction type between SERPIN reactive sequence and residues side chain of trypsin. Only one (NM_001043572.1) of the trypsin structures is used for visualization as a consensus model of the 13 identified sequences, but all analyzes were performed for all sequences.

with PEG favors the detection of less abundant proteins. Therefore, the use of this technique was crucial for the successful identification of high numbers of proteases by LC/MS.

The number of nonredundant proteins identified was higher than those found in the literature, performed with intestines of other lepidopterans in the larval stage. Using a two-dimensional electrophoresis approach, 98 proteins were identified in *Tribolium castaneum* (Morris et al., 2009), 91 proteins in *B. mori* (Kajiwara et al., 2005) and 29 proteins in *Helicoverpa armigera* (Yannick Pauchet et al., 2008). Through the traditional one-dimensional

electrophoresis technique, 372 proteins were identified in *B. mori* (Liu et al., 2018) and 98 proteins in *Spodoptera frugiperda* (Acevedo et al., 2017). Using RNAseq, 238 overexpressed genes were detected in the intestine of the *Tribolium castaneum* caterpillar (Perkin & Oppert, 2019).

Initially, the expression of many isoforms may seem redundant or bioenergetic loss, but the diversity in the expression of enzymes that perform similar biological activities has a great adaptive role in insects (Díaz-Mendoza et al., 2005). As reported by Souza et al. (2016), the expansion of genes that code for serine proteases is associated with the insect's adaptation to the PI produced by the plant. Because protein digestion in lepidopterans is performed mainly by serine proteases, the increase in the structural and functional diversity of genes that code for this sub-subclass can be attributed to the insect's response machinery to circumvent PIs. Therefore, these constitutively expressed proteins represent an adaptive advantage.

Transcriptome approach in the intestine of the *S. frugiperda* caterpillar (Lepidoptera, Noctuidae) showed 14 chymotrypsins and 9 trypsin differentially expressed in response to PI in the diet (Brioschi et al., 2007; de Oliveira et al., 2013; Pauchet et al., 2010). The authors pointed out this expression reprogramming as a strategy to overcome the harmful effect of PIs.

Lepidopterans exhibit incredible flexibility in adapting to the diet. *H. armigera*, for example, even expresses 20 isoforms of serine proteases (Bown et al., 1997; Gatehouse et al., 1998; Patankar et al., 2001). The existence of multiple isoforms of these serine proteases in insects is because of gene duplication events (Baptista et al., 1998; Lopes et al., 2004). Modulation of key proteases during larval development has also been shown to occur independently of the diet in *A. gemmatalis* (da Silva Júnior et al., 2020), *H. armigera* (Chougule et al., 2005; Kipgen & Aggarwal, 2014), *Naranga aenescens* (Zibae et al., 2011), *Nezara viridula* (Lomate & Bonning, 2016). However, studies relating the genetic reprogramming of insects to PI in the diet showed that, initially, all digestive proteases are upregulated and then there is downregulation in PI-sensitive proteases (Bown et al., 2004).

At different stages of development, insects can have diverse diets. Parallel to this, the gut of the caterpillars alters the profile of expressed proteases (da Silva Júnior et al., 2020). It is not known for sure whether this dynamic modulation is a cause or a consequence of the change in diet. But what appears to be a fact is that the great diversity of isoforms is important not only to deal with the diverse content of plant proteins but also to circumvent an expressive part of the PI-based plant defense. Lima et al. (2020) reported that approximately one-third of the proteases expressed in the intestine of insects of the order Lepidoptera correspond to serine proteases (EC 3.4.16 and EC 3.4.21). This fraction of enzymes can represent up to 95% of the proteolytic activity in the larval intestine in lepidopteran (Srinivasan et al., 2006).

Glycosidases (EC 3.2.1) were the sub-subclass with the second-highest identification. These hydrolases are well studied, because of their industrial applications (Ishak et al., 2019) and for their physiological function in phytophagous insects: the digestion of sucrose, one of the most abundant sugars in the leaf tissue (Pauchet et al., 2010). Besides this energy importance, glycosidases can also represent an important focus of studies in the development of pest control strategies. Plants produce a wide variety of allelochemicals as a defense to herbivory (e.g., cyanogens, alkaloids, triterpenoid glycosides, and glucosinolate).

Although effective most times, the plant's biochemical arsenal selectively pressures its enemies. An important action of glycosidases in this respect is represented by myrosinase (E.C. 3.2.1.147), which takes part in the system known as glucosinolate-myrosinase. In this important plant defense pathway, myrosinase and glucosinolate are separately compartmentalized in plant cells until tissue damage puts them in contact. As a result, glucosinolate is activated by myrosinase through the hydrolysis of the thioglycoside bond, leading to the formation of an unstable aglycone which leads to toxic compounds to the insect (Li et al., 2000; Winde & Wittstock, 2011). In contrast, insects have gained coevolutionary adaptations that allow them to overcome these defenses. They have developed ways to store or detoxify harmful compounds and thus use them as defensive compounds against their enemies.

In this study, myrosinase had the highest number of isoforms identified among the glycosidases, about two-thirds. They are commonly reported in multigene families (Vassão et al., 2018), encoding several functional iso-enzymes in plants (Rask et al., 2000). The question is, why do insects invest in myrosinase enzymes if their activity

can lead to toxic products when associated with the diet? There is still no satisfactory answer, but there are some indications that these enzymes are used to switch from direct to indirect defense, at the same time that the insect can neutralize the toxicity of isothiocyanate products (Abdalsamee et al., 2014; Schramm et al., 2012). Extracts got from the intestine of *A. gemmatalis* lacked glutathione S-transferase (GST) activity to isothiocyanate, even after induction, but not on artificial substrates frequently used to measure GST activity (Wadleigh & Yu, 1988; Yu, 1987). Even a generalist who feeds only occasionally on plants containing glucosinolate benefits from such a specialized mechanism (Winde & Wittstock, 2011).

The glucosinolate-myrosinase system is important not only for the defense of plants against herbivores, but also for purposes directly related to the fitness of insects, such as host location, acceptance of oviposition, and defense against enemies (Rask et al., 2000). Insects such as *Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi* sequester glucosinolate that can be degraded by a myrosinase produced endogenously by them (Bridges et al., 2002; Husebye et al., 2005; Rossiter et al., 2003). Also, the production of myrosinase by these two species appears to mimic the plant's glucosinolate-myrosinase system (Husebye et al., 2002; Jones et al., 2001; Rossiter et al., 2003). Studies have shown that the growth of *Plutella xylostella* was not affected when fed with a mutant that over-expresses myrosinase, for the inactivating glucosinolate sulfatase of the insect, suggesting that the presence of myrosinase is indifferent to this herbivore (Ratzka et al., 2002).

Comparative metabolome studies can be useful to quantify the glucosinolate products in *A. gemmatalis* and complement these analyzes. The enzymatic activities of myrosinase need to be investigated under conditions similar to the physiological conditions of the intestine of *A. gemmatalis*. These enzymes may represent an important investigative target in the control of insect pests.

Xavier et al. (2005) characterized trypsin-like linked to the membrane of *A. gemmatalis* and studies carried out in *B. mori* showed that chymotrypsin-like trypsin-like are transported via the membrane to the lumen where they are solubilized and activated (Eguchi et al., 1982). An expressive part of these enzymes remains anchored in the peritrophic membrane of the caterpillar's midgut (Eguchi et al., 1979; Kuriyama & Eguchi, 1985). These membrane-bound proteases have already been identified as targets for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) in the control of *Plodia interpunctella* (Amorim et al., 2008). Histochemical analyzes show that trypsins are exposed in the intestinal lumen of insects as transmembrane proteins, mainly in the anterior portion of the intestine. In the posterior region, there is a predominance of soluble trypsins (Jordão et al., 1999). The binding of enzymes in the membrane can occur by anchoring via detergent-resistant domains (Fuzita et al., 2019) or by vesicles linked to microvilli (Jordão et al., 1999). Advancing to the posterior region of the intestine, these enzymes are soluble and secreted by exocytosis. As a result, the activity of serine proteases decreases along the larval intestine (Bolognesi et al., 2001).

The abundance of serine-proteases identified in this study shows how important the trypsin-like enzymes are in the gut tissue of *A. gemmatalis*. In herbivorous Lepidoptera species, the expansion of the number of genes encoding serine-proteases has been mainly associated with adaptation to overcome the effects of host serine proteases inhibitors (PIs) (Lima et al., 2020). Evolutionarily, herbivorous insects attempt to possess a diverse array of digestive enzymes and improve their adaptability by expressing distinct types of an enzyme to overcome plant PIs and ensure digestion (Mehrabadi et al., 2012).

Trypsin-like exhibit multiple architectures capable of influencing their functional properties and capabilities in their acting pathways. Despite this, phylogenetic analysis shows that the serine-proteases domain is the most important in shaping trypsin-like evolution (Arenas et al., 2010; Lima et al., 2020). Thus, we identified that chains with a high conservation index contain the catalytic triad (His, Asp, and Ser), residues responsible for maintaining the active site favorable catalytic conformation, and other residues important for stabilizing this favorable conformation during the zymogen to active enzymatic forms a transition in the gut of *A. gemmatalis*.

Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration were observed in the trypsin group analyzed, specifically, substitutions in the residues Hys and Ser, possibly shows that some of these sequences may have originated from duplications in ancient ancestral species and been preserved in this proteome to the present day

(Ekici et al., 2008); this conservation over time and these enzymes in *A. gemmatalis* gut, show that these enzymes might play important roles in these insects. This residue substitution in the catalytic triad could also be associated with loss of enzyme activity, an expression of inactive homologous enzymes, a product of gene expansion events observed during trypsin and chymotrypsin gene family evolution. These inactive enzymes could play different roles, particularly in regulatory processes and subject to high purifying selective pressure (Pils & Schultz, 2004).

The amino acids Arg and Ile at the beginning of the trypsin polypeptide chain was also a highly conserved region, because activation of these proteases occurs in this site, during an irreversible proteolytic cleavage step, in the bond between Arg-Ile residues which delimits the enzyme's A and B-chain (Afonso et al., 2020; Di Cera, 2009).

Serine-proteases play a prominent role in a wide array of physiological processes such as food digestion, blood clotting, embryogenesis, tissue reorganization, defense mechanisms, and immune responses (Heutink et al., 2010; Schoofs et al., 2005). Many of these processes are proteolytic cascades, which, once set in action, lead rapidly and irreversibly to a specific cellular response. Activation and inactivation of protease cascades have to be closely controlled at different regulatory levels being protease gene transcription, mRNA translation, zymogen activation, substrate specificity, enzyme kinetics, and by enzyme-inhibitors. Most animal species synthesize a variety of protease inhibitors with different specificities, whose function is to prevent unwanted proteolysis (Clynen et al., 2005; Schoofs et al., 2005).

Analyzing the *A. gemmatalis* gut proteome, we identified a serine enzyme inhibitor, whose SERPIN motif was identified by Pfam. We here explore and describe the basic biochemical mechanisms of the interaction between the SERPIN and trypsins of the pest *A. gemmatalis* by bioinformatic tools. The identified SERPIN is a protein with 374 amino acid residues, molecular weight approximately 42 kDa, fold into nine α -helices and three β -sheets. The three-stranded β are positioned in the middle of the molecule and a flexible reactive center loop is positioned on top of the molecule, formed by the amino acid residues at position 1–9 in the protein chain; these characteristics agree with the definition of a native SERPIN (Cabrera & Blamey, 2018).

The analysis of the interaction between the SERPIN and the *A. gemmatalis* trypsins showed the reactive site of the inhibitor is in contact with the catalytic cavity of the trypsins (Hys-Asp-Ser) and adjacent residues to the triad, in other words, it blocks the access of the substrate to the active site. Of the 374 amino acid residues that are part of SERPIN, nine amino acid residues interact with the *A. gemmatalis* trypsins at a distance of four angstroms. These amino acids in the reactive center loop are mostly polar uncharged and hydrophobic, binding to trypsins by conventional Hydrogen bonds mainly. Tobarro et al. (2013) showed in vitro that SERPINs inhibit trypsin-like activity in the intestine of lepidopterans. Thus, the identified SERPIN could be acting as a regulator of the serine protease activity (An & Kanost, 2010; Wang et al., 2017; Zhu et al., 2003), especially those involved in insect modulation the responses to bacteria, via the polyphenoloxidase (PPO) pathway (An et al., 2011; Li et al., 2002), and to viruses in *B. mori* (Wu et al., 2016).

In SERPINs, its RCL contains a sequence motif that is specifically recognized by target enzymes. Interestingly, amino acid sequences next to the cleavage site are highly variable between different SERPINs (Cabrera & Blamey, 2018). Thus, an identification performed of the reactive sequence of the *A. gemmatalis* SERPIN is promising for molecular minimization, aiming to create a peptide molecule with greater stability and less prone to cleavage by proteases and viable to be used in Lepidoptera insect pest control such as *A. gemmatalis* larvae.

5 | CONCLUSIONS

The 1DE-LC/MS enables the proteomic mapping of the larval intestine of *A. gemmatalis* and describes an expressive number of hydrolases, showing several important isoforms for the digestibility of the insect. The identification of gut enzymes in *A. gemmatalis* allows a more comprehensive understanding of insect feeding. In general, all trypsins bind to inhibitors (SKTI and SERPIN) through residues of the S1 specificity site or residues of the catalytic triad. Protein models predicted from DNA sequences indicated that there are no differences in how trypsins interact

with the studied inhibitors using molecular docking analyzes. Thus, differences on overall sequences could contribute to a strategy to avoid inhibition by PIs through to structural changes of the expressed protease to avoid its inactivation.

In addition, an endogenous serpin was identified and the analysis of the interaction showed the site reactive of the inhibitor is in contact with the catalytic cavity of the trypsins with affinity energy close to that determined between trypsin-SKTI. This SERPIN could be acting as regulator (Wang et al., 2017; Zhu et al., 2003) and binding dynamic indicated as promising for molecular minimization, aiming to create a peptide molecule with greater stability and less prone to cleavage by proteases and viable to be used in Lepidoptera insects pest control such as *A. gemmatalis* larvae.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interação Planta Praga (INCT-IPP), Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL/UFV), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest. All the authors of this manuscript accepted that the article is submitted for publication in the Archives of Insect Biochemistry and Physiology, and report that this article has not been published or accepted for publication in another journal, and it is not under consideration at another journal.

