

ROBERTA RIBEIRO COURA

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO INTESTINO DE  
*Anticarsia gemmatalis* EM RESPOSTA A INIBIDORES DE  
PROTEASES**

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C858a  
2017 Coura, Roberta Ribeiro, 1985-  
Análise proteômica comparativa do intestino de *Anticarsia  
gemmatalis* em resposta a inibidores de proteases / Roberta  
Ribeiro Coura. – Viçosa, MG, 2017.  
xiv, 107 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 67-78.

1. *Anticarsia gemmatalis*. 2. Enzimas proteolíticas.  
3. Relação inseto-planta. 4. Insetos como transmissores de  
doenças das plantas. 5. Espectrometria de massa. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Aplicada. II. Título.

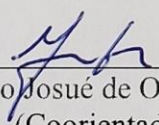
CDD 22. ed. 595.78

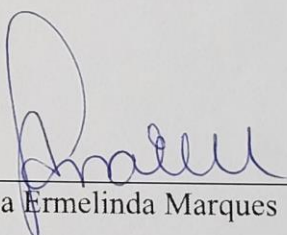
ROBERTA RIBEIRO COURA

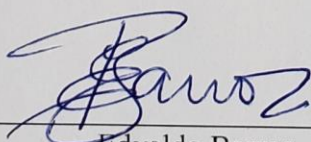
**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO INTESTINO DE  
*Anticarsia gemmatalis* EM RESPOSTA A INIBIDORES DE  
PROTEASES**

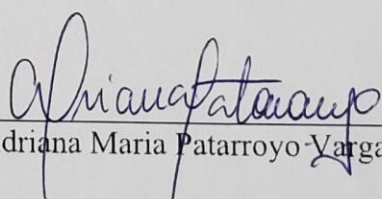
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

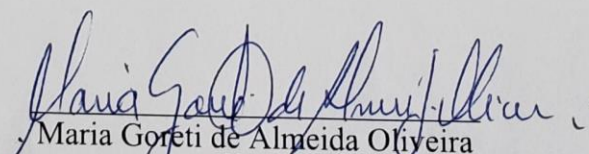
APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.

  
\_\_\_\_\_  
Humberto Josué de Oliveira Ramos  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Ana Ermelinda Marques

  
\_\_\_\_\_  
Edvaldo Barros

  
\_\_\_\_\_  
Adriana Maria Patarroyo Vargas

  
\_\_\_\_\_  
Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

Aos meus amados pais, Antônio Roberto e Nilce,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a vida, por me permitir desenvolver este trabalho e por estar sempre comigo nos momentos difíceis;

Aos meus pais e irmão, pelo amor infinito, pelos conselhos, pelas orações, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, pela presença constante apesar da distância e por serem modelos de conduta de vida.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, minha orientadora, pela oportunidade, pela orientação na realização deste trabalho e na minha formação profissional, pelo incentivo, pelo apoio e confiança;

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos pela coorientação, pelos ensinamentos, pelo incentivo e principalmente no final do trabalho com todas as valiosas sugestões em proteômica;

À Doutora Ana Ermelinda Marques por toda contribuição nesse projeto, nas análises de proteômica, pela dedicação, pela confiança, por seu tempo, por seu conhecimento, por todas as críticas e sugestões apresentadas e por toda disponibilidade em ajudar todos da equipe do laboratório sempre;

Ao técnico Doutor Edvaldo Barros por todas as valiosas instruções nas análises de espectrometria, sugestões apresentadas e disponibilidade;

Aos secretários Eduardo Pereira Monteiro e Marco Aurélio Ferreira de Oliveira do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela competência e pela atenção durante todo este período;

A todos os demais professores pelos ensinamentos, que contribuíram para minha formação profissional;

Aos companheiros do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e Peptídeos: Fabrício, Francelina, Gláucia, Gustavo, Paulo, Cristian, Manuel, Verônica, Yaremis, Jenny e Juan pela amizade, agradável convivência, apoio, incentivo, sugestões, por tornarem a rotina de trabalho algo tão prazeroso, agradeço por terem feito parte da minha vida acadêmica;

Ao Juan e Jenny, que estiveram presentes no meu dia a dia durante todo o doutorado, compartilhando conhecimentos científicos que foram de grande ajuda nos experimentos que fizemos. Agradeço pela linda amizade, pelos ensinamentos, apoio e incentivo no término deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de conhecer vocês, que se tornaram uma grande companhia de laboratório e da vida, quero tê-los para sempre por perto;

Aos meus queridos amigos **Ciro e Dane**, que desde a época da graduação já contava com apoio e amizade verdadeira; meus irmãos de alma, pela amizade sincera ao longo de todos esses anos, e por tornarem Viçosa um Lar;

Ao **Lucas Martins Cordeiro**, um grande amigo que sempre esteve por perto, pelo apoio, pela amizade, pelos conselhos e paciência por me ouvir sempre durante todo este processo.

As minhas amigas de república, **Jocarstea, Lorena, Luna** e especialmente **Bruna Pimenta** que esteve comigo desde o mestrado, pelo apoio, pelo incentivo, por todos os risos e alegrias que trouxeram para minha vida, além de ombros amigos para chorar, vocês são inesquecíveis e estarão sempre comigo;

À toda minha família que sempre estiveram presentes, ao me dar forças e me apoiar em todas as minhas decisões. Principalmente à minha tia **Elzinha** e minhas queridas primas **Mara e Aninha**, por toda preocupação, carinho e amor.

À **Universidade Federal de Viçosa** e ao Programa de Pós-Graduação em **Bioquímica Aplicada** pela oportunidade concedida para a realização do doutorado;

Ao Departamento de **Bioquímica e Biologia Molecular**, seus professores, técnicos e funcionários, pelo apoio e gentileza em atender nossas necessidades.

Ao Instituto de **Biologia Aplicada à Agropecuária BIOAGRO** e ao Laboratório de **Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos**, por me permitir o desenvolvimento técnico de que necessitava;

Ao Núcleo de **Análise de Biomoléculas (NuBioMol)**, da UFV por disponibilizar a estrutura e o desenvolvimento técnico para toda análise de espectrometria e bioinformática;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa, sem a qual seria impossível continuar meus estudos;

Aos membros da banca professor **Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos**, professora **Dra. Adriana Maria Patarroyo Vargas**, **Dr. Edvaldo Barros**, e a **Dra. Ana Ermelinda Marques**, pela disponibilidade, pela compreensão e pronto atendimento em aceitar o convite para participar desse processo avaliativo.

A todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.  
Muito Obrigada!

## BIOGRAFIA

Roberta Ribeiro Coura, filha de Antônio Roberto Coura e Nilce Aparecida Ribeiro Coura, nasceu em 9 de abril de 1985, na cidade de Timóteo, Estado de Minas Gerais.

Em março de 2005 iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2010.