ETHICS STATEMENT

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were considered in the present investigation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Neilier R. Silva-Júnior  <https://orcid.org/0000-0002-4683-249X>

Humberto J. O. Ramos  <https://orcid.org/0000-0001-6447-8108>

REFERENCES

- Abdalsamee, M. K., Giampà, M., Niehaus, K., & Müller, C. (2014). Rapid incorporation of glucosinolates as a strategy used by a herbivore to prevent activation by myrosinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52(1), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.07.002>
- Abraham, E. G., Pinto, S. B., Ghosh, A., Vanlandingham, D. L., Budd, A., Higgs, S., Kafatos, F. C., Jacobs-Lorena, M., & Michel, K. (2005). An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16327–16332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508335102>
- Acevedo, F. E., Stanley, B. A., Stanley, A., Peiffer, M., Luthe, D. S., & Felton, G. W. (2017). Quantitative proteomic analysis of the fall armyworm saliva. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.001>
- Afonso, M. Q. L., Da Fonseca, N. J., De Oliveira, L. C., Lobo, F. P., & Bleicher, L. (2020). Coevolved positions represent key functional properties in the trypsin-like serine proteases protein family. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(2), 1060–1068. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00903>

- Amorim, T. M. L., Macedo, L. L. P., Uchoa, A. F., Oliveira, A. S., Pitanga, J. C. M., Macedo, F. P., Santos, E. A., & De Sales, M. P. (2008). Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EvV). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7738–7745. <https://doi.org/10.1021/jf801224d>
- An, C., Budd, A., Kanost, M. R., & Michel, K. (2011). Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(11), 1929–1939. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0543-z>
- An, C., & Kanost, M. R. (2010). *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(9), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.001>
- Arenas, A. F., Osorio-Méndez, J. F., Gutierrez, A. J., & Gomez-Marin, J. E. (2010). Genome-wide survey and evolutionary analysis of trypsin proteases in apicomplexan parasites. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 8(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(10\)60011-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(10)60011-3)
- Badran, A. H., Guzov, V. M., Huai, Q., Kemp, M. M., Vishwanath, P., Kain, W., Nance, A. M., Evdokimov, A., Moshiri, F., Turner, K. H., Wang, P., Malvar, T., & Liu, D. R. (2016). Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. *Nature*, 533(7601), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature17938>
- Baptista, A. M., Jonson, P. H., Hough, E., & Petersen, S. B. (1998). The origin of trypsins: Evidence for multiple gene duplications in trypsins. *Journal of Molecular Evolution*, 47(3), 353–362. <https://doi.org/10.1007/PL00006393>
- Bel, Y., Zack, M., Narva, K., & Escriche, B. (2019). Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ea toxin, and Cry1Ac and Cry1Fa competition analyses in *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*. *Scientific Reports*, 9(1), 18201. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54850-3>
- Bolognesi, R., Ribeiro, A. F., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2001). The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2), 62–75. <https://doi.org/10.1002/arch.1037>
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., & Gatehouse, J. A. (1997). Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7), 625–638. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00043-X)
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., & Gatehouse, J. A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiological Entomology*, 29(3 SPEC. ISS.), 278–290. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x>
- Bridges, M., Jones, A. M. E., Bones, A. M., Hodgson, C., Cole, R., Bartlet, E., Wallsgrove, R., Karapapa, V. K., Watts, N., & Rossiter, J. T. (2002). Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1487), 187–191. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1861>
- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., & Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.016>
- Cabrera, M. Á., & Blamey, J. M. (2018). Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biological Research*, 51(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0186-3>
- Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., Oliveira, J. L., Bakshi, M., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. (2019). Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators*, 105, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>
- Chougule, N. P., Giri, A. P., Sainani, M. N., & Gupta, V. S. (2005). Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.006>
- Clynen, E., Schoofs, L., & Salzet, M. (2005). A review of the most important classes of serine protease inhibitors in insects and leeches. *Medicinal Chemistry Reviews - Online*, 2(3), 197–206. <https://doi.org/10.2174/1567203054065682>
- Coelho, M., Godoy, A. F., Baptista, Y. A., Bentivenha, J. P. F., Lourenção, A. L., Baldin, E. L. L., & Catchot, A. L. (2020). Assessing soybean genotypes for resistance to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 471–481. <https://doi.org/10.1093/jee/toz269>
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Parisi, M. G., & Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, 292, 110398. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>
- Crava, C. M., Bel, Y., Jakubowska, A. K., Ferré, J., & Escriche, B. (2013). Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: Activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(10), 924–935. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.07.009>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>

- De Castro, A. A., Corrêa, A. S., Legaspi, J. C., Guedes, R. N. C., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2013). Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*, 93(6), 1043–1050. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.075>
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., & Hulo, N. (2006). ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), W362–W365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- De Oliveira, C. F. R., De Oliveira Flores, T. M., Cardoso, M. H., Oshiro, K. G. N., Russi, R., De França, A. F. J., Dos Santos, E. A., Franco, O. L., De Oliveira, A. S., & Migliolo, L. (2019). Dual insecticidal effects of *Adenanthera pavonina* kunitz-type inhibitor on *Plodia interpunctella* is mediated by digestive enzymes inhibition and chitin-binding properties. *Molecules*, 24(23), 4344. <https://doi.org/10.3390/molecules24234344>
- de Oliveira, C. F. R., de Paula Souza, T., Parra, J. R. P., Marangoni, S., de Castro Silva-Filho, M., & Macedo, M. L. R. (2013). Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 165(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.008>
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J. M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510–515. <https://doi.org/10.1002/iub.186>
- Díaz-Mendoza, M., Ortego, F., García De Lacoba, M., Magaña, C., De La Poza, M., Farinós, G. P., Castañera, P., & Hernández-Crespo, P. (2005). Diversity of trypsins in the mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(9), 1005–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.04.003>
- Eguchi, M., Iwamoto, A., & Yamauchi, K. (1979). Relationship among proteases from the midgut, peritrophic membrane and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 48(1), 53–58. <https://doi.org/10.11416/kontyushigen1930.48.53>
- Eguchi, M., Iwamoto, A., & Yamauchi, K. (1982). Interrelation of proteases from the midgut lumen, epithelia and peritrophic membrane of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A: Physiology*, 72(2), 359–363. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90231-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90231-6)
- Ekici, Ö. D., Paetzel, M., & Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science*, 17(12), 2023–2037. <https://doi.org/10.1110/ps.035436.108>
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 275–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J., & Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279–D285. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Fuzita, F. J., Pimenta, D. C., Palmisano, G., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2019). Detergent-resistant domains in *Spodoptera frugiperda* midgut microvillar membranes and their relation to microapocrine secretion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 235, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.008>
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1084(3), 221–239. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90063-N](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90063-N)
- Gatehouse, L. N., Shannon, A. L., Burgess, E. P. J., & Christeller, J. T. (1998). 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*, 27(11), 929–944. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00074-X)
- Gomez, J. D., Vital, C. E., Oliveira, M. G. A., & Ramos, H. J. O. (2018). Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 13, (10) 0205010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205010>
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4), 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Gómez, J. D., Pinheiro, V. J. M., Silva, J. C., Romero, J. V., Meriño-Cabrera, Y., Coutinho, F. S., Lourenção, A. L., Serrão, J. E., Vital, C. E., Fontes, E. P. B., Oliveira, M. G. A., & Ramos, H. J. O. (2020). Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.010>
- Heutinck, K. M., ten Berge, I. J. M., Hack, C. E., Hamann, J., & Rowshani, A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, 47(11–12), 1943–1955. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.020>
- Husebye, H., Arzt, S., Burmeister, W. P., Härtel, F. V., Brandt, A., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2005). Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12), 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.07.004>

- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thangstad, O. P., & Bones, A. M. (2002). Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 128(4), 1180–1188. <https://doi.org/10.1104/pp.010925>
- Ishak, N., Md Yusop, N., Sari Mohd Kassim, A., Mohd Aripin, A., Mutia Sharifah, S., & Fadiat Oluwatosin, A. (2019). Insect Enzymes for Biotechnology Industry: From Nature To Industrial Applications. *Journal of Engineering and Health Sciences*, 3(1), 25–40.
- Jones, A. M. E., Bridges, M., Bones, A. M., Cole, R., & Rossiter, J. T. (2001). Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00157-0)
- Jordão, B. P., Capella, A. N., Terra, W. R., Ribeiro, A. F., & Ferreira, C. (1999). Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*, 45(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00098-5)
- Kajiwara, H., Ito, Y., Imamaki, A., Nakamura, M., Mita, K., & Ishizaka, M. (2005). Protein profile of silkworm midgut of fifth-instar day-3 larvae. *Journal of Electrophoresis*, 49(2), 61–69. <https://doi.org/10.2198/jelectroph.49.61>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kipgen, L., & Aggarwal, K. K. (2014). Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 34(3), 172–178. <https://doi.org/10.1017/S1742758414000368>
- Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2009). Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology*, 55(8), 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.004>
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(12), 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padjhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Kuriyama, K., & Eguchi, M. (1985). Conversion of the molecular form by alkaline treatment of gut protease from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 82(4), 575–579. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90492-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90492-4)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, D., Scherfer, C., Korayem, A. M., Zhao, Z., Schmidt, O., & Theopold, U. (2002). Insect hemolymph clotting: Evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(8), 919–928. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00030-9)
- Li, Q., Eigenbrode, S. D., Stringam, G. R., & Thiagarajah, M. R. (2000). Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities. *Journal of Chemical Ecology*, 26(10), 2401–2419. <https://doi.org/10.1023/A:1005535129399>
- Li, Y., Hallerman, E. M., Wu, K., & Peng, Y. (2020). Insect-resistant genetically engineered crops in China: Development, application, and prospects for use. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 273–292. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025039>
- Lima, A. T., Bastos, F. A., Teubner, F. J., Neto, R. R., Cooper, A., & Barroso, G. F. (2020). Strengths and weaknesses of a hybrid post-disaster management approach: The Doce River (Brazil) Mine-Tailing Dam Burst. *Environmental Management*, 65(6), 711–724. <https://doi.org/10.1007/s00267-020-01279-4>
- Lima, L. L., Balbi, B. P., Mesquita, R. O., Silva, J. C. F., da, Coutinho, F. S., & Carmo, F. M. S. (2019). Proteomic and metabolomic analysis of a drought tolerant soybean cultivar from Brazilian Savanna. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 1, e190022. <https://doi.org/10.20900/cbpg20190022>
- Lima, L. R., Dias, R. O., Fuzita, F. J., Ferreira, C., Terra, W. R., & Silva-Filho, M. C. (2020). The evolution, gene expression profile, and secretion of digestive peptidases in lepidoptera species. *Catalysts*, 10(2), 217. <https://doi.org/10.3390/catal10020217>
- Lima De Carvalho, W., Gorette De Almeida Oliveira, M., Gonçalves De Barros, E., & Alves Moreira, M. (1999). Lipoxigenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(6), 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80055-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80055-2)
- Liu, L., Qu, M., Yang, J., & Yang, Q. (2018). The physiological differentiation along the midgut of *Bombyx mori* – inspirations from proteomics and gene expression patterns of the secreted proteins in the ectoperitrophic space. *Insect Molecular Biology*, 27(2), 247–259. <https://doi.org/10.1111/imb.12368>
- Lomate, P. R., & Bonning, B. C. (2016). Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Scientific Reports*, 6(1), 27587. <https://doi.org/10.1038/srep27587>

- Lomate, P. R., & Hivrale, V. K. (2011). Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(4), 359–368. <https://doi.org/10.1007/s11829-011-9140-9>
- Lopes, A. R., Juliano, M. A., Juliano, L., & Terra, W. R. (2004). Coevolution of insect trypsin and inhibitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55(3), 140–152. <https://doi.org/10.1002/arch.10134>
- Lourenço, A. M., Haddi, K., Ribeiro, B. M., Corrêa, R. F. T., Tomé, H. V. V., Santos-Amaya, O., Pereira, E. J. G., Guedes, R. N. C., Santos, G. R., Oliveira, E. E., & Aguiar, R. W. S. (2018). Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. *Scientific Reports*, 8(1), 7215. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25721-0>
- Lucas, A., Yaron, J. R., Zhang, L., & Ambadapadi, S. (2018). Overview of serpins and their roles in biological systems. *Methods in Molecular Biology*, 18(26), 1–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8645-3_1
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., & Fitzgerald, R. J. (2015). Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry*, 173, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.104>
- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R., & Alizadeh, H. (2012). Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.01.008>
- Meriño-Cabrera, Y., Zanuncio, J. C., da Silva, R. S., Solis-Vargas, M., Cordeiro, G., Rainha, F. R., Campos, W. G., Picanço, M. C., & de Almeida Oliveira, M. G. (2018). Biochemical response between insects and plants: An investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory. *Annals of Applied Biology*, 172(2), 236–243. <https://doi.org/10.1111/aab.12416>
- Morris, K., Lorenzen, M. D., Hiromasa, Y., Tomich, J. M., Oppert, C., Elpidina, E. N., Vinokurov, K., Jurat-Fuentes, J. L., Fabrick, J., & Oppert, B. (2009). *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: A resource for the study of the coleopteran gut. *Journal of Proteome Research*, 8(8), 3889–3898. <https://doi.org/10.1021/pr900168z>
- Palmlblad, M., Ramström, M., Bailey, C. G., McCutchen-Maloney, S. L., Bergquist, J., & Zeller, L. C. (2004). Protein identification by liquid chromatography-mass spectrometry using retention time prediction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 803(1), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.007>
- Panizzi, A. R. (2013). History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. *Neotropical Entomology*, 42(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0111-y>
- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
- Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2001). Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(4–5), 453–464. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00150-8)
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Vogel, H., Nelson, D. R., Reynolds, S. E., Heckel, D. G., & Ffrench-Constant, R. H. (2010). Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: Messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Molecular Biology*, 19(1), 61–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00936.x>
- Pauchet, Y., Muck, A., Svatoš, A., Heckel, D. G., & Preiss, S. (2008). Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. *Journal of Proteome Research*, 7(4), 1629–1639. <https://doi.org/10.1021/pr7006208>
- Pei, J., Kim, B. H., & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2295–2300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>
- Perkin, L. C., & Oppert, B. (2019). Gene expression in *Tribolium castaneum* life stages: Identifying a species-specific target for pest control applications. *PeerJ*, 2019(5), e6946. <https://doi.org/10.7717/peerj.6946>
- Pilon, A. C., Valli, M., Dametto, A. C., Pinto, M. E. F., Freire, R. T., Castro-Gamboa, I., Andricopulo, A. D., & Bolzani, V. S. (2017). NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, 7(1), 7215. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>
- Pils, B., & Schultz, J. (2004). Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes. *Journal of Molecular Biology*, 340(3), 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.063>
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., & Meijer, J. (2000). Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 93–114. <https://doi.org/10.1023/A:1006380021658>

- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D. J., Mitchell-Olds, T., & Kroymann, J. (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11223–11228. <https://doi.org/10.1073/pnas.172112899>
- Romanazzi, G., Riolo, P., Duca, D., Orsini, R., Monaci, E., Murolo, S., Minuz, R. L., Mengarelli, C., Perugini, M., Verdolini, E., Ilari, A., Mancini, V., Feliziani, E., Landi, L., Pedretti, E. F., Santilocchi, R., Vischetti, C., & Isidoro, N. (2020). Innovation in sustainable management of plant diseases and pests, and effects on the environment, *The first outstanding 50 years of "Università Politecnica delle Marche": Research achievements in life sciences* (pp. 601–16). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-33832-9_38
- Rossiter, J. T., Jones, A. M., & Bones, A. M. (2003). Chapter six A novel myrosinase-glucosinolate defense system in, cruciferous specialist aphids. *Recent Advances in Phytochemistry*, 37(Issue C), 127–142. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(03\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(03)80021-7)
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Sanrattana, W., Maas, C., & Maat, S. (2019). SERPINs-From trap to treatment. *Frontiers in Medicine*, 6, 25. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00025>
- Schoofs, L., Clynen, E., & Salzet, M. (2005). Trypsin and chymotrypsin inhibitors in insects and gut leeches. *Current Pharmaceutical Design*, 8(7), 483–491. <https://doi.org/10.2174/1381612023395718>
- Schramm, K., Vassão, D. G., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (2012). Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(3), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.12.002>
- da Silva Júnior, N. R., Vital, C. E., Almeida Barros, R., Faustino, V. A., Monteiro, L. P., Barros, E., Oliveira, E. E., Oliveira Ramos, H. J., & Almeida Oliveira, M. G. (2020). Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(1), e21631. <https://doi.org/10.1002/arch.21631>
- Singh, S., Singh, A., Kumar, S., Mittal, P., & Singh, I. K. (2020). Protease inhibitors: Recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect Science*, 27(2), 186–201. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12641>
- Sousa, S., Maia, M. L., Correia-Sá, L., Fernandes, V. C., Delerue-Matos, C., Calhau, C., & Domingues, V. F. (2020). Chemistry and toxicology behind insecticides and herbicides, *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture* (pp. 59–109). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23396-9_3
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhana, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S., & Silva-Filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 196–197, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.02.007>
- Srere, P. A. (1967). Enzyme concentrations in tissues. *Science*, 158(3803), 936–937. <https://doi.org/10.1126/science.158.3803.936>
- Srinivasan, A., Giri, A. P., & Gupta, V. S. (2006). Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(1), 132–154. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0012-8>
- Strittmatter, E. F., Kangas, L. J., Petritis, K., Mottaz, H. M., Anderson, G. A., Shen, Y., Jacobs, J. M., Camp, D. G., & Smith, R. D. (2004). Application of peptide LC retention time information in a discriminant function for peptide identification by tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 3(4), 760–769. <https://doi.org/10.1021/pr049965y>
- Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7), 951–960. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti125>
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), W244–W248. <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Tavares, W. S., Costa, M. A., Cruz, I., Silveira, R. D., Serrao, J. E., & Zanuncio, J. C. (2010). Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45(6), 557–561. <https://doi.org/10.1080/03601234.2010.493493>
- Thakur, M., & Udayashankar, A. C. (2019). Lipxygenases and their function in plant innate mechanism, *Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress* (pp. 133–143). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27165-7_8
- Toubarro, D., Avila, M. M., Hao, Y. J., Balasubramanian, N., Jing, Y., Montiel, R., Faria, T. Q., Brito, R. M., & Simões, N. (2013). A serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *PLoS One*, 8(7), 69161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069161>
- Vassão, D. G., Wielsch, N., Gomes, A. M. de M. M., Gebauer-Jung, S., Hupfer, Y., Svatoš, A., & Gershenzon, J. (2018). Plant defensive β -Glucosidases resist digestion and sustain activity in the gut of a lepidopteran herbivore. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01389>

- Wadleigh, R. W., & Yu, S. J. (1988). Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three *Lepidopterous* species. *Journal of Chemical Ecology*, 14(4), 1279–1288. <https://doi.org/10.1007/BF01019352>
- Walker, D. R., All, J. N., McPherson, R. M., Boerma, H. R., & Parrott, W. A. (2000). Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noetuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 613–622. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.613>
- Wang, X., Wang, K., He, Y., Lu, X., Wen, D., Wu, C., Zhang, J., & Zhang, R. (2017). The functions of serpin-3, a negative-regulator involved in prophenoloxidase activation and antimicrobial peptides expression of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 69, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.11.022>
- Winde, I., & Wittstock, U. (2011). Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry*, 72(13), 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.016>
- Wu, K., Yang, B., Huang, W., Dobens, L., Song, H., & Ling, E. (2016). Gut immunity in Lepidopteran insects. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.010>
- Xavier, L. P., Oliveira, M. G. A., Guedes, R. N. C., Santos, A. V., & De Simone, S. G. (2005). Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology*, 102(2), 147–153. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.023>
- Xi, J., Wang, X., Li, S., Zhou, X., Yue, L., Fan, J., & Hao, D. (2006). Polyethylene glycol fractionation improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. *Phytochemistry*, 67(21), 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.005>
- Yu, S. J. (1987). Microsomal oxidation of allelochemicals in generalist (*Spodoptera frugiperda*) and semispecialist (*Anticarsia gemmatalis*) insect. *Journal of Chemical Ecology*, 13(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/BF01880090>
- Zhu, Y., Wang, Y., Gorman, M. J., Jiang, H., & Kanost, M. R. (2003). Manduca sexta Serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46556–46564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309682200>
- Zibae, A., Bandani, A. R., Fazeli-Dinan, M., Zibae, I., Sendi, J. J., & Maleki, F. A. (2011). A trypsin-like protease in rice green semi-looper, *Naranga aeneascens* moore (Lepidoptera: Noctuidae): Purification and characterization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/arch.20435>

SUPPORTING INFORMATION




Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Silva-Júnior, N. R., Cabrera, Y. M., Barbosa, S. L., Barros, R. d. A., Barros, E., Vital, C. E., Ramos, H. J. O., & Oliveira, M. G. A. (2021). Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, e21792. <https://doi.org/10.1002/arch.21792>

APÊNDICE C – Artigo II - Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors - Publicado na revista *Annals of Applied Biology*. Ed. Wiley - <https://doi.org/10.1111/aab.12740>

RESEARCH ARTICLE

Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors

Roberta Ribeiro Coura¹ | Neilier Rodrigues da Silva Junior¹  |
Yaremis Meriño-Cabrera¹ | Juan Diego Rios Díez¹ | Rafael Almeida Barros¹ |
Samuel Lessa Barbosa¹ | João Vitor Aguilar de Oliveira¹ |
Gabriele Corrêa da Rocha¹ | José Eduardo Serrão²  |
Humberto Josué de Oliveira Ramos^{1,3} | Maria Goreti de Almeida Oliveira¹ 

¹Laboratory of Enzymology and Biochemistry of Proteins and Peptides, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, UFV, BIOAGRO/INCT-IPP, Viçosa, Brazil

²Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

³Núcleo de Análise de Biomoléculas, NuBioMol, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

Correspondence

Maria Goreti de Almeida Oliveira, Laboratory of Enzymology and Biochemistry of Proteins and Peptides, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, UFV, BIOAGRO/INCT-IPP, Viçosa-MG 36570-000, Brazil.

Email: malmeyda@ufv.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Abstract

Protease inhibitors (PIs) interfere with digestion, leading to poor nutrient absorption and decreasing amino acid availability in insects. Ingestion of PIs can delay development, cause anatomical malformations, reduce fertility and change the set of proteases in the insect gut. This study evaluated the proteomic profile in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed on synthetic (Berenil[®] with a bis-benzamidine as active ingredient) and natural (SKTI) protease inhibitors and their effect on the gut physiology, proteolytic activity and the structural characteristics of the trypsin-inhibitor binding. Larger numbers of protein isoforms were identified specially related to protease activity and stress processes, being that the synthetic PI triggered a lower reprogramming than SKTI. Furthermore, Berenil also promoted higher reduction on midgut protease activity at first times of PI treatment. Molecular modelling of the interactions between the identified proteases and PIs indicated that Berenil can interact with the trypsin enzymes and access to a more hydrophobic site promoting the inhibitory effect on serine proteases. Besides, its inhibitory capacity and structural damage on the midgut cells was sped up possibly by the delay in the expression of proteases, the reprogramming less extensive and the lower expression of upregulated isoforms. Thus, the integration of our results shows that the use of synthetic PIs, such as Berenil, can be efficient for the management of *A. gemmatalis*.

KEYWORDS

bis-benzamidine, larvae, proteome, soybean, trypsin

1 | INTRODUCTION

The velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is the main soybean (*Glycine max*) defoliating pest, compromising yield with serious economic effects (Bueno et al., 2021; Lima et al., 2020; Walker, All, McPherson, Boerma, & Parrott, 2000).

Roberta Ribeiro Coura, Humberto Josué de Oliveira Ramos and Maria Goreti de Almeida Oliveira contributed equally to this study.

The economic loss in soybean crops caused by *A. gemmatilis* has encouraged the search for strategies of pest control that are currently based on synthetic insecticides (Krinski, Foerster, & Deschamps, 2018). However, alternative approaches are needed to reduce the pollutant effects, risks to non-target beneficial insects and evolution of insecticide resistance in pest populations.

In *A. gemmatilis* just like in other insects, digestive proteases including serine proteases in the alimentary canal primarily hydrolyse ingested proteins and subsequently influence both the insect growth, development and reproduction (da Silva Júnior et al., 2020; Hemmati et al., 2017; Hemmati & Mehrabadi, 2020). Trypsins-like are the main serine proteases in *A. gemmatilis* and their inhibition promote great impact in the capability of protein digestion in the midgut (Oliveira, De Simone, Xavier, & Guedes, 2005; Patarroyo-Vargas et al., 2018; da Silva Júnior et al., 2020). For this reason, it has been the focus of inhibition of both to compromise larval development (Meriño-Cabrera, de Oliveira Mendes, et al., 2020).

Many natural peptides and synthetic inhibitors of trypsin have an arginine or a lysine that binds in the specificity site of the enzyme, which is near the catalytic triad responsible for the catalysis (de Almeida Barros et al., 2021; Presnell et al., 1998). In particular, benzamidine, a structural mimic of arginine and itself a potent inhibitor (Mares-Guia & Shaw, 1965), is the primary component of many larger inhibitors. In fact, potency and specificity for different serine proteases can be attained by incorporating the small inhibitor benzamidine into larger and more complex synthetic inhibitors such as a bis-benzamidine, an active compound of Berenil®. This inhibitor is an example of a synthetic trypsin inhibitor (Oliveira et al., 1993) but its potential effect as insecticide, repellent and antifeedant against pests has been poorly tested in comparison with the natural soybean inhibitor SKTI (Marinho-Prado et al., 2012; Patarroyo-Vargas et al., 2020).

Deeper knowledge of the serine-proteases and their molecular binding to inhibitors affecting the proteolytic activity and intestinal physiology in the *A. gemmatilis* is critical for control of this insect pest. Thus, the exposure to Berenil allowed a better understanding of the active centre of trypsin and molecular interactions with PIs, as well as evaluate the use of synthetic inhibitors as a strategy for integrated pest management. Thus, this work was aimed to identify the protein isoforms involved in the *A. gemmatilis* response to ingestion of synthetic (a bis-benzamidine) and natural (SKTI) protease inhibitors and their effect on structural characteristics of midgut epithelium, proteolytic activity and the structural characteristics of the trypsins-inhibitor binding.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Insects and preparation of the artificial diet containing PIs

The *A. gemmatilis* were reared at 25°C ± 2°C, 70% ± 10% relative humidity and 14:10 (light: dark) photoperiod at the Laboratory of

Insects of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Federal University of Viçosa, Brazil. To maintain the adult insects, 50 × 50 cm cages were screened and internally coated with sheets of paper. The pupae were placed in Petri dishes (150 × 20 mm) inside the cages and, after their hatching, the moths were fed on a nutritive solution composed of honey (20.0 g), beer (350 ml), sucrose (50 g), ascorbic acid (1.05 g), nipagin (1.05 g) and water (650 ml), soaked in a cotton ball placed on the bottom of the cage. The paper sheets containing *A. gemmatilis* eggs were cut into strips 2.5 × 10 cm and transferred to 500-ml plastic vials. After egg hatching, the caterpillars were fed on artificial diet according to Greene, Leppla and Dickerson (1976). The fifth instar larvae were separated in cages 2 × 5 cm and fed on diet (control) and diets supplemented with PIs 0.0019% (wt/vol) of the synthetic serine-protease inhibitor Berenil (Br; Treatment 1), and 0.01% (wt/vol) of serine-protease Kunitz (SKTI; Treatment 2) as described by Chougule, Doyle, Fitches and Gatehouse (2008). After 6, 12, 24 and 48 h, the caterpillars were collected from each treatment and respective controls, and the intestines were removed and stored at -80°C. For each treatment were used 10 cages with two caterpillars.