Em março de 2010, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo em 24 de fevereiro de 2012, a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Em agosto de 2012 iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Aplicada na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, defendendo a Tese em 24 de fevereiro de 2017.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	viii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo Geral .....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1. Soja .....	5
3.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) .....	6
3.3. Interação planta-inseto .....	11
3.4. Proteases .....	13
3.4.1. Serino-proteases .....	14
3.5. Inibidores de proteases .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1. Criação da lagarta da soja .....	19
4.2. Preparo da dieta .....	19
4.3. Insetos submetidos a tratamento com e sem inibidores .....	20
4.4. Análise Proteômica .....	21
4.4.1. Extração do intestino e obtenção do extrato proteico da lagarta de soja .....	21
4.4.2. Quantificação de proteínas .....	21
4.4.3. Eletroforese bidimensional .....	21
4.4.3.1. Focalização isoeletrica (1ª dimensão) .....	22
4.4.3.2. Equilíbrio das fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG) .....	22
4.4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (2º dimensão) .....	23
4.5. Coloração do gel .....	23
4.6. Captura de imagens e análise da expressão .....	24
4.7. Tripsinização das amostras .....	24
4.8. Análise das proteínas por espectrometria de massas .....	25
4.9. Identificação das proteínas .....	26
4.10. Caracterização funcional das proteínas .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28

5.1. Proteoma diferencial em resposta ao inibidor de protease sintético berenil no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	28
5.2. Proteoma diferencial em resposta ao inibidor de protease de soja tipo Kunitz (SKTI) no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	40
5.3. Análise das proteínas identificadas no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos controles e com inibidores berenil e de soja Kunitz e as suas interações funcionais .....	50
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS .....	79

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Ciclo de desenvolvimento da <i>Anticarsia gemmatalis</i> . .....	8
<b>Figura 2.</b> <i>Anticarsia gemmatalis</i> , inseto adulto.....	8
<b>Figura 3.</b> Diferença de coloração de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . .....	9

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>Figura 4.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 12 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 12 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	29
<b>Figura 5.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas no intestino da lagarta <i>A gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 12 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	31
<b>Figura 6.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 24 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 24 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	33
<b>Figura 7.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta <i>A. gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 24 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	34
<b>Figura 8.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 48 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 48 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	36
<b>Figura 9.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta <i>A. gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 48 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	38
<b>Figura 10.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 12 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 12 h; e sua identificação no MASCOT (Banco	

de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	41
<b>Figura 11.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta <i>A. gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 12 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	42
<b>Figura 12.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 24 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 24 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	44
<b>Figura 13.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta <i>A. gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 24 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	45
<b>Figura 14.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 48 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 48 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG. ....	47
<b>Figura 15.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta <i>A. gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 48 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais. ....	48
<b>Figura 16.</b> Representação dos spots que apresentaram identificação para a mesma proteína, no gel de eletroforese bidimensional do perfil proteico do inibidor de protease Kunitz nas 6 horas de tratamento. (*) Proteína do choque térmico Hsc 70. (*) V-ATPase. (*) Pr Proteína de ligação ao fosfatidiletanolina. (*) Proteína de ligação a actina. (*) Proteína de choque térmico Hsp 90. (*) Aldeído desidrogenase. (*) Aspartato aminotransferase. ....	52
<b>Figura 17.</b> Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial nos tratamentos com o inibidor berenil e o inibidor de soja Kunitz, nas diferentes horas. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “ <i>confidence view</i> ”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida. ....	54
<b>Figura 18.</b> Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial em ambos os tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, nas diferentes horas. (A) Interações envolvendo proteínas do enovelamento, síntese e degradação de proteínas. (B)	

Interações envolvendo proteínas chaperonas e produção de ATP. (C) Interações envolvendo proteínas chaperonas e processo de tradução proteica. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “*confidence view*”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida.....56

**Figura 19.** Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial em ambos os tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, nas diferentes horas. (A) Interações de proteínas na via glicolítica. (B) Interação envolvendo o controle da homeostase de pH em organelas. (C) Interações de proteínas no ciclo de Krebs. (D) Interações envolvendo o estresse oxidativo celular. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “*confidence view*”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida. ....58

**Figura 20.** Abundância relativa (% volume) de spots identificados com homologia com a proteína do choque térmico Hsc 70 entre o controle e os tratamentos berenil e kunitz, nas diferentes horas. ....61

**Figura 21.** Abundância relativa (% volume) de spots identificados com homologia com a proteína ATPase do tipo vacuolar (subunidade b) entre o controle e os tratamentos berenil e kunitz, nas diferentes horas. ....63

**Gráfico 1.** Perfil geral dos spots proteicos identificados por espectrometria de massa no modo MS/MS em intestino de *Anticarsia gemmatalis* apresentados comparando o inibidor berenil e o inibidor Kunitz, sendo diferencialmente abundantes nos tratamentos com os inibidores em pelo menos uma das horas. ....50

## ANEXOS

**Anexo 1.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com berenil nas 6 e 12 horas. ....79

**Anexo 2.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 12 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.....81

**Anexo 3.** Lista das proteínas identificadas em intestino de *Anticarsia gemmatalis* nas condições de tratamentos com o inibidor berenil e o inibidor de soja Kunitz, nas diferentes horas, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG. ....82

<b>Anexo 4.</b> Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos com berenil nas 6 e 24 horas.....	85
<b>Anexo 5.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 24 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> .....	87
<b>Anexo 6.</b> Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos com berenil nas 6 e 48 horas.....	88
<b>Anexo 7.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 48 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> .....	90
<b>Anexo 8.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 12 h. As setas indicam o os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> .....	91
<b>Anexo 9.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 24 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> .....	92
<b>Anexo 10.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 48 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> .....	93
<b>Anexo 11.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos controles, nas 6 e 12 horas.....	94
<b>Anexo 12.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos controles, nas 6 e 24 horas.....	96
<b>Anexo 13.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos controles, nas 6 e 48 horas.....	98
<b>Anexo 14.</b> Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 12 horas.....	100
<b>Anexo 15.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com	

dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 12 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> . .....	101
<b>Anexo 16.</b> Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 24 horas. ....	102
<b>Anexo 17.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 24 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> . ....	104
<b>Anexo 18.</b> Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 48 horas. ....	105
<b>Anexo 19.</b> Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de <i>A. gemmatalis</i> . (A) Representa o perfil proteico das lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 48 h. As setas indicam os <i>spots</i> diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com <i>Coomassie Blue G-250</i> . ....	107

## RESUMO

COURA, Roberta Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Análise proteômica comparativa do intestino de *Anticarsia gemmatalis* em resposta a inibidores de proteases.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Carolina Rocha da Silva, Gláucia Cordeiro, Joel Antônio de Oliveira e Humberto Josué de Oliveira Ramos.