2.2 | Proteomic analysis by 2DE-LC/MS

The midguts of fifth instar caterpillars (four per treatment and control) were dissected, pooled and macerated with a sterile glass rod under 1.0 ml of 10⁻³ M HCl solution, at 4°C, and then centrifuged at 10,000g, for 10 min, at 4°C, to remove cell debris (Oliveira et al., 2005; Xavier, Oliveira, Guedes, Santos, & De Simone, 2005). Following, the supernatant obtained containing the proteins was collected and precipitated with one volume of 10% trichloroacetic acid in acetone for 12 h at -20°C. The solution was centrifuged at 6,000g for 30 min at 4°C and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended and twice washed with 80% acetone on ice and centrifuged at 6,000g for 10 min at 4°C. Finally, the pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature. The protein extract obtained was solubilised in a solubilisation buffer composed of 7 M urea, 2 M thiourea and 2% CHAPS. The solution was solubilised using the UltraSonic Processor (Model GE 50) for cycles of 5-10 s until complete pellet solubilisation and the samples were stored at -80°C. Protein concentrations were measured by the Bradford (1976) method.

Isoelectric focusing was performed on a 24-cm IPG strip pH 3-10 (GE Healthcare, Chicago, IL). The strips were previously rehydrated for 14-20 h with 450 µl rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, bromophenol blue 0.002%, 2% IPG-buffer, 0.2% DTT) with the addition of DeStreak 50% reagent (GE Healthcare). The amount of protein in each sample was 1.3 mg. Proteins were separated into the first dimension using the IPGphor3 focusing system (GE Healthcare). After focusing were added to the strips the equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 30% glycerol and 4% SDS) initially containing 1% (wt/vol) DTT for 15 min followed by 2.5% (wt/vol) iodoacetamide for 15 min at room temperature. The IPG strips were placed on 12% polyacrylamide gel and sealed with 0.5% agarose.

The gels were electrophoresed in the EthanDalt Six system (GE Healthcare) at 20 mA/gel for 10 h. At the end of the electrophoresis, the gels were fixed for 16 h in 40% ethanol solution and 10% acetic acid. To visualise the protein spots, the gels were submerged in Coomassie brilliant blue solution for 48 h and were washed with ultra-pure water to eliminate excess colouring solution. The gels were stored in 5% acetic acid solution and were scanned with ImageScanner III (GE Healthcare), with image calibration by Labscan software (GE Healthcare).

The protein profiles from caterpillar midguts exposed or not to PIs for each time (pair-wise) were compared by ImageMaster2D Platinum 7 software (GE Healthcare) to determine protein abundance spots. Spots that had radio values above 1.0 and analysis of variance (ANOVA) with p values below .05 were considered as differentially expressed. Three biological replicates were used for each treatment. The abundances (% V) of the protein spots expressed differentially using the criteria above were converted to fold-change and classified as up or downregulated.

The protein spots of the gels were cut and previously discoloured in 50 mM ammonium bicarbonate/50% methanol solution, followed by dehydration with acetonitrile. Proteins were then reduced with 200 mM DTT solution prepared in 100 mM ammonium bicarbonate for 30 min at 56°C and alkylation with 200 mM iodoacetamide solution in 100 mM ammonium bicarbonate for 30 min at room temperature. The pieces of gels were washed with 100 mM ammonium bicarbonate solution, dehydrated with acetonitrile and dried by vacuum centrifugation. For proteolytic digestion, the spots were rehydrated with 20 ng/ μ l trypsin solution for 20 h at 37°C. Digested peptides were extracted for three cycles using the extraction buffer (50% [vol/vol] acetonitrile, 5% [vol/vol] formic acid) and dried by vacuum centrifugation. Peptides were dissolved in 0.1% (vol/vol) formic acid and analysed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) using a nanoUPLC (nanoACQUITY–Waters) system containing a capillary column C18 BEH130 1.7 μ M 100 nm \times 100 mm, operating at a flow rate of 0.5 μ l/min.

The eluted peptides were automatically injected into a mass spectrometer ION TRAP Amazon (Bruker, Billerica, MA), online using a nanoESI ionisation needle. The scanning of the ions from the mass spectrometer was performed at between 300 and 1,500 m/z in positive mode and data were acquired for 70 min in each LC–MS/MS analysis. The mass spectrometer was operated in auto-MSn mode. Data acquisition of the LC–MS instrument was managed by Hystar software (Bruker) and the spectra were processed with the Data Analysis software (Bruker) using the default settings for proteomics. The spectra were analysed by PEAKS 7.0 program with a local Client licence, connected to a remote server to identify proteins. The parameters used in the program were: a translated ESTs database from midgut *A. gemmatalis*, containing 7,806 DNA contigs from transcribed RNA sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/308354) or a protein list download from UNIPROT for all Insect taxa; methionine oxidation as a variable modification and cysteine carbamidomethylation as a fixed modification, one missed cleavage, charge states of 2+, 3+, 4+, trypsin-like cleavage enzyme and mass error of 0.15 Da. For

protein identification, we considered a false discovery rate less than 1.0% along with at least three unique peptides.

2.3 | Proteolytic activities from the caterpillar midgut

For proteolytic activities, 10 dissected midguts from fifth instars larvae fed on PIs and control for each time were placed in 1 ml of 10^{-3} M hydrochloric acid solution at 4°C, (maintaining the ratio of four midguts per 1 ml of solution).

The protein extract containing the proteolytic enzymes was obtained by cell lysis resulting from three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing, followed by maceration using a polypropylene pestle. The obtained suspensions were centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C and the pellets were discarded. The supernatants containing the soluble material were separated and stored at -20°C .

The activity of total proteases of the gut of the caterpillars was determined using azocasein as substrate in 100 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, 20 mM CaCl_2 (pH 8.0), at 37°C. The rate of formation of the product, calculated in M/s, was obtained from the absorbance values, using the formula $V = A_{440} (\epsilon l t)^{-1}$, in which A_{440} corresponds to the absorbance at 440 nm, ϵ is the molar extinction coefficient ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l is the optical path (1 cm) and t is the incubation time of the reaction (120 s). Aliquots of 5 μ g of proteins from each sample and 500 μ l of a 0.3 mM azocasein solution were used and the absorbance values were continuously read every second until 120 s, in the automatic mode of the spectrophotometer (Hitachi UV–VIS, model U-5100), when the values of A_{440} were recorded (for all samples were observed a linear increase of the absorbance).

Trypsin-like serine protease activity was measured using 0.5 mM N- α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (L-BApNA) as substrate for amidolytic (amidasic) activity diluted in 0.1 M Tris–HCl buffer pH 8.2 containing 20 mM CaCl_2 , described by Erlanger, Kokowsky and Cohen (1961). The amidasic activity was determined by the formation of *p*-nitroaniline at 410 nm during 2.5 min using the molar extinction coefficient of $8,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The experiment was conducted in a series of three repetitions and two-way ANOVA was used to compare the responses to PIs exposure over time.

Protein concentrations were measured by the Bradford (1976) method, using bovine serum albumin, at a concentration ranging from 0 to 20 mg/ml for the standard curve. The enzymatic activities of all assays were performed in triplicate and expressed according to the protein concentration ($\mu\text{mol s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ of protein).

2.4 | Histological analyses of the caterpillar midgut

For histological analysis, four *A. gemmatalis* caterpillars fed on PIs and control for each time were collected and dissected in 125 mM NaCl and transferred to the Zamboni's fixative solution (Stefanini, Martino, & Zamboni, 1967) for 12 h at 4°C (Fiaz, Martínez, Costa, et al., 2018).

Then the midguts were dehydrated in a graded ethanol series (70%, 80%, 90% and 95%) and embedded in Historesin (Leica) following the manufacturer's instructions. Sections 3- μ m-thick were obtained with rotation microtome and stained with haematoxylin (8 min) and eosin (30 s) and analysed with light microscope.

2.5 | Protein-ligand docking

The tridimensional structure of the *A. gemmatalis* trypsins previously modelled (da Silva Júnior et al., 2020) using Phyre2 server (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015) was used like receptors in the docking analysis using the software PyRx (Dallakyan & Olson, 2015). The individual file of each trypsin was opened in PyRx virtual screening tool as a starting protein structure in pdbqt format. The ligand bis-benzamidine (Berenil) was chosen and automatically had its energy minimised and converted to pdbqt format. Following that, the grid box was automatically appearing and was adjusted to cover the entire surface of the protein receptor. The docking was performed with Autodock Vina. The protein-ligand docking analysed by one ligand was compared with eight trypsin receptors. The best affinity energy values and structural pose of the ligand in each docking were got/developed in PyRx. The Discovery Studio Visualizer 4.0 (Accelrys, 2012) and Pymol (Molecular Graphics System, Version 2.0; Schrodinger, LLC, New York, NY) were used to perform for all figures. The structural results of the dockings between trypsins and Berenil were compared to the results of SKTI inhibitor (da Silva Júnior et al., 2020).

3 | RESULTS

3.1 | Protein expression profiles from caterpillar midgut in presence of protease inhibitors

Protease inhibitors were added in the caterpillar diets for evaluation of the protein expression reprogramming after 6, 12 and 24 h of ingestion (Figure 1; Table S1). The protein profiles by 2-DE were contrasted with the respective controls without the addition of PI and the increases or decreases of the protein abundances were shown as up- and downregulated. For all treatments, 312 and 240 spots showed differential protein abundances and, these spots were classified as up- and downregulated, respectively (Figure 1a). A higher number of proteins were downregulated (57%), whereas 43% were upregulated (Figure 1a) without differences between treatments. Of these spots, 134 were identified by LC-MS as unique peptides, responsive to SKTI, while 126 spots showed difference in the presence of Berenil (Table S1). Thus, a higher number of protein isoforms were found in the 2-DE profiles. Furthermore, the IDs for *Bombyx mori* homologues of these unique proteins, identified from 2-DE profiles of each PI, were compared to check the proteins shared in the expression profiles (Figure 1b). From these, 23 unique proteins showed protein expression changes both for up- and downregulated for both Berenil and

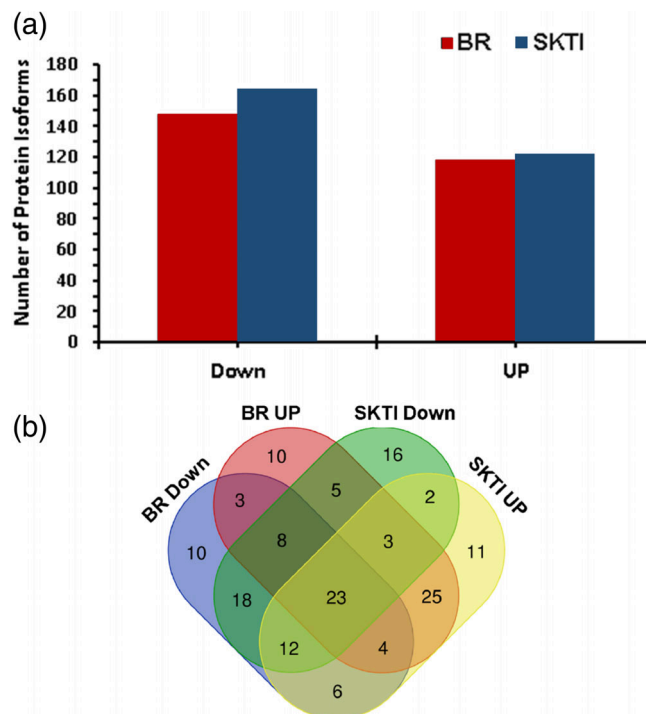


FIGURE 1 Distribution of the protein isoforms differentially abundant from midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed on Berenil (BR) and soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI). In (a), the isoform numbers are classified as up- and downregulated. In (b), the numbers those isoforms showing difference in abundances specifically for each protease inhibitors

SKTI (Figure 1b). Therefore, it is indicative that for the same protein ID were detected in different isoforms (spots with different isoelectric point or molecular mass) with differential expression pattern. Otherwise, approximately 30% of the unique proteins showed alterations specifically for each expression pattern/profile (Figure 1b).

The protein abundances showed as fold change up- and downregulated were additionally divided as early and later to indicate protein expression reprogramming in the caterpillar midguts before 12 h and after 24 h of PI ingestion (Figure 2). The number of protein isoforms classified as downregulated early or late was similar (Figure 2a), whereas those classified as upregulated late were higher than upregulated early, especially for SKTI. Thus, indicating that the cascades for activating the increase of the protein expression were found after 24 h of PI ingestion, being 3.9-fold higher than after 12 h (Figure 2a). When the IDs of the unique proteins were compared, their distributions were similar between Berenil (Figure 2b) and SKTI (Figure 2c), being only the number of proteins upregulated later was higher for SKTI.