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, é considerada uma das principais pragas da cultura da soja. Os danos causados pelo ataque deste inseto associado à relevância econômica do cultivo da soja para o Brasil e para o mundo fomentam a busca por alternativas no controle deste inseto. Estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases têm sido estudadas, o conhecimento das enzimas digestivas e metabolismo do inseto tem se mostrado fundamental. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar proteínas com abundância diferencial no intestino de *A. gemmatalis* em resposta a inibidor de protease, visando obter dados que poderão contribuir para esclarecer o mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis* em resposta a inibidores de proteases na interação planta-inseto. Foram dissecados intestinos de lagartas alimentadas com os inibidores de proteases berenil e o Kunitz, nas horas 6 h, 12 h, 24 h e 48 h e as proteínas extraídas por maceração. Os *spots* com abundância diferencial foram digeridos e os peptídeos analisados no espectrômetro de massa MALDI/TOF-TOF. Os espectros (MS/MS) foram pesquisados em bancos de dados usando a ferramenta MASCOT e as proteínas identificadas foram validadas usando o *software* Scaffold. Foram 44 *spots* de proteínas identificados, nos tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, nas diferentes horas, que correspondeu a 33 proteínas distintas. As proteínas identificadas pertenciam a diferentes categorias funcionais envolvidas no metabolismo energético, do carbono, de aminoácido, de carboidratos, de lipídeos, no estresse oxidativo e no *turnover* proteico e chaperonas moleculares. Algumas isoformas da proteína ATPase apresentaram menor abundância em relação ao controle, em ambos tratamentos. Enquanto a maioria das proteínas de choque térmico 70 apresentaram maior abundância que o controle. As proteínas piruvato desidrogenase, fosfoglicerato mutase e a ATP sintase aumentaram abundância e as proteínas aldeído desidrogenase e carbonil redutase diminuíram abundância no tratamento com berenil. No tratamento com Kunitz as proteínas arginina quinase e a choque térmico Hsp 90 aumentaram a abundância enquanto as proteínas enoil-CoA hidratase, ATP sintase e a aspartato aminotransferase diminuíram a abundância. A presença dos inibidores berenil e Kunitz na lagarta *A. gemmatalis* alterou o perfil de proteínas no intestino em ambos tratamentos.

## ABSTRACT

COURA, Roberta Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Comparative proteomic analysis of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* in response to protease inhibitors.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Carolina Rocha da Silva, Gláucia Cordeiro, Joel Antônio de Oliveira and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

The soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is considered one of the main pests of soybean crop. The damage caused by the attack of this insect associated to the economic relevance of soybean cultivation to Brazil and to the world foments the search for alternatives in the control of this insect. Strategies for control of insect pests based on the use of protease inhibitors have been studied, knowledge of digestive enzymes and insect metabolism has been shown to be fundamental. In this context, this work aimed to identify proteins with differential abundance in the midgut of *A. gemmatalis* in response to protease inhibitor, aiming to obtain data that could contribute to scientifically elucidate the adaptive mechanism of *A. gemmatalis* in response to protease inhibitors in the interaction plant and insect. Midgut of caterpillars fed with a berenyl protease inhibitor and Kunitz type soybean inhibitor were dissected at 6h, 12 h, 24 h and 48 h and the proteins extracted. Protein extracts were submitted to two-dimensional gel electrophoresis. The differential abundance spots were digested and the peptides analyzed in the MALDI / TOF-TOF mass spectrometer. Fragmentation spectra (MS / MS) were searched in databases using the MASCOT tool, and the identified proteins were validated using the Scaffold software. A total of 44 protein spots were identified in the berenyl and Kunitz treatments at different times, which corresponded to 33 distinct proteins. The proteins identified belong to different functional categories involved in the energy, amino acids, carbohydrates, lipids metabolism, oxidative stress, protein turnover and chaperones. Some ATPase protein isoforms presented lower abundance than control in both treatments. While most heat shock 70 proteins were more abundant than control. Pyruvate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase and ATP synthase proteins increased abundance, and aldehyde dehydrogenase and carbonyl reductase proteins decreased abundance in berenyl treatment. In Kunitz treatment arginine kinase and heat shock Hsp 90 proteins increased abundance, while enoyl-CoA hydratase, ATP synthase and aspartate aminotransferase proteins decreased abundance. Berenyl and Kunitz inhibitors in caterpillar *A. gemmatalis* altered the protein profile in the midgut in both treatments.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja é um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país. Atualmente o Brasil é considerado o país que tem maior potencial (terra, tecnologia e clima) para expandir consideravelmente a produção de soja e atender a demanda mundial crescente. A soja é plantada praticamente em todo território nacional, destacando-se como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou exportação. Pela análise feita a partir do levantamento da safra 2016/2017 realizado pela CONAB (CAMPANHA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) foram estimados em 103,0 milhões de toneladas de produção de grãos de soja, valor 6,19 % maior que o estimado para a safra passada 2015/2016 (CONAB, 2016).

Os cultivos de soja estão sujeitos ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo. Eles afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE *et al.*, 2004). Os insetos não apenas provocam perdas na produtividade diretamente pela herbivoria, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas. Estas perdas ocorrem mesmo com o uso de pesticidas e fungicidas, contudo, sem o uso destes produtos, ou outras estratégias de controle não químico, as doenças por pragas podem atingir 70 % da produção das culturas no mundo, representando um prejuízo de 400 bilhões de dólares (VIANNA *et al.*, 2011).

Entre os insetos que trazem consequências econômicas mais significativas para a lavoura de soja destaca-se a *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-da-soja. Este inseto é um dos principais causadores de danos a sojicultura atuando como desfolhador, e geralmente, suas maiores incidências ocorrem durante o período vegetativo até o final da floração, exigindo atenção e controle rápido para não causar grandes prejuízos econômicos (SÁVIO *et al.*, 2008; VIANNA *et al.*, 2011).

Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização de agroquímicos (VIANNA *et al.*, 2011), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos, cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as consequências ambientais inaceitáveis e a própria

pressão de consumidores contra essa prática, têm provocado uma revolução nas técnicas de controle de pragas na agricultura moderna. Diante disso, tornam-se necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle de pragas (VIANNA *et al.*, 2011; SANDHU *et al.*, 2012). A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação no manejo integrado de pragas (SCOTT *et al.*, 2010).

As plantas possuem um complexo sistema de autodefesa contra patógenos e herbívoros. Algumas das defesas químicas são constitutivas, formando barreiras físicas ou biológicas contra os organismos invasores, outras são ativadas e induzidas na ocasião do ataque à planta. A resposta ao dano causado na planta pode ser local ou sistêmica, sendo muitos destes compostos químicos de defesa denominados “metabólitos secundários” e produzidos a partir de uma via biossintética especializada (PILON *et al.*, 2012).