3.2 | Functional classification of the differentially expressed proteins

The *B. mori* IDs homologous to the *A. gemmatalis* proteins identified from 2-DE profiles were used for functional categorisation which

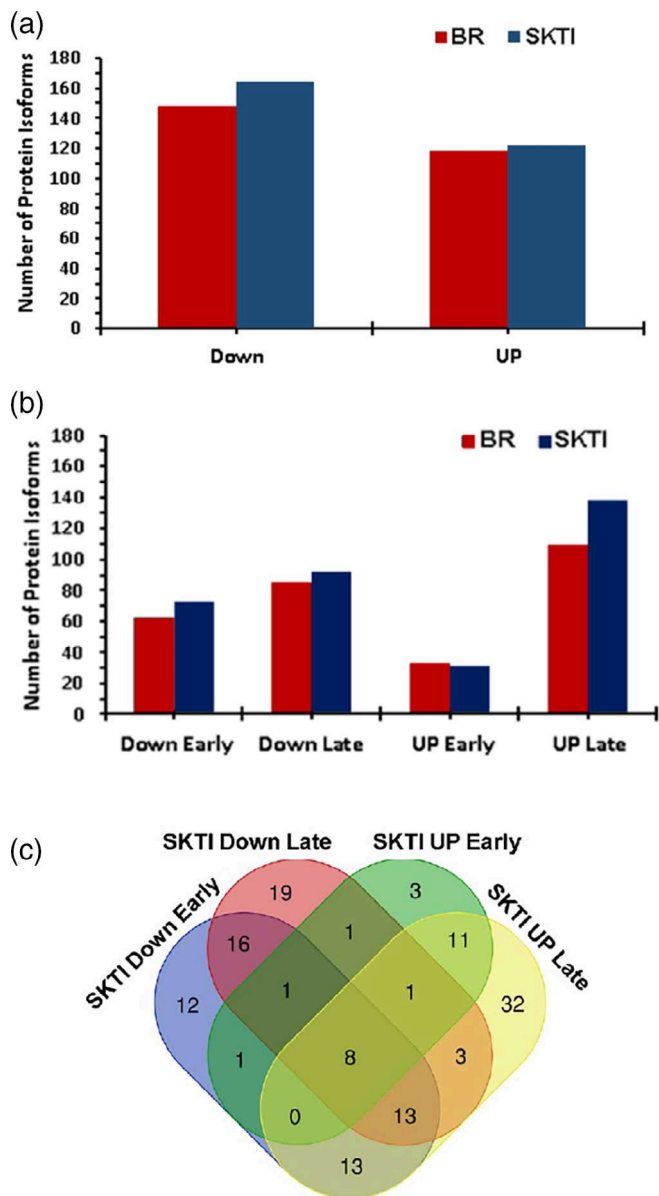


FIGURE 2 Effect of the exposure times in the distribution of the protein isoforms differentially abundant from midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with Berenil (BR) and soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI). The protein isoforms from 2DE profiles were classified as “Early” when the spot was detected as differentially abundant before 12 h of exposure and as “late” after 12 h. (a) Number of isoforms up- and downregulated during the early and late exposure times. (b) Number of isoforms showing up- and downregulated specifically for each exposure times in response to the presence of Berenil. (c) Number of isoforms showing up- and downregulated specifically for each exposure times in response to the presence of SKTI

were grouped by up- or downregulation for each PI (Figure 3). In general, most protein isoforms were classified as belonging to proteases, redox process, energy coupled proton and transferase/modification activity classes (Figure 3; Table S1). For downregulated proteases isoforms, the numbers were similar between the PIs Berenil and SKTI, with 34 and 33 isoforms, respectively (Figure 3a), whereas the upregulated isoforms were approximately

2.3-fold higher for insects fed on SKTI (Figure 3b). Similar finding also occurred for other protein functional classes (Figure 3a,b). On the other hand, the transferase/modification class isoforms were downregulated with SKTI.

Other protein isoforms were identified and grouped as hydrolases (Figure 3a,b), including α , β -hydrolase-1 protein domain (two isoforms) and carboxylic ester hydrolase (five isoforms). The alpha/beta-hydrolases belong to a group of enzymes structurally related to several catalytic functions, including acetylcholinesterase, serine carboxypeptidase, prolyl aminopeptidase and prolyl oligopeptidase. This class includes esterase enzymes, which hydrolyse ester bonds present in a wide variety of insecticides and, therefore, these enzymes may be involved in resistance to the main chemicals used in control programs, a mechanism known as metabolic resistance (Montella, Schama, & Valle, 2012). Some hydrolases were identified such as glycosyl hydrolase family 31 protein with three isoforms that are involved in carbohydrate metabolism.

Some protein groups up- and downregulated were related to the energy metabolism, mainly the proton pumps such as ATP synthase, ATPase and electron transfer proteins (Table S1), indicating that PIs have a direct and indirect effect on the cell metabolism of the caterpillar midgut. Many proteins have been shown to be expressed differently in response to PIs in the diet have activities involving oxidation-reduction (redox) reactions, including several dehydrogenases, oxidoreductases, glutathione transferases, superoxide dismutase and thiol peroxidase (Table S1). Many of these have been associated with the responses to cellular oxidative stress. Furthermore, many isoforms were identified as heat shock proteins and most were upregulated (Table S1). Insect heat shock proteins included ATP-independent small heat shock proteins and the larger ATP-dependent proteins are synthesised constitutively in insects and induced by stress conditions (King & Macrae, 2015).

Alterations in the protein abundances showed that the midgut cell metabolism in the presence of the PIs triggers an adaptive mechanism in response to nutritional stress. Differential expression of glycolysis pathway, metabolism of protein and, absorption and transport and binding to fatty acid show also cascades for modulating the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids that occur in the midguts in response to the presence of PIs (Table S1; Figure 3). Some responsive proteins belong to FABP domain-containing proteins and these are important for fatty acids uptake and transport in the midgut during the larval feeding stages of the insect. Proteins of the central energetic metabolism were also upregulated, probably to compensate the reduction of amino acid supply, as observed for the increase of the abundance of glutamine synthetase (three isoforms) and aspartate aminotransferase (one isoform).

Storage proteins (SPs) and vitellogenin were also regulated in response to PIs. The accumulation and utilisation of SPs and vitellogenin are important for insect metamorphosis and function as an amino acid reserve for the production of adult proteins (Ogawa & Tojo, 1981; Telang, Buck, & Wheeler, 2002). Insect SPs are categorised into two groups: methionine-rich proteins and aromatic-rich proteins (arylphorins). In *B. mori*, storage protein 1 (SP1) is named for methionine-rich protein, and storage protein 2 (SP2) is named for aromatic-rich protein (arylphorin). For protein storage 1, the

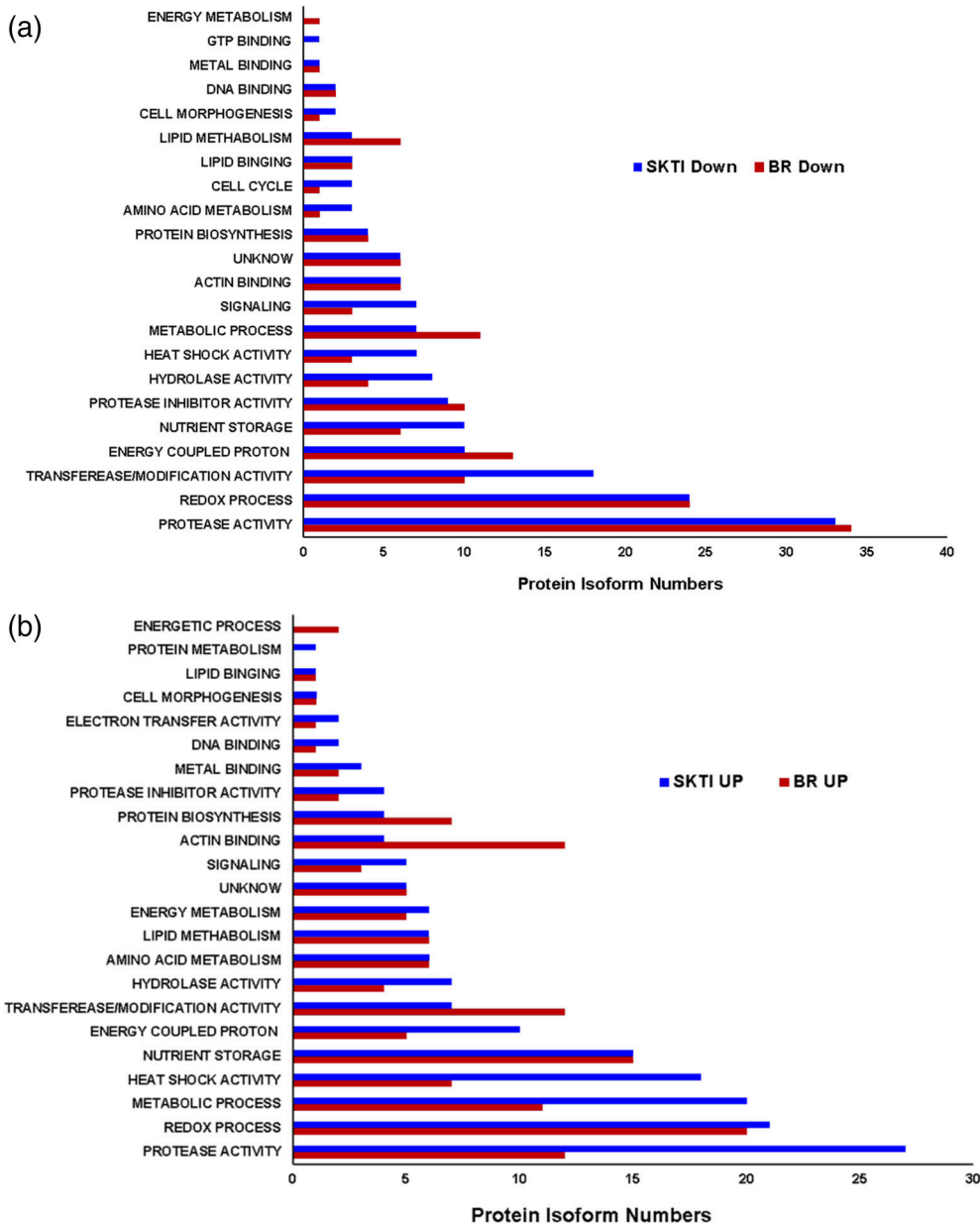


FIGURE 3 Categorisation of function (Gene Ontology) of the proteins differentially abundance from the midguts of *Anticarsia gemmatilis* fed in Berenil (BR) and soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI). (a) Number of isoforms downregulated. (b) Number of isoforms upregulated

expression profiles were similar; however, arylphorin was upregulated only in response to SKTI (Table S1).

The ribosome biogenesis regulatory protein was downregulated early for both PIs and thus, it might be a sign that under protease inhibition and amino acid starvation stress the protein biosynthesis was impaired in midgut cells. The protein expression profiles showed a downregulation of a protein homologous to prohibitin, which comprises a highly conserved family of proteins implicated in important cellular processes, such as membrane scaffolds, ensuring the recruitment of membrane proteases to facilitate substrate processing (Ochoa-Campuzano, Martínez-Ramírez, Contreras, Rausell, & Real, 2013).

Seven unique proteins were identified for responding to PIs in the caterpillar midgut showing homologies with proteins involved in cell signalling processes, such as protein kinase C, cytosolic juvenile hormone-binding protein 36 kDa and an importin subunit alpha (Table S1). The

protein kinase C (PKC) gene family comprises serine/threonine kinases that serve as central signalling molecules and regulators of a broad spectrum of cellular processes, including epithelial barrier function and immunity. Importin subalpha mediates transport of the protein or RNA from the cytoplasm to the nuclear lumen.

3.3 | Protease abundances in response to PIs added in the diets

The most responsive proteins were the protease subclasses (Table S1; Figure 3) because a long history of the close association between herbivorous insects and their host plants has led to sophisticated physiological responses to dietary PIs. Proteases have been classified into five catalytic types: serine, threonine, cysteine, aspartic and

metalloprotease. A total of 103 protein isoforms were identified for 20 unique proteases (20 IDs homologous to *B. mori*; Table 1). From 103 proteins, 34 and 31 isoforms were downregulated early and late, whereas 4 and 34 were upregulated early and late, respectively. Thus, 65 isoforms were downregulated and 38 were upregulated in response to PIs.

Alterations in the differential abundances were more observed for the serine protease class (Table 1), as 70 isoforms and 13 unique proteins. Within serine protease, 27 and 12 were upregulated, whereas 17 and

28 were downregulated for SKTI and Berenil, respectively. This inverse response between the PIs is indicative that SKTI triggers a different or more intensive cascade to the biosynthesis of serine protease isoforms. Also 19 isoforms were identified for two unique proteins as metallocarboxypeptidase (Table 1). Interesting, other types of protease isoforms were identified as belonging to the proteasome complex, with 11 isoforms for four unique proteins. Thus, it shows that under amino acid starvation stress, the protein degradation was activated in the caterpillar intestinal cells. In fact, a protein identified showing homology with a

TABLE 1 Protease isoforms differentially expressed from caterpillar midguts of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors Berenil (BR) and soybean Kunitz trypsin inhibitors (SKTI) comparing to caterpillars fed on control diet without inhibitors

Inhibitor	Protease type	<i>Bombyx</i> ID	Protein name	Down early	Down late	Up early	Up late
BR	Serine-type peptidase	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	5	NA	1
SKTI	Serine-type peptidase	H9IVN9	Trypsin alpha-3	1	4	1	3
BR	Serine-type peptidase	H9J230	Peptidase S1 domain	1	1	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9J230	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	Serine-type peptidase	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	1	2	NA	1
SKTI	Serine-type peptidase	H9J231	Trypsin-like serine protease 8	2	2	NA	2
BR	Serine-type peptidase	H9J243	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9J243	Peptidase S1 domain	1	2	NA	4
BR	Serine-type peptidase	H9J4K5	Peptidase S1 domain	1	1	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9J4K5	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	Serine-type peptidase	H9JAI9	Chymotrypsin-2 isoform X1	1	NA	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9JAI9	Chymotrypsin-2 isoform X1	NA	1	NA	NA
BR	Serine-type peptidase	H9JG67	Peptidase S1	NA	NA	1	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9JG67	Peptidase S1	NA	NA	NA	1
BR	Serine-type peptidase	H9JJA9	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9JJA9	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
BR	Serine-type peptidase	H9JL75	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	NA
SKTI	Serine-type peptidase	H9JL75	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	1
BR	Serine-type peptidase	H9JM38	Peptidase S1 domain	1	NA	NA	3
SKTI	Serine-type peptidase	H9JM38	Peptidase S1 domain	2	3	NA	3
BR	Serine-type peptidase	O01953	Serine protease	1	1	NA	1
SKTI	Serine-type peptidase	O01953	Serine protease	1	NA	NA	2
BR	Serine-type peptidase	H9J268	Peptidase S1 domain	NA	2	NA	NA
BR	Serine-type peptidase	H9J0V4	Alpha-aspartyl dipeptidase X1	NA	1	NA	NA
BR	Metallocarboxy	H9JIY6	Peptidase_M14 domain	3	1	NA	2
SKTI	Metallocarboxy	H9JIY6	Peptidase_M14 domain	1	1	1	4
BR	Metallocarboxy	H9JUR3	Peptidase_M14 domain	1	1	NA	1
SKTI	Metallocarboxy	H9JUR3	Peptidase_M14 domain	1	1	NA	1
BR	Proteasome	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	NA
SKTI	Proteasome	H9JVG2	Proteasome subunit beta type-2	1	NA	NA	1
BR	Proteasome	H9JWI4	Proteasome endopeptidase	1	1	NA	NA
SKTI	Proteasome	H9JWI4	Proteasome endopeptidase	1	1	NA	NA
BR	Proteasome	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha	1	NA	NA	NA
SKTI	Proteasome	Q2F5X2	Proteasome subunit alpha	1	NA	NA	NA
BR	Proteasome	H9JI85	Proteasome subunit alpha	NA	NA	1	1
SKTI	Mitochondrial peptidase	H9IZ97	Mitochondrial peptidase beta	1	NA	NA	1
Total				34	31	4	34

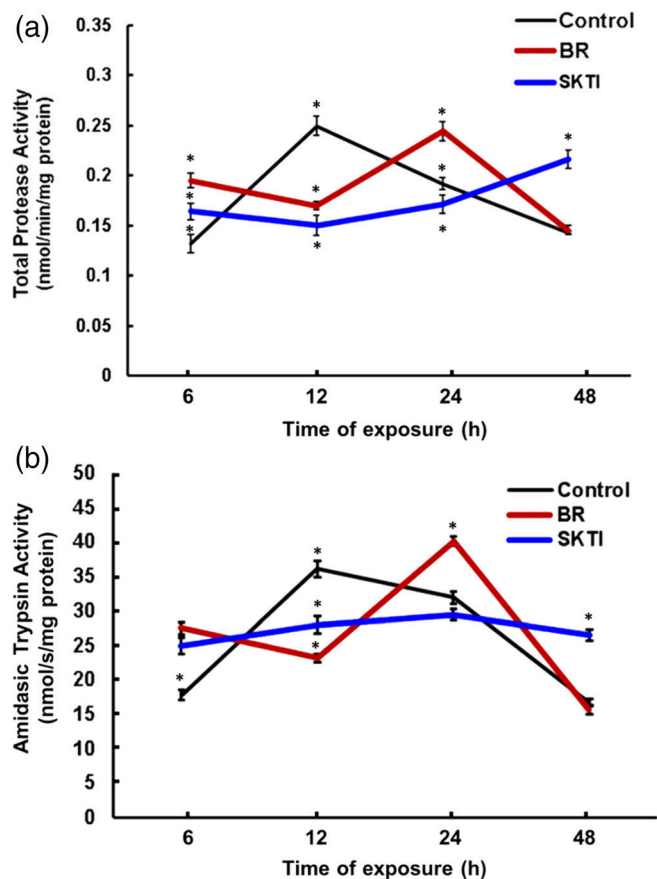


FIGURE 4 Effect of Berenil (BR) and soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) on protease activities in the *Anticarsia gemmatalis* midgut. (a) Total protease activity. (b) Trypsin-like amidasic activity. Asterisk is indicative of statistical significance when comparing averages of the protease activities at each exposure time by analysis of variance and Tukey-test

protein of *B. mori* (ID H9IYN7) acts on the activation of cysteine-type endopeptidase activity and is involved in apoptotic process. This protein was upregulated late only for SKTI and was classified as “protease activity regulation” in Table S1.

From 2-DE protein profiles, 21 protein isoforms classified as “protease inhibition activity” were identified (Table S1) for two *B. mori* homologous IDs as serpin-2 and antichymotrypsin-2. Some isoforms were up- and others were downregulated in a similar mode for SKTI and Berenil. Insect serpins are found expressed in various organs including fat bodies, midgut and hemocytes (Meekins, Kanost, & Michel, 2017). Most of these serpins are believed to be related to innate immunity and acting by inhibiting serine proteases. For example, when *B. mori* was challenged by pathogens such as *Micrococcus luteus* and *Serratia marcescens*, the expression of serpin α was increased significantly (Li et al., 2017). It was found that BmSerpin α directly inhibited the expression of the antimicrobial proteins drosomycin and gloverin2, and the polyphenol oxidase activity in the melanization cascade. In studies of *Manduca sexta*, researchers showed that serpin-1 could form a complex with the serine protease hemolymph protease 8, to inhibit the activation of the Toll pathway (An, Budd, Kanost, & Michel, 2011) during bacterial infection.

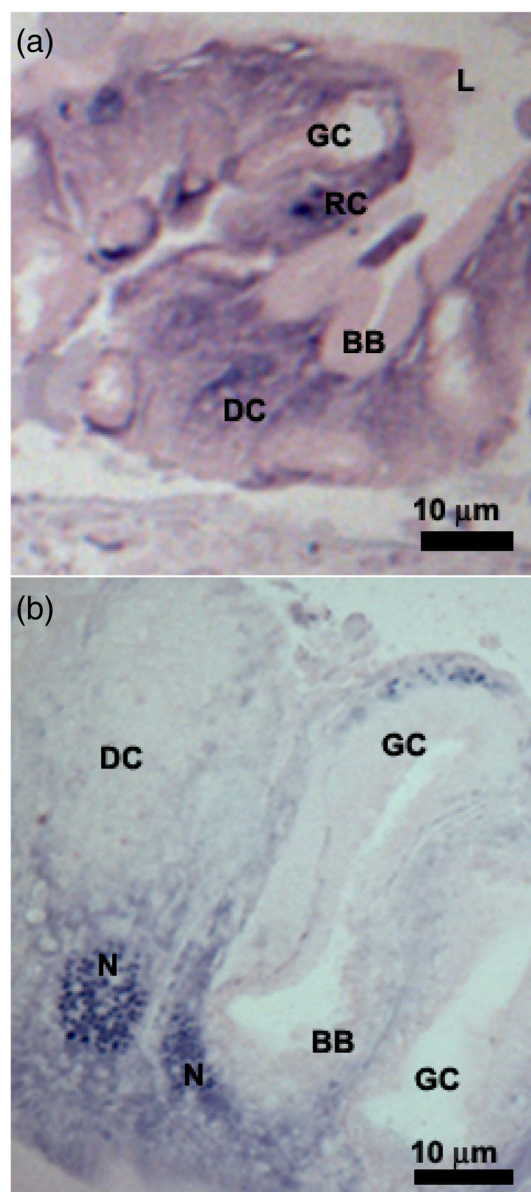


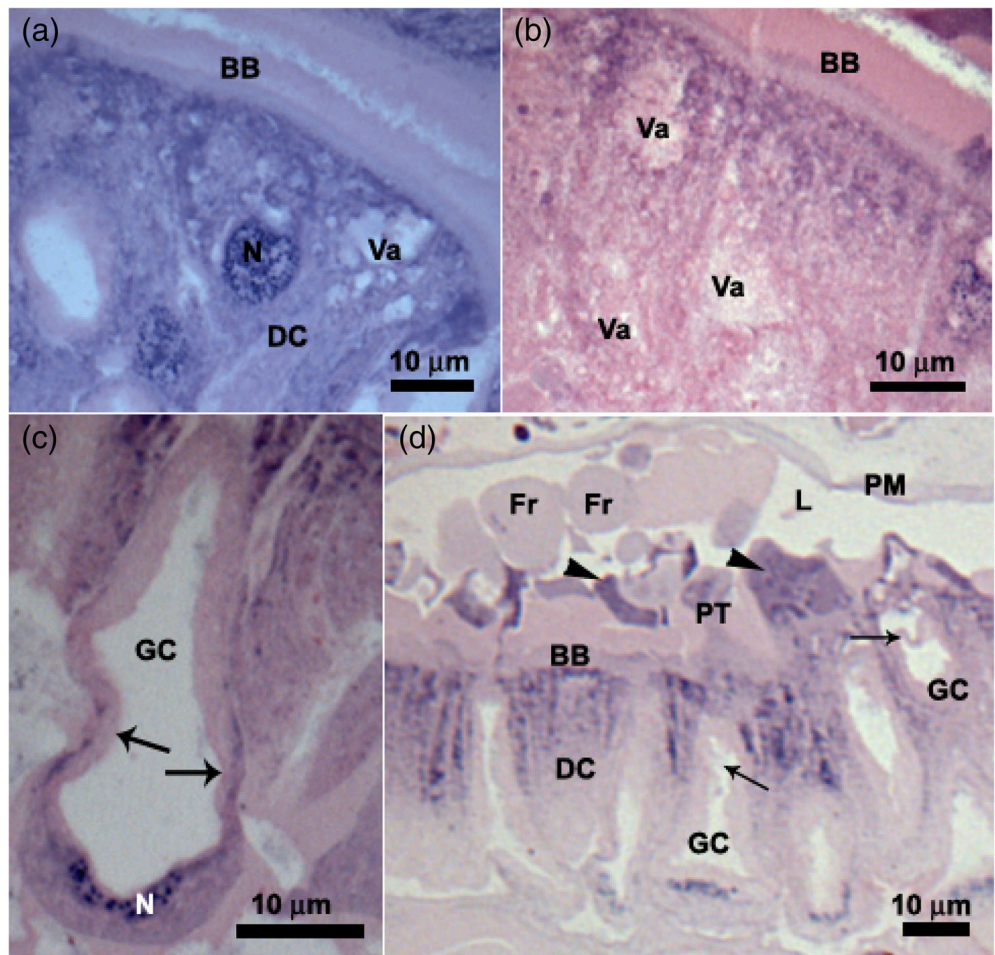
FIGURE 5 Light micrographs of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars fed on artificial diet. (a) General aspect of the epithelium showing digestive cells (DC) with well-developed apical brush border (BB), goblet cells (GC) cells and regenerative cell nest (RC). (b) Details of DC with homogeneous cytoplasm and well-developed nucleus (N), and GC with cavity BB and basal nucleus (N). L, midgut lumen

However, the role of these PIs in the regulatory cascades to respond to PIs in the insect midguts has not been described yet.

3.4 | Protease activities in the caterpillar midgut in the presence of PIs

Considering the alterations in protease abundances, for both unique and isoforms proteins in the midgut of caterpillars fed on PIs, the total protease and amidasic trypsin activities were also evaluated. Furthermore, protein isoforms abundances were also up- and downregulated

FIGURE 6 Light micrographs of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars fed on Berenil and soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) protease inhibitors. (a) Caterpillar fed on SKTI for 6 h showing digestive cell (DC) with vacuolized (Va) cytoplasm. (b) DC with cytoplasm vacuoles (Va) after 12 h exposure to Berenil. (c) Detail of goblet cell (GC) with disorganised brush border (arrows) after 48 h exposure to SKTI. (d) Detail of the midgut epithelium 48 h after exposure to Berenil showing GC with disorganised brush border (arrows), DC with disorganized brush border (BB), apical protrusions (PT) I, some with nucleus (arrowheads) and cell fragments (Fr) released to the lumen (L). N, nucleus; PM, peritrophic matrix



depending on time of exposure and thus were assayed and compared to characterise the changes in proteolytic activity in the midgut for 6, 12, 24 and 48 h after the PIs ingestion.

The overall protease activities varied according to the time, showing reductions and increases in comparison with the control. After 12 h, the protease activities were 35% lower for both the PIs than the control diet (Figure 4a).

Accordingly, increased activity after 24 h compared with control is adaptive and helps larvae to overcome negative effects of decreased activity after 12 h. Larvae returned to “normal” after 48 h as they have the same activity as control larvae. On the other hand, the proteolytic activity in the midgut in the presence of SKTI were gradually recovered after inhibition at 12 h and after 48 h reached values approximately 50% higher than control.

The serine protease activity was 53% lower for trypsin in caterpillars fed on Berenil, whereas SKTI had not effect on trypsin activity according to evaluated periods (Figure 4b).

3.5 | Histological analyses of the *A. gemmatalis* midgut

The midgut cells of the caterpillar were evaluated to verify histopathological alterations caused by PIs in the diets. In the control, the

TABLE 2 Affinity energy values determined by molecular docking of eight *Anticarsia gemmatalis* trypsin's and the inhibitory ligand Bis-benzamidine (Berenil) using PyRx software

Complexes (trypsin-Berenil)	Affinity energy (kcal/Mol)
Trypsin1-Berenil	-7.9
Trypsin2-Berenil	-7.6
Trypsin3-Berenil	-7.4
Trypsin4-Berenil	-8.1
Trypsin5-Berenil	-7.6
Trypsin6-Berenil	-7.9
Trypsin7-Berenil	-7.4
Trypsin8-Berenil	-7.3

Note: Values correspond to the best model for each docking.

midgut remained undamaged with a single-layered epithelium with digestive and goblet cells, as well as some regenerative cell nests (Figure 5a).

The digestive cells had a homogeneous cytoplasm, an evident apical brush border and a well-developed nucleus with decondensed chromatin (Figure 5b). The goblet cells had a large cavity with brush border (Figure 5b).