Sabe-se que a rota de defesa de plantas, conhecida como via das lipoxigenases, culmina com a produção do ácido jasmônico, hormônio vegetal que ativa genes que expressam inibidores de proteases, classificados como, agentes antimetabólicos para os insetos. Os inibidores de proteases interferem na digestão proteica dos insetos, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos e prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (SCOTT *et al.*, 2010; WUNSCH, *et al.*, 2011). Em contrapartida, como resultado de um processo co-evolutivo, estes insetos também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através do aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes enzimáticas, na tentativa de burlar o efeito dos inibidores (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010, JAMAL *et al.*, 2012).

Apesar dos mecanismos adaptativos dos insetos, pesquisas sobre a aplicabilidade de inibidores de proteases, em programas de controle de pragas, têm sido desenvolvidas e consideradas promissoras visando à expressão desses inibidores em plantas geneticamente modificadas, tornando-as mais resistentes ao ataque de insetos (ZHANG *et al.*, 2010; JAMAL *et al.*, 2012; MACEDO *et al.*, 2014). Entretanto, o sucesso dessa estratégia será obtido quando a planta for capaz de expressar uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais que estão envolvidas no

processo de adaptação do inseto (VISÔTTO *et al.*, 2009; PILON *et al.*, 2013). Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto e as interações deste com o ambiente, levando em consideração à bioquímica da sua digestão, a resposta bioquímica a fatores antimetabólicos, a contribuição da microbiota associada ao seu trato digestivo e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pelo inseto e pela microbiota simbiote (SRINIVASAN *et al.*, 2006; VISÔTTO *et al.*, 2009; PILON *et al.*, 2013).

As enzimas primárias da digestão em lepidópteras são as serino-proteinases, particularmente as tripsinas (TERRA e FERREIRA, 1994; TERRA *et al.*, 1996, OLIVEIRA, *et al.*, 2005). Estudos utilizando extrato bruto e purificado do trato intestinal de *A. gemmatalis* mostraram a predominância de serino-proteases do tipo tripsina no seu processo digestivo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; REIS, 2009). Foram isolados três genes distintos de serino proteases do genoma da lagarta da soja, que mostraram alta identidade com tripsinas de outros insetos da ordem Lepidoptera. Os genes expressos demonstraram ser de tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino-protease Benzamidina, sensíveis aos inibidores proteicos da soja do tipo kunitz (SKTI) e do tipo Bowman-Birk (SBBI), diminuindo sua expressão durante o tratamento, enquanto o inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes (PILON, 2012). Esses estudos mostram que o significado da expressão diferencial de proteases digestivas diante de inibidores de proteases nunca pode ser subestimado.

Neste contexto, estudos para identificar a resposta bioquímica da lagarta-da-soja através da análise proteômica comparativa diante de inibidores de serino-proteases é uma perspectiva a ser explorada. Assim, o intuito desta pesquisa foi esclarecer cientificamente os processos de interação planta-inseto ligados ao mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis* a inibidores de proteases, para posterior desenvolvimento tecnológico de potentes inibidores ou ainda servir de base para a construção de plantas geneticamente modificadas no controle de insetos-pragas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Identificar as proteínas diferencialmente abundantes em resposta a inibidores de serino-proteases, com a finalidade de esclarecer cientificamente os processos bioquímicos de interação planta-inseto, ligados ao mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis* a inibidores de proteases.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Extrair e submeter às proteínas do trato intestinal da lagarta *A. gemmatalis* alimentadas com e sem inibidores de proteases, em diferentes horas, a eletroforese bidimensional;
- Analisar diferenças no padrão de abundância relativa das proteínas presente no intestino de lagartas *A. gemmatalis* tratada com e sem inibidor de serino-proteases, em diferentes horas;
- Sequenciar os peptídeos trípticos das proteínas diferencialmente abundantes do intestino de *A. gemmatalis* por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF;
- Identificar proteínas com abundância diferencial no intestino de *A. gemmatalis* por meio do confronto entre as listas de peptídeos identificados contra as proteínas depositadas em banco de dados;
- Caracterizar funcionalmente as proteínas identificadas no intestino de *A. gemmatalis*, confrontando a sequência das mesmas contra um conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG;
- Relacionar funcionalmente as proteínas identificadas no intestino de *A. gemmatalis*, através de construção de redes de interação por busca em bancos de dados pelo aplicativo STRING;
- Avaliar a ocorrência de diferença de abundância entre as proteínas identificadas no intestino de *A. gemmatalis* ao processo adaptativo do inseto;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Soja

Atualmente, no cenário do agronegócio mundial, a cultura de soja (*Glycine max*) está entre as atividades econômicas que apresenta um crescimento bastante expressivo. Isto pode estar relacionado a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo da soja; consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, especialmente para atender demandas crescentes dos setores ligados à produção de gêneros para alimentação animal, maior desenvolvimento e oferta de tecnologias, que viabilizaram a expansão da exploração da soja para diversas regiões do mundo (DALL'AGNOL *et al.*, 2010).

As perspectivas de redução da oferta global foram confirmadas em função de quedas da safra dos Estados Unidos, principal produtor mundial. Os Estados Unidos, após produzirem 91,47 milhões de toneladas de soja em 2009, teve três anos consecutivos de quebra de safra, voltando a produzir 91,39 milhões de toneladas apenas em 2013. Essas quebras foram ocasionadas por fortes secas e altas temperaturas nas épocas de plantio americano, afetando a produtividade média nesses períodos. O Brasil então passou a ocupar um papel de maior destaque e ampliar a sua posição no mercado internacional. Tal fato é corroborado pela maior capitalização dos produtores brasileiros, associado ao aumento gradual na oferta de recursos nas modalidades de Custeio e Comercialização a juros controlados, que em relação à safra 2013/14, a produção da safra 2016/17 teve um aumento de 15,32%, (CONAB, 2016).

O Brasil ocupa o segundo lugar em produção mundial de cultura de soja, totalizando 31,82 % ou 103,00 milhões de toneladas da estimativa para a safra 2016/2017. O país está entre o maior produtor mundial, Estados Unidos da América, com 31,95% ou 103,42 milhões de toneladas; seguido pela Argentina (terceiro produtor mundial), com 17,61% ou 56,50 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Dos principais países produtores de soja (Estados Unidos, Brasil e Argentina), o Brasil é o que tem maior potencial (terra, tecnologia e clima) para expandir consideravelmente a produção de soja e atender uma demanda mundial crescente. Este fato vem se concretizando, como mostra o desempenho da Produção Nacional, nas últimas safras que saltou de 82,0 milhões de toneladas, na safra 2012/13 para 103,0 milhões de toneladas, na safra 2016/17 (CONAB, 2016; CONAB, 2015).

Dada à importância econômica da soja, os problemas ocasionados pelo ataque de pragas são considerados uma das causas de prejuízos à produção e à qualidade dos grãos ou sementes (SOSA-GOMEZ *et al.*, 2004). A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, sendo capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam ser controlados (EMBRAPA, 2011). As principais pragas e seu parasitismo em cada estágio de desenvolvimento da planta: insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae), os córos e a broca-do-colo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e a broca-das-axilas *Epinotia aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae) atacam as plantas durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até durante a floração. No início da fase reprodutiva é comum o ataque de percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Lepidoptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). Além destas, a soja pode ser atacada por outras espécies de insetos, em geral menos importantes do que as referidas anteriormente (EMBRAPA, 2011).