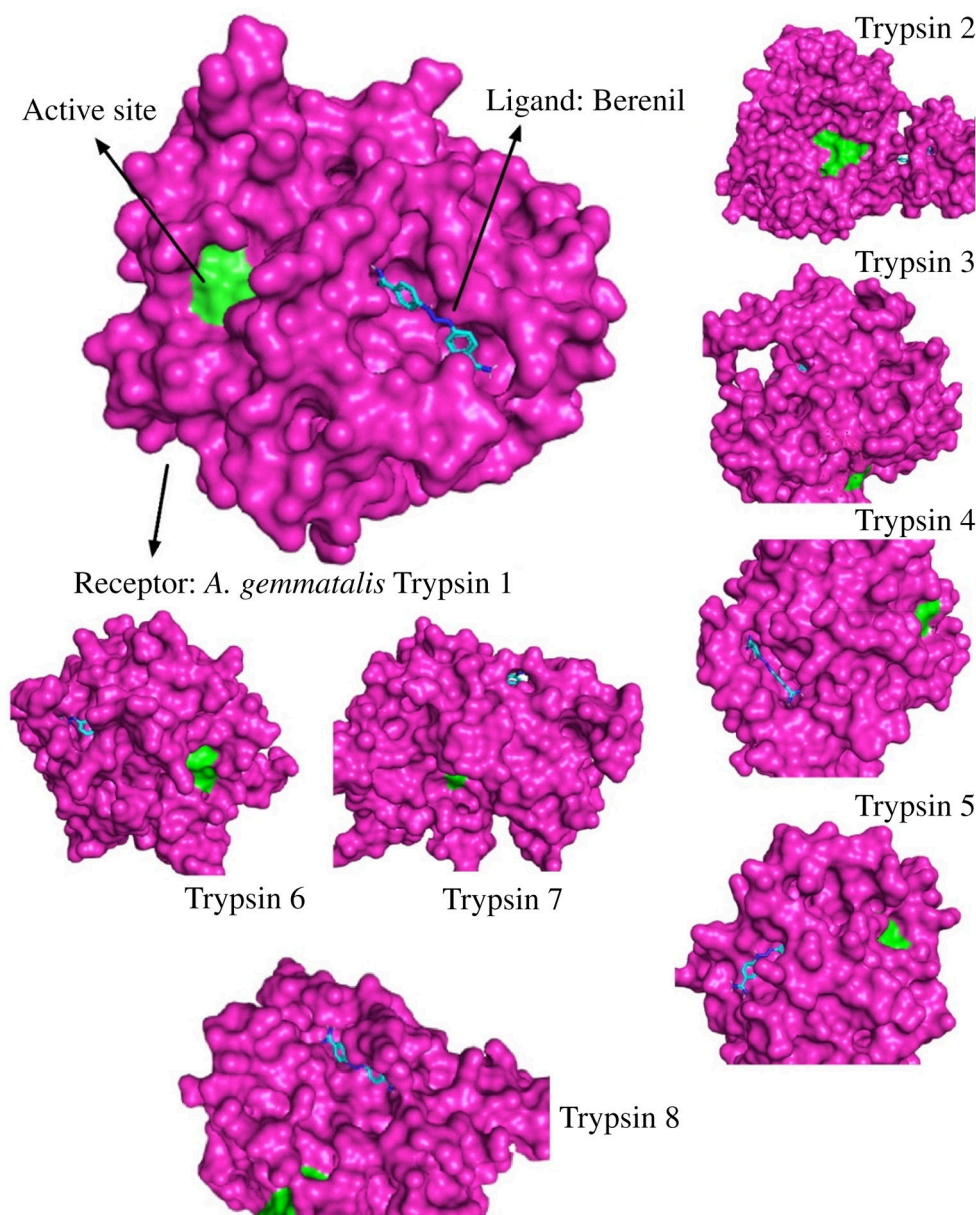


FIGURE 7 General overview of the best ranked docking pose of Berenil binding with digestive trypsins of *Anticarsia gemmatalis* (Trypsin 1–8). Trypsin in magenta, active site in green and Berenil in blue

Those caterpillars fed on SKTI and Berenil protease inhibitors showed some differences in the midgut epithelium in comparison with the control. *A. gemmatalis* midgut exposed to SKTI for 6 h and Berenil for 12 h had the digestive cells with cytoplasm vacuolization (Figure 6a,b) and the presence of goblet cells with disorganisation of the brush border (Figure 6c), features that were kept until 24 h of exposure. The caterpillars fed with both inhibitors for 48 h showed the digestive cells with apical protrusions (Figure 6d) and the release of cell fragments, some with nucleus (Figure 6d) to the midgut lumen.

3.6 | Protein-ligand docking

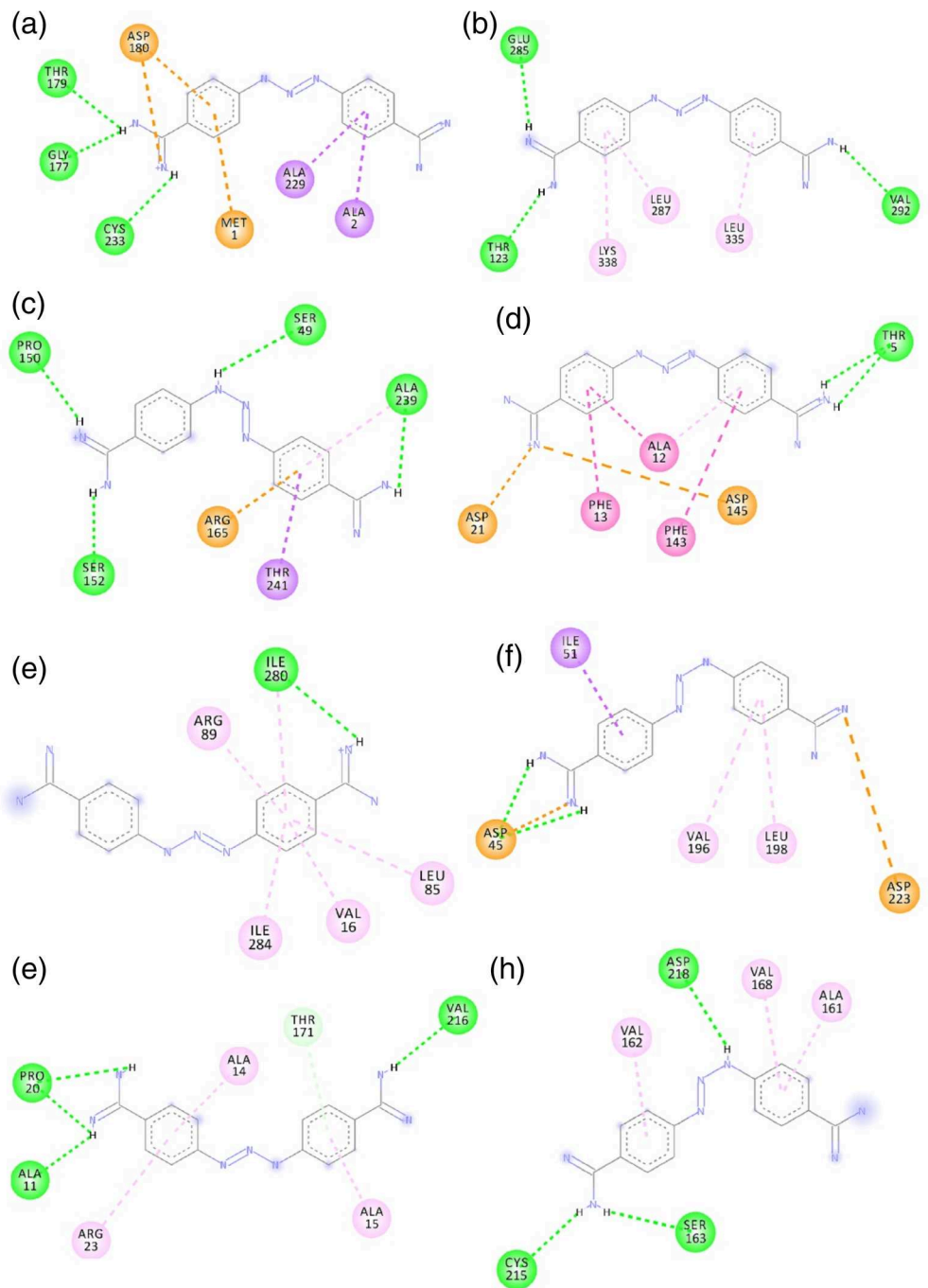
To probe the interactions between the *A. gemmatalis* trypsins and the Berenil inhibitor, a bioinformatics analysis was carried out using PyRx

to identify potential interaction sites on the proteins. For each docking, the software produced the top 10 binding models. The best model for each docking was chosen according to the results of the affinity energy (Kcal/mol; Table 2).

The graphical representation of the interaction position of Berenil in the trypsin showed that the PI have two interaction sites in *A. gemmatalis* trypsin, 62.5% of the interactions in the site S2' (Figure 7) and 37.5% binding to amino acid residue closely to site S1. The conformations adopted by the Berenil inhibitor in each one of the complexes were different, since it interacted with different amino acid residues on the surface of the proteins via hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Figure 8).

The amino acids in the S2' pocket and those close to the catalytic triad were involved in binding with Berenil forming hydrogen bonds, pi-sigma, pi-alkyl, pi-anion, pi-cation, pi-donor and attractive charge (Figure 8).

FIGURE 8 Pharmacophoric profile of the Berenil-trypsin complex after molecular docking. Colour circles and dotted lines indicate the interaction type between Berenil and amino acids side chain of trypsins. (a–h) Trypsin 1 to trypsin-8. Green represents hydrogen bonds, orange attractive charge, purple Pi-sigma interactions, pink Pi-Pi shaped interactions blue Pi-donor hydrogen bond



Uncharted polar and non-polar amino acids were responsible for interaction trypsins-Berenil. Some polar amino acids play a role in trypsin-Berenil complex, approximately 50% of the complexes showed Arg, Asp and Glu performing hydrogen bonds and attractive charge interactions with the ligand (Figure 8).

4 | DISCUSSION

The efficiency of plant defence to insects through PIs can be impaired by the adaptation of the herbivore. This coevolutionary association

between the phytophagous insect and the host plant has developed physiological responses in the insect that circumvent the negative effects caused by the PIs present in the diet (Dawkar et al., 2013; Zhu-Salzman & Zeng, 2015). One of these physiological responses of the insects to plant PIs is the differential regulation of multiple digestive proteases (Lomate et al., 2018). Thus, our study shows by the first time a comprehensive analysis on the proteomic response of *A. gemmatilis* caterpillars fed on Berenil and SKTI PIs, suggesting that variations in the synthesis and posttranslational modifications of specific proteins are responsible for the insects to overcome those PIs. Furthermore, Berenil has the maximum inhibition of trypsin-like

enzymes 2 h after exposure, confirmed by its binding at the S2' site of trypsin through hydrogen bonds and attractive charge, and the formation of apical protrusions in midgut cells that are released to the gut lumen revealed by light microscopy.

The ingestion of Berenil and SKTI by *A. gemmatalis* shows that this insect compensates the inhibition of proteolytic enzymes by the late secretion of other proteases. This finding is evidenced by a higher number of upregulated protein isoforms for protease and a decrease of the protease activity after 12 h of exposure, despite did not differ from the control group after 48 h. The compensation for inhibiting the activities of endopeptidase enzymes by increasing the activities of exopeptidases isoforms has been reported in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera; Lomate et al., 2018), suggesting that these digestive proteases are synthesised not only due to activation and repression of genes, but also due to posttranslational modifications when the caterpillar is exposed to PIs in the diet (Chougule, Giri, Sainani, & Gupta, 2005; Grabherr et al., 2011; Patankar et al., 2001; Sarate et al., 2012).

Small molecules such as synthetic inhibitors have several advantages compared to other potential chemical agents (inorganic insecticides), including metabolic stability, bio-distribution, half-life, manufacturing cost, pharmacokinetics and permeability (Ran et al., 2015; Zhao et al., 2017). However, it cannot be ruled out that small molecules may have some disadvantages when protein-protein interactions are the target, due to their limited surface (Ran & Gestwicki, 2018). However, the effect of these molecules on response through the expression of proteases may be advantageous for the management of agricultural pests, such as shown by results here obtained, indicating that when the insect is exposed to a small inhibitory molecule such as Berenil, they can delay the expression of proteases, the reprogramming it may be less extensive and upregulate expression of few proteins. These results may indicate that the inhibitory effect of Berenil compared to SKTI may be more severe due to the delayed response to the level of expression of new proteases that may mitigate the inhibitory effect of this molecule. Furthermore, insect recovery was faster when challenged with Berenil compared to SKTI, suggesting that the natural soybean inhibitor has a late effect in modulating the activity of total proteases. This result may indicate that SKTI is more unnoticed by the arthropod defence system, implying a longer lasting effect. The better response of *A. gemmatalis* to exposure of the SKTI in the diet might be due to the closely evolutionary association with their host plants (such as the soybean plants that produce SKTI) resulting in a sophisticated physiological responses to dietary PIs (Ryan, 1990; Zhu-Salzman & Zeng, 2015). Berenil has a diazo bond between two benzimidazole amino rings and binds to the active site as a competitive trypsin inhibitor. There is also an effective binding at the secondary site of the enzyme, exhibiting a parabolic behaviour that is partially competitive with the substrate (Junqueira, Silva, & Mares-Guia, 1992). Because of this, Berenil is a severe inhibitor for *A. gemmatalis*.

At the kinetic level, SKTI show lower inhibition constant (K_i) compared with those from synthetic inhibitors, which allow them to occupy all the binding sites available in the active centre of the

enzyme and thus an optimised adjustment occurs in the enzyme-inhibitor (EI) complex formation. The synthetic inhibitors, being smaller, do not occupy all the available sites of the enzyme, forming less stable EI complex (Meriño-Cabrera, de Oliveira Mendes, et al., 2020; Meriño-Cabrera, Severiche Castro, et al., 2020; Patarroyo-Vargas et al., 2020; Volpicella et al., 2003). In this study, we found that protein synthesis is accompanied by changes in the insect's enzymes profile. The hydrolytic capacity of *A. gemmatalis* trypsin decreases 53% after 48 h of exposure to Berenil, which is higher in comparison with SKTI. Furthermore, SKTI increases the number of differentially abundant proteases in a shorter exposure time, showing that the increased production of proteases is not enough to bypass the inhibitory effects of SKTI in a short period. Similar findings have been reported for other insects exposed to plant protease inhibitors (Cotabarren, Lufano, Parisi, & Obregón, 2020; Jongasma & Bolter, 1997).