Os danos causados na cultura da soja podem ser em alguns casos, alarmantes. Mesmo em casos difíceis, não se indica a aplicação preventiva de produtos químicos, pois, além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos da lavoura e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos, causando aumento de pragas secundárias e seleção de resistência de pragas aos inseticidas (EMBRAPA, 2017; EMBRAPA, 2011).

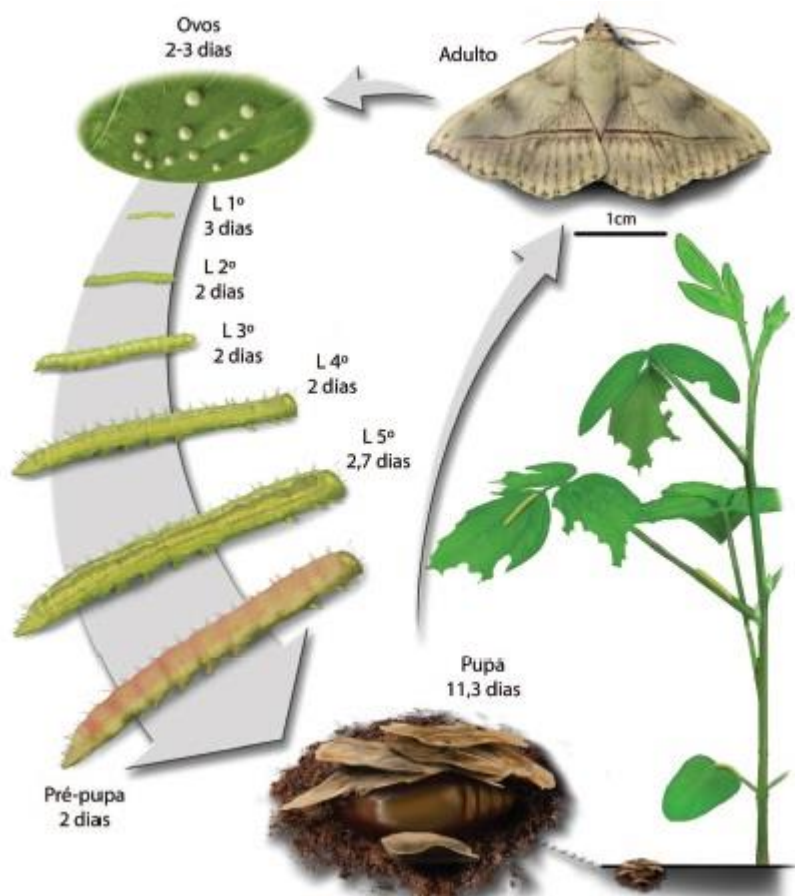
### **3.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* é o principal desfolhador da cultura da soja, uma espécie de lepidóptero de clima tropical e subtropical com ampla distribuição na América do Norte e do Sul (FUGI *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2011). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à

qualidade dos cultivos brasileiros, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (SÁVIO *et al.*, 2008; VIANNA *et al.*, 2011).

A lagarta-da-soja é uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com consequente redução da produção de grãos (SILVA *et al.*, 2002). Os maiores danos ocorrem na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100 % do desfolhamento até atingir seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (ANDRADE *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2011). Embora a preferência alimentar desta lagarta seja a soja, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período de floração (BATISTA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da *A. gemmatilis* é do tipo holometábolo, que tem metamorfose completa durante seu desenvolvimento, e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (ANDRADE *et al.*, 2004). Seu ciclo biológico é de aproximadamente 40 dias (Figura 1), dependendo das condições ambientais, a fase adulta dura cerca de 15 a 20 dias, a mariposa mede cerca de 30 a 38 mm e apresenta coloração variando de cinza a marrom avermelhada ou amarelada, sem dimorfismo sexual. Uma marca predominante na cor padrão é uma linha transversal escura unindo as pontas das asas, a qual é observada quando estas estão completamente estendidas (Figura 2) (FUGI *et al.*, 2005; PRAÇA *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Ciclo de desenvolvimento da *Anticarsia gemmatalis*.

Fonte: EMBRAPA, 2012



**Figura 2.** *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto.

A oviposição do inseto ocorre na face inferior das folhas, embora em casos de infestações mais sérias os ovos possam ser encontrados em sua superfície superior e até mesmo em pecíolos e hastes (BÁRBARA, 2000). Os ovos são esféricos e verdes, e vão escurecendo gradualmente até a coloração marrom avermelhada, pouco antes da eclosão da larva. O período de incubação geralmente dura de três a sete dias (FUGI *et al.*, 2005).

O período larval de *A. gemmatalis* compreende entre cinco e seis ínstaes, o qual é influenciado pelas condições ambientais. A variação de temperatura pode determinar o período larval e exercer influência também sobre o número de ínstaes desenvolvidos. Outros fatores que afetam o período larval são a idade das folhas e injúrias foliares (FUGI *et al.*, 2005). As lagartas recém-eclodidas alimentam-se das folhas, chegando a medir de 40 a 50 mm de comprimento. São de coloração variável de verde ao verde escuro, pardo-avermelhada e em condições de alta população, ou em escassez de alimento podem ser pretas, com cinco listras brancas longitudinais no corpo (Figura 3) (FUGI *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Diferença de coloração de *Anticarsia gemmatalis*.

Fonte: SILVA *et al.*, 2013

No estágio pré-pupa, que dura em média 2 dias, as larvas encolhem atingindo um comprimento médio de 25 mm e adquirem cor marrom escura com poucas listras longitudinais. As pupas podem apresentar cor verde ou marrom, são lisas e medem de 18 a 20 mm no comprimento e 4 a 6 mm na largura, sendo encontradas abaixo da superfície do solo a uma profundidade de 2 cm. O estágio pupal dura em média 7 dias, culminando com a emergência do adulto (PRAÇA *et al.*, 2006).

Inseticidas químicos, utilizados no controle de lagartas desfolhadoras de soja, provocam prejuízos financeiros, desequilibram a cadeia alimentar, elevam pragas secundárias à categoria de pragas-chave, causam surgimento de pragas novas e resistentes. Essas consequências estão diretamente relacionadas ao largo espectro desses produtos e às aplicações realizadas de forma intensiva e indiscriminada (VIANNA *et al.*, 2011; SANDHU *et al.*, 2012; SILVA & ELLIOT, 2016).

Assim, no controle desta praga segue-se uma tendência geral de se experimentar métodos alternativos que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável (BATISTA *et al.*, 2005; SANDHU *et al.*, 2012). No Brasil, destaca-se o programa de controle da lagarta-da-soja desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que utiliza o Vírus da Poliedrose Nuclear Multicapsídeo Baculovírus anticarsia (AgMNPV). Este vírus é altamente específico e atua driblando, de maneira eficiente os mecanismos de defesa da lagarta (SÁVIO *et al.*, 2008). Apesar da alta especificidade que o inseticida biológico do Baculovírus possui no controle da *A. gemmatalis*, uma desvantagem do uso do vírus é o grande tempo entre a infecção e a morte do inseto alvo, em torno de quatro a quinze dias. Desta forma, após a aplicação do vírus, o inseto ainda consegue causar dano à lavoura antes de sua morte (NOHATTO *et al.*, 2010; MIELE *et al.*, 2011).

As enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas. Foi demonstrado que a inibição de enzimas digestiva de *A. gemmatalis*, na presença de inibidores de proteases causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011). Em outros estudos foram sequenciados genes de serino-proteases das lagartas *A. gemmatalis*, que são do grupo das tripsinas. Estes genes apresentaram aumento nos níveis de transcritos, quando as lagartas foram expostas a uma dieta rica em inibidor de serino-proteases, indicando maior expressão de proteases sensíveis e insensíveis ao inibidor (PILON, 2012). Portanto, o conhecimento das enzimas presentes no trato intestinal da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas baseadas na inibição de proteases digestivas.

### 3.3. Interação planta-inseto

Na natureza, os seres vivos se relacionam ou interagem entre si e com o meio ambiente físico (ar, solo, água, etc.), para promover a troca de energia e nutrientes por meio das relações tróficas, formando as cadeias tróficas, também denominadas de cadeia alimentar ou de alimento. Por conseguinte, nos ecossistemas naturais, os insetos fazem parte dessas cadeias, cada qual desempenhando suas funções (AGUIAR-MENEZES & MENEZES, 2005). Nestes ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos que estão continuamente interagindo de uma forma complexa (KANT & BALDWIN, 2007).

As várias atividades benéficas desempenhadas pelos insetos em relação às plantas, como a polinização e a defesa, e pelas plantas em relação aos insetos como prover abrigo, local para oviposição e alimento, mostram a estreita associação entre estes dois organismos (FLEMING *et al.*, 2007). Contudo, com a agricultura, tem se promovida a transformação dos ecossistemas naturais estáveis em ecossistemas artificiais instáveis, os chamados agro-ecossistemas, nos quais as características de auto-regulação inerentes às comunidades naturais são perdidas em função das perturbações também inerentes ao processo produtivo, e assim, requerendo intervenção humana constante. Como consequência do desequilíbrio, os insetos podem atacar as plantas e, dependendo do nível da herbivoria, este pode ser extremamente prejudicial e podendo chegar até mesmo à morte do vegetal (AGUIAR-MENEZES & MENEZES, 2005).

Em resposta ao ataque dos insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização. Dentre elas estão a indução de proteínas de defesa, a liberação de compostos voláteis para o ambiente, os quais atraem predadores dos insetos herbívoros, a síntese de metabólitos secundários e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules. Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e sequestro de compostos tóxicos, mecanismos de fuga e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA *et al.*, 2002; JAMAL *et al.*, 2012).

Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico, que induz uma alteração no padrão de expressão de proteínas da planta, como consequência, ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN,

1992; SCOTT *et al.*, 2010; WUNSCHE *et al.*, 2011; JAMAL *et al.*, 2012). Os inibidores de proteases (IPs) são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência proteica nos insetos. Sua atividade antimetabólica é atribuída à interferência na digestão proteica, que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; PILON *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2011, JAMAL *et al.*, 2012).

Uma técnica bem desenvolvida e com um amplo potencial de utilização é o uso de genes que codificam para proteínas com atividade inseticidas. Por outro lado, pesquisas sobre a aplicabilidade de IPs em programas de controle têm sido desenvolvidas visando, principalmente, à expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (HAQ *et al.*, 2004; DUNAEVSKY *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2010; JAMAL *et al.*, 2012). 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 também desempenham um papel na defesa contra inibidores de proteases de plantas (JAMAL *et al.*, 2012; PILON *et al.*, 2013).

Estudos sobre as respostas biológicas e bioquímicas de insetos submetidos a dietas contendo inibidores de protease de plantas (IPs) têm indicado uma resposta bifásica. Esta resposta é caracterizada por um controle na regulação inicial de todas as proteases digestivas específicas que precede de uma baixa expressão simultânea de proteases sensíveis ao IP e uma elevada expressão de proteases insensíveis ao IP. Dessa forma, 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 e também ocorrem respostas qualitativas que incluem a síntese de isoformas de proteases “insensíveis” que não são capazes de ligar-se ao IP ou que tenha a possibilidade de se ligar e degradar o IP (BOWN *et al.*, 2004; SRINIVASAN *et al.*, 2006; JAMAL *et al.*, 2012). Embora o inseto tenha a opção de combinar essas respostas adaptativas à IPs, a adaptação só é conseguida se o inseto metabolizar com êxito a dieta alterada e continuar o crescimento e desenvolvimento normal. Assim como é difícil prever o destino de IPs ingeridos, as respostas de insetos também podem ser imprevisíveis, devido ao dinamismo e diversidade de proteases digestivas presente no seu trato intestinal (SRINIVASAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010; JAMAL *et al.*, 2012).

Vários estudos também foram realizados no sentido de avaliar o efeito de inibidores de proteases do ponto de vista genômico. Os resultados desses estudos mostram que os perfis da expressão de genes das proteases de insetos apresentam diferentes respostas. Uma delas seria que a presença de IP leva à redução da expressão das proteases constitutivamente expressas no inseto, ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas e que são insensíveis aos inibidores. Outros resultados mostram uma hiperprodução de proteases sensíveis ao inibidor, no intuito de suprir o efeito deletério dos IPs. E por último, os IPs ativam a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas no inseto, mas que podem se ligar e degradar o IP, deixando as principais proteases digestivas do inseto livre para atuarem na hidrólise de proteases (AHN *et al.*, 2009; CHI *et al.*, 2009; OPPERT *et al.*, 2010; JAMAL *et al.*, 2012; PILON *et al.*, 2013). De acordo com esses autores os diferentes genes de proteases são ativados para atuar de forma coordenada para suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento do inseto contra os efeitos antinutricionais dos IPs.

A ligação entre a capacidade de adaptação do inseto e a diversidade de genes de proteases digestivas é um estudo interessante do ponto de vista evolutivo. Deste modo, o significado da expressão diferencial de proteases digestivas nunca pode ser subestimado. Estudos sobre as respostas de insetos frente aos inibidores de proteases são necessários para identificar moléculas que são fundamentais e que eventualmente ajudarão na compreensão dos eventos complexos de sinalização que, são responsáveis pelo acompanhamento e coordenação de absorção de nutrientes e atividade proteolítica intestinal (PILON, 2012).