Gene reprogramming is an expected response in the insect's attempt to overcome the negative effects of PIs and thus increasing its tolerance. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) adaptively responds to the effects of plant PIs by regulating the expression of genes encoding for proteases (Chougule et al., 2005; Grabherr et al., 2011; Patankar et al., 2001; Sarate et al., 2012). Besides acting directly on proteolytic enzymes in the gut of *A. gemmatalis*, the PIs also trigger cell signalling to reprogram stress-related genes. This confirms that protease inhibitors can induce not only changes in on the assimilation of nutrients such as proteins, but can also induce apoptosis and oxidative stress in midgut cells of *A. gemmatalis*, as has been shown in other pest insects (Napoleão et al., 2019).

Furthermore, PIs causes changes in the midgut morphology of insects. In both treatments containing PI, the midgut digestive cells shown cytoplasm vacuolization (after 6 h in SKTI and 12 h in Berenil) that is maintained up to 24 h, following occurrence of apical protrusions that are released as cell fragments to the gut lumen. In addition, the brush border of goblet cells undergoes severe disorganisation. These features can be related to the number of stress-related proteins expressed in *A. gemmatalis*, which has been associated with cytoplasm vacuolization as a response to metabolic stress since the midgut is an important organ of detoxification and antioxidative defence (Lushchak, Matviishyn, Husak, Storey, & Storey, 2018). Possibly, many of these vacuoles are also autophagosomes degrading damaged organelles. The release of cell fragments into the lumen has been associated with apocrine secretion, but also with mechanisms of cell death, as some of these fragments contain the cell nucleus (similar to apoptosis in mammals; Shubin, Demidyuk, Komissarov, Rafieva, & Kostrov, 2016). Similar cell death features have been reported in the midgut cells of *A. gemmatalis* exposed to some pesticides (De Almeida et al., 2014; Castro, Martínez, Barbosa, et al., 2019; Castro, Martínez, Plata-Rueda, et al., 2019; Fiaz, Martínez, Costa, et al., 2018; Fiaz, Martínez, Plata-Rueda, et al., 2018).

Molecular docking analyses and characterisations of the binding energies of the inhibitor Berenil to *A. gemmatalis* trypsins showed that the stabilisation of this complex is achieved by 39% hydrogen bonds and 61% hydrophobic interactions. Nevertheless, the contributions to

the total change in Gibbs free energy during binding of Berenil might be associated with these interactions. Differences in the affinity energies between the trypsin and the ligand might be explained by the variations of the hydrogen bonds in each docking, such as shown in other studies (Perilo, Pereira, Santoro, & Nagem, 2010). These differences can be explained by variation of the amino acid residues involved in the interaction, which are mainly uncharged polar or non-polar in the S2' and near to S1 sites.

In summary, we propose that a Berenil inhibitor can interact with the trypsin through hydrogen bonds allowing the ligand to access a more hydrophobic pocket and its inhibitory effect on serine proteases as validated in the experimental analyses. Also, the integration of our results shows that the use of Berenil can be efficient for the management of the *A. gemmatalis*, since its inhibitory capacity and morphological damages on the midgut cells is rapid possibly by the delay in the expression of proteases, less extensive reprogramming of protein isoforms and the lower expression of up-regulated proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests. All the authors of this manuscript accepted that the paper is submitted for publication in the Annals of Applied Biology, and report that this paper has not been published or accepted for publication in another journal, and it is not under consideration at another journal.

ETHICS STATEMENT

All applicable international, national and institutional guidelines for the care and use of animals were considered in the present investigation.

ORCID

Neillier Rodrigues da Silva Junior  <https://orcid.org/0000-0002-4683-249X>

José Eduardo Serrão  <https://orcid.org/0000-0002-0477-4252>

Maria Goreti de Almeida Oliveira  <https://orcid.org/0000-0003-4862-7657>

REFERENCES

- de Almeida Barros, R., Meriño-Cabrera, Y., Vital, C. E., da Silva Júnior, N. R., de Oliveira, C. N., Lessa, B. S., ... de Almeida Oliveira, M. G. (2021). Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. *Pest Management Science*, 77, 1714–1723. <https://doi.org/10.1002/ps.6191>
- De Almeida G. D., Zanuncio J. C., Senthil-Nathan S., Pratisoli D., Polanczyk R. A., Azevedo D. O. & Serrão J. E. (2014) Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebrate Survival Journal*, 11, 79–86.
- An, C., Budd, A., Kanost, M. R., & Michel, K. (2011). Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1929–1939. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0543-z>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
- Bueno, A. F., Panizzi, A. R., Hunt, T. E., Dourado, P. M., Pitta, R. M., & Gonçalves, J. (2021). Challenges for adoption of integrated Pest management (IPM): The soybean example. *Neotropical Entomology*, 50, 5–20. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00792-9>
- Castro B. M. C., Martinez L. C., Barbosa S. G., Serrão J. E., Wilcken C. F., Soares M. A., ... Zanuncio J. C. (2019) Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci Rep*, 9, 6667. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43074-0>
- Castro, B. M. d. C. e., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Soares, M. A., Tavares, W. d. S., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2019). Chlorantraniliprole degenerates microvilli goblet cells of the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. *Chemosphere*, 229, 525–528.
- Chougule, N. P., Doyle, E., Fitches, E., & Gatehouse, J. A. (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*, 54, 563–572.
- Chougule, N. P., Giri, A. P., Sainani, M. N., & Gupta, V. S. (2005). Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 355–367.
- Cotabarren, J., Lufano, D., Parisi, M. G., & Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, 292, 110398.
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Dawkar, V. V., Chikate, Y. R., Lomate, P. R., Dholakia, B. B., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2013). Molecular insights into resistance mechanisms of Lepidopteran insect pests against toxicants. *Journal of Proteome Research*, 12, 4727–4737. <https://doi.org/10.1021/pr400642p>
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 271–278.
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Costa, M. d. S., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., ... Serrão, J. E. (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.080>
- Fiaz, M., Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Shareef, M., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2018). Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Chemosphere*, 212, 337–345.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644–652.
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean Caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69, 487–488.
- Hemmati, S. A., & Mehrabadi, M. (2020). Structural ensemble-based computational analysis of trypsin enzyme genes discovered highly conserved peptide motifs in insects. *Archives of Phytopathology and Plant*

- Protection, 53, 335–354. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1744978>
- Hemmati, S. A., Sajedi, R. H., Moharrampour, S., Taghdir, M., Rahmani, H., Etezad, S. M., & Mehrabadi, M. (2017). Biochemical characterization and structural analysis of trypsin from *Plodia interpunctella* midgut: Implication of determinants in extremely alkaline pH activity profile. *Physiological Entomology*, 42, 307–318. <https://doi.org/10.1111/phen.12196>
- Jongsma, M. A., & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43, 885–895.
- Junqueira, R. G., Silva, E., & Mares-Guia, M. (1992). Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25, 873–887.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845–858. <http://predictioncenter.org/index.cgi>
- King, A. M., & Macrae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, 60, 59–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162107>
- Krinski, D., Foerster, L. A., & Deschamps, C. (2018). Efeito ovicida de óleos essenciais de 18 espécies brasileiras de piper: Controlando *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) no estágio inicial de desenvolvimento. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 40, e35273.
- Li, B., Yu, H. Z., Ye, C. J., Ma, Y., Li, X., Fan, T., ... Xu, J. P. (2017). *Bombyx mori* Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. *Gene*, 610, 64–70.
- Lima, A. T., Bastos, F. A., Teubner, F. J., Neto, R. R., Cooper, A., & Barroso, G. F. (2020). Strengths and weaknesses of a hybrid post-disaster management approach: The Doce River (Brazil) mine-tailing dam burst. *Environmental Management*, 65, 711–724.
- Lomate, P. R., Dewangan, V., Mahajan, N. S., Kumar, Y., Kulkarni, A., Wang, L., ... Giri, A. P. (2018). Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 17, 1324–1336. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000533>
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *EXCLI Journal*, 17, 1101–1136.
- Mares-Guia, M., & Shaw, E. (1965). Studies on the active center of trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 1579–1585.
- Marinho-Prado, J. S., Lourenção, A. L., Guedes, R. N. C., Pallini, A., Oliveira, J. A., & Oliveira, M. G. A. (2012). Enzymatic response of the eucalypt defoliator *Thyrinteina amobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) to a bis-benzamide proteinase inhibitor. *Neotropical Entomology*, 41, 420–425. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0063-7>
- Meekins, D. A., Kanost, M. R., & Michel, K. (2017). Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 62, 105–119.
- Meriño-Cabrera, Y., de Oliveira Mendes, T. A., Castro, J. G. S., Barbosa, S. L., Macedo, M. L. R., & de Almeida Oliveira, M. G. (2020). Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatalis* trypsins by *Adenanthera pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104, e21687. <https://doi.org/10.1002/arch.21687>
- Meriño-Cabrera, Y., Severiche Castro, J. G., Rios Diez, J. D., Rodrigues Macedo, M. L., de Oliveira Mendes, T. A., & Goretí de Almeida Oliveira, M. (2020). Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioideis* pest control. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 122, 103390.
- Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance—A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 437–449. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>
- Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D. L., Nova, I. C. V., Lima, T. A., Paiva, P. M. G., & Pontual, E. V. (2019). Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*, 75, 1212–1222. <https://doi.org/10.1002/ps.5233>
- Ochoa-Campuzano, C., Martínez-Ramírez, A. C., Contreras, E., Rausell, C., & Real, M. D. (2013). Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107, 299–308.
- Ogawa, K. I., & Tojo, S. (1981). Quantitative changes of storage proteins and Vitellogenin during the pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology*, 16, 288–296.
- Oliveira, M. G. A., De Simone, S. G., Xavier, L. P., & Guedes, R. N. C. (2005). Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology—B, Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 369–380.
- Oliveira, M. G. D. A., Rogana, E., Rosa, J. C., Reinhold, B. B., Andrade, M. H., Greene, L. J., & Mares-Guia, M. (1993). Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with *p*-diazoniumbenzamide and kinetic characterization of Tyr-151-(*p*-benzamidino)-azo- β -trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 26893–26903.
- Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2001). Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 453–464.
- Patarroyo-Vargas, A. M., Cordeiro, G., da Silva, C. R., da Silva, C. R., Mendonça, E. G., Visóto, L. E., ... Oliveira, M. G. A. (2020). Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, 1–12.
- Patarroyo-Vargas, A. M., Merino-Cabrera, Y. B., Zanuncio, J. C., Rocha, F., Campos, W. G., & de Almeida Oliveira, M. G. (2018). Kinetic characterization of *Anticarsia gemmatalis* digestive serine-proteases and the inhibitory effect of synthetic peptides. *Protein & Peptide Letters*, 24, 1040–1047.
- Perilo, C. S., Pereira, M. T., Santoro, M. M., & Nagem, R. A. P. (2010). Structural binding evidence of the trypanocidal drugs Berenil[®] and Pentacarinate[®] active principles to a serine protease model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 502–511.
- Presnell, S. R., Patil, G. S., Mura, C., Jude, K. M., Conley, J. M., Bertrand, J. A., ... Williams, L. D. (1998). Oxyanion-mediated inhibition of serine proteases. *Biochemistry*, 37, 17068–17081. <https://doi.org/10.1021/bi981636u>
- Ran, X., & Gestwicki, J. E. (2018). Inhibitors of protein–protein interactions (PPIs): An analysis of scaffold choices and buried surface area. *Current Opinion in Chemical Biology*, 44, 75–86.
- Ran, X., Zhao, Y., Liu, L., Bai, L., Yang, C. Y., Zhou, B., ... Wang, S. (2015). Structure-based design of γ -carboline analogues as potent and specific BET bromodomain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 4927–4939. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00613>
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Kotkar, H. M., Ratnakaran, N., Susan, N., Gupta, V. S., & Giri, A. P. (2012). Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*, 12, 42. <https://doi.org/10.1673/031.012.4201>
- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7, 55863–55889.

- da Silva Júnior, N. R., Vital, C. E., de Almeida Barros, R., Faustino, V. A., Monteiro, L. P., Barros, E., ... de Almeida Oliveira, M. G. (2020). Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103, e21631. e21631. <https://doi.org/10.1002/arch.21631>
- Stefanini, M., Martino, C., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216, 173–174. <https://doi.org/10.1038/216173a0>
- Accelrys (2012) Discovery Studio Visualizer software, Version 4.0. <http://www.accelrys.com>
- Telang, A., Buck, N. A., & Wheeler, D. E. (2002). Response of storage protein levels to variation in dietary protein levels. *Journal of Insect Physiology*, 48, 1021–1029.
- Volpicella, M., Ceci, L. R., Cordewener, J., America, T., Gallerani, R., Bode, W., ... Beekwilder, J. (2003). Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 270, 10–19. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03368.x>
- Walker, D. R., All, J. N., McPherson, R. M., Boerma, H. R., & Parrott, W. A. (2000). Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry1Ac* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 93, 613–622. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.613>
- Xavier, L. P., Oliveira, M. G. A., Guedes, R. N. C., Santos, A. V., & De Simone, S. G. (2005). Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology*, 102, 147–153. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.023.html>
- Zhao, Y., Bai, L., Liu, L., McEachern, D., Stuckey, J. A., Meagher, J. L., ... Wang, S. (2017). Structure-based discovery of 4-(6-methoxy-2-methyl-4-(quinolin-4-yl)-9H-pyrimido[4,5-b]indol-7-yl)-3,5-dimethylisoxazole (CD161) as a potent and orally bioavailable BET bromodomain inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 3887–3901. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00193>
- Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. (2015). Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of Entomology*, 60, 233–252. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020816>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Coura, R. R., da Silva Junior, N. R., Meriño-Cabrera, Y., Díez, J. D. R., Barros, R. A., Barbosa, S. L., de Oliveira, J. V. A., da Rocha, G. C., Serrão, J. E., de Oliveira Ramos, H. J., & de Almeida Oliveira, M. G. (2022). Extensive reprogramming of protein isoforms and histopathological alterations in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* fed with protease inhibitors. *Annals of Applied Biology*, 180(3), 383–397. <https://doi.org/10.1111/aab.12740>