### **3.4. Proteases**

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo nas ligações peptídicas. As proteases são classificadas de acordo com *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) dentro do grupo três (hidrolases), subgrupo quatro. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARETT, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais, os das exopeptidases e os das 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, serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases e 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 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. Serino-proteases são as principais classes de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteros (TERRA & FERREIRA, 1994). Uma espécie de inseto, muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (OPPERT *et al.*, 2010; PETEK *et al.*, 2012). Postula-se que possuir várias enzimas digestivas poderia ser uma sobreposição funcional para assegurar a degradação nutricional de proteínas. O intestino médio de larvas de lepidópteros, por exemplo, hospeda um ambiente proteolítico complexo de diferentes proteases como, tripsina, quimiotripsinas, elastases, cathepsina B-like, aminopeptidases e carboxipeptidases, que são todas responsáveis pela digestão de proteínas. Sob essa complexidade de múltiplas proteases específicas, geralmente existe uma matriz de diversas isoformas de protease (SRINIVASAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010; OPPERT *et al.*, 2010; PETEK *et al.*, 2012). Muitos insetos exibem uma surpreendente flexibilidade na adaptação a diferentes plantas hospedeiras por alterar as proteases específicas do seu intestino em resposta a mudanças qualitativas no teor de proteína na dieta e quando as proteases existentes são ineficazes e ou ineficientes para a digestão (SRINIVASAN *et al.*, 2006; OPPERT *et al.*, 2010; PETEK *et al.*, 2012; JAMAL *et al.*, 2012). Estudos sobre proteases intestinais de *A. gemmatalis* apontam um aumento global na atividade de proteases durante o ciclo de vida do inseto alimentado com dieta artificial ausente de inibidor, apresentando altos picos no quinto ínstar de desenvolvimento do inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009).

### **3.4.1. Serino-proteases**

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Essas enzimas pertencem a uma das maiores famílias gênicas do

reino animal, são amplamente distribuídas na natureza e encontradas em todos os reinos de vida celular, bem como em vários genomas virais, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos (PAGE & DI CERA, 2008; LOUATI, *et al.*, 2011). Seus representantes mais conhecidos são as tripsinas e quimiotripsinas, que 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, no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (PAGE & DI CERA, 2008; ZHAN *et al.*, 2011).

As serino-proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e ômega peptidase. Com base em suas similaridades estruturais elas são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns. Clãs são divididos em famílias baseados na identidade de sequência e similaridades (BARRETT, 1994; BARRETT & RAWLINGS, 2001). O clã A (SA) agrupa famílias que possuam origens comuns com a quimotripsina; o clã B (SB) com a subtilisina; o clã C (SC) com a carboxipeptidase C; o clã E (SE) com a peptidase A D-Ala-D-Ala de *Escherichia* sp; o clã F (SF) com o repressor do Lex A; e o clã G (SG) que agrupa as serino-proteases ATP dependentes (RAWLINGS & BARRETT, 1994; RAO *et al.*, 1998; RAWLINGS *et al.*, 2006). Essas enzimas são reconhecidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), e tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Algumas das serino proteases são também inibidas por reagente tiol tal qual *p*-cloromercuribenzoato (PCMB), devido à presença de um resíduo de cisteína na região do centro ativo (RAO *et al.*, 1998).

A função catalítica das serino-proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina reativa, histidina, e ácido aspártico), enquanto o grau e tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de *turnover* da enzima, o  $k_{cat}$ , conseqüentemente mudando o mecanismo enzimático, com pequeno efeito no  $K_M$ . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo e contribuem para uma atividade catalítica otimizada (CARTER & WELLS, 1988; PERONA & CRAIK, 1995).

RAO *et al.* (1998), em um trabalho de revisão, descreve que as serino- proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásica e esterásica. A massa molecular das serino-proteases em geral está na faixa de 18 a 35 KDa e o ponto isoelétrico das serino-proteases está geralmente na faixa entre pH 4,0 e 6,0. Serino-proteases alcalinas, que são ativas em pH altamente alcalino, representam um grande subgrupo das serino-proteases. Em estudo de purificação e caracterização de proteases tripsina-*like* do intestino da lagarta *A. gemmatalis*, REIS *et al.* (2009) purificaram proteases com massa molecular de 24,9 KDa e obtiveram maior atividade tripsina-*like* em pH 8,0 ao utilizar substrato L-TAME (tosil-arginina-metil-éster) e em pH 9,0 para o substrato L-BApNA (benzoil-arginina-p-nitroanilida). Ao purificar proteases de microrganismos presente no intestino de *A. gemmatalis*, PILON *et al.* (2013) obtiveram as massas moleculares estimadas das enzimas, que foram de 25 KDa. PILON (2012) identificou e avaliou a expressão de genes de serino-proteases de *A. gemmatalis*. A partir das sequencias codificadas obteve a massa molecular teórica entre 16,83 KDa a 22,32 KDa e o ponto isoelétrico teórico entre 6,20 a 9,38.

### **3.5. Inibidores de proteases**

Os inibidores de proteases podem estar presentes de maneira constitutiva em várias partes das plantas, podendo representar 5-15 % da proteína total de sementes e órgãos de armazenamento, ou podem ser induzidos, local e sistemicamente, em resposta ao ataque de insetos herbívoros. Os inibidores têm como características o fato de serem extremamente resistentes à proteólise e permanecerem ativos em condições diversas de pH intestinal. Além disso, já foram identificados inibidores contra praticamente todas as classes de proteases descritas (JONGSMA & BOLTER, 1997).

Os inibidores das serino-proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (JAMAL *et al.*, 2012). 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 pelo menos 16 famílias diferentes, baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. Seu mecanismo de ação ocorre por inibição competitiva. Atuam bloqueando a ligação do substrato à enzima através da ligação de um segmento peptídico diretamente no sítio catalítico, de maneira semelhante ao substrato ou ao produto. A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela

enzima. O complexo enzima-inibidor 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; GATEHOUSE & GATEHOUSE, 2012; JAMAL *et al.*, 2012).

Os inibidores de serino-proteases presentes em plantas são classificados em sete famílias, através de características de homologia da estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e de pontes dissulfeto. São elas: família das Serpinas; família Kunitz, família Bowman-Birk, família dos inibidores de batata, família dos inibidores de batata II, Família dos inibidores de tripsinas de cevada, família de inibidores de abóbora (JAMAL *et al.*, 2012).

As duas mais bem caracterizadas famílias 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, sendo que cerca de 80 % da inibição da atividade trípica nos grãos é causada pela ação do SKTI e 20 % pela ação do SBBI (BRANDON & FRIEDMAN, 2002). No estudo de purificação e caracterização de proteases tripsina-like do intestino da lagarta *A. gemmatalis*, REIS *et al.* (2009) purificaram proteases que foram inibidas na presença do inibidor Benzamidina e na presença dos inibidores proteicos da soja, SKTI e SBBI reduziram a atividade em até 80 %. PILON (2012) identificou e avaliou a expressão de genes distintos de serino-proteases do genoma da lagarta-da-soja diante a inibidores de proteases, que mostraram alta identidade com tripsinas de outros insetos da ordem Lepidoptera. Os genes expressos demonstraram ser de tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino-protease Benzamidina, sensíveis aos inibidores proteicos da soja SKTI e SBBI, diminuindo sua expressão durante o tratamento, enquanto o inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes.

MENDONÇA (2012), em estudos da biologia e bioquímica de larvas de *A. gemmatalis* expostas aos inibidores proteicos de tripsina SKTI e SBBI na dieta alimentar, verificou que os insetos foram afetados pelos inibidores durante seu desenvolvimento larval, aumentando seu ciclo de vida e diminuindo o peso das larvas até se transformarem em pupa. Entretanto não foi verificada influência desses inibidores na taxa de mortalidade desses insetos. De acordo com o autor, não foi possível avaliar a atividade das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* diante dos inibidores proteicos devido à atividade ter sido estatisticamente igual para os inibidores testados. Dessa forma, foi proposto pelo autor

que possa ter ocorrido uma produção de outras proteases da mesma classe ou de classes diferentes, mascarando o efeito prejudicial dos inibidores.

A benzamidina é uma amida aromática, inibidor sintético competitivo da tripsina. Esta, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S<sub>1</sub> 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 S<sub>1</sub> (MARES-GUIA *et al.*, 1981, OLIVEIRA *et al.*, 1993).

O berenil é uma molécula derivada da benzamidina, formada por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição quatro de cada anel. A molécula comporta-se como um inibidor sintético parcialmente competitivo parabólico da tripsina. Esse inibidor, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo no sítio de especificidade S<sub>1</sub>, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima S<sub>2</sub>' , comportando-se como inibidor competitivo parabólico com o substrato (JUNQUEIRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1993).

Relatos sobre a bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis* quando alimentada com dieta suplementada com benzamidina, verificaram que o inseto responde ao inibidor, aumentando a digestibilidade proteica, o período larval e a atividade proteolítica e trípica. De acordo com os autores uma explicação para esses fatos seria um possível aumento na síntese de enzimas proteolíticas no trato intestinal do inseto, das quais poderia ocorrer uma hiperprodução de tripsinas-*like* sensíveis ao inibidor e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor, buscando contornar o efeito antinutricional da presença da Benzamidina (PILON *et al.* 2006; PILON *et al.*, 2009).

MOREIRA *et al.* (2011) estudando o desenvolvimento e fatores bioquímicos de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo o inibidor Berenil, verificaram que o inibidor afetou negativamente diversos parâmetros bioquímicos e biológicos do inseto. Entretanto, não houve aumento na atividade triptica e proteásica, o que os levaram a sugerir que não deve ocorrer a expressão de proteases sensíveis e insensíveis ao inibidor Berenil no trato intestinal do inseto durante a presença deste inibidor.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. As análises de espectrometria de massas e bioinformática foram realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL), da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

### 4.1. Criação da lagarta da soja

Ovos de *Anticarsia gemmatalis* foram mantidos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre quatro e cinco semanas, devido ao tempo de desenvolvimento estar ligado a fatores como variação de temperatura, umidade e densidade populacional. Para obtenção dos insetos no 5º ínstar de desenvolvimento, as pupas foram colocadas em placas de Petri no interior da gaiola telada (50 x 50 cm), revestida internamente com folhas de papel sulfite A4. Após a emergência dos adultos, estes foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (20,0 g), cerveja (350 mL), sacarose (50 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (650 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri. As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície das folhas de papel que revestia internamente a gaiola, as quais foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento, colocadas em potes plásticos (500 mL) com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde foi acoplada uma tela de organza. Os potes foram transferidos para uma câmara climatizada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e o fotoperíodo de 14 horas. Após a eclosão dos ovos foi iniciada a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial colocando-se um cubo de  $1,5\text{ cm}^2$  dessa dieta em cada pote plástico.

### 4.2. Preparo da dieta

A dieta artificial era composta por feijão branco cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. O feijão foi cozido em panela de pressão por 40 min e então, misturados aos outros ingredientes citados acima, com o auxílio de um liquidificador industrial. O ágar foi dissolvido e fervido em água por 20 minutos e adicionado à mistura. Em seguida foi adicionado ácido ascórbico (6,0 g), ácido sórbico

(3,0 g), nipagin (metilparabeno) (5,0 g), formol 40 % (6,0 ml) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1,0 mg), pantotenato de cálcio (1,0 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,5 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), água (1,0 L) até formar uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente, para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida sob luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

Outras duas dietas, para os tratamentos com inibidores de proteases, foram preparadas conforme descrito acima, porém com acréscimo de 0,0019 % (p/v) do inibidor sintético de serino-protease Berenil e de 0,1 % (p/v) do inibidor proteico de serino-protease do tipo Kunitz (SKTI) em cada dieta.

### **4.3. Insetos submetidos a tratamento com e sem inibidores**

As lagartas foram criadas com dieta livre de inibidores (grupo controle) de acordo com o item 4.2. Outros grupos de insetos do 5º ínstar de desenvolvimento foram separados, e em seguida, foram alimentados com as dietas que continham os inibidores de serino-proteases. Foram coletados 200 mg de amostras dos intestinos após 6, 12, 24 e 48 horas de cada tratamento. Os tratamentos foram determinados como: Controle: lagartas criadas com dieta livre de inibidores de serino-proteases; Tratamento 1: lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor sintético Berenil; Tratamento 2: lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor de soja tipo Kunitz (SKTI).

A partir dos tratamentos definidos acima foram analisadas as proteínas do intestino de *A. gemmatalis* que apresentaram abundância diferencial em resposta aos inibidores de proteases. As lagartas utilizadas foram alimentadas com dietas contendo o inibidor berenil e o inibidor de soja Kunitz, nos horários 6 h, 12 h, 24 h e 48 h; e o controle com 6 h, 12 h, 24 h e 48 h. As diferentes horas de um mesmo inibidor foram comparadas tomando como referência a hora 6 h de cada tratamento, e em conjunto foram realizadas as análises com o controle de lagartas alimentadas com dieta sem inibidores de proteases, nos diferentes tempos, para verificar se a diferença de abundância se distribuía normalmente no controle. Assim, os contrastes analisados dos tratamentos com inibidor berenil (BR), inibidor Kunitz (IN) e o controle (C) foram: BR6h x BR12h, BR6h x BR24h, BR6h x BR48h; IN6h x IN12h, IN6h x IN24h, IN6h x IN48h; C6h x C12h, C6h x C24h, C6h x C48h. Para cada tratamento, foram utilizadas 20 lagartas, separadas duas a duas, em cinco repetições. As análises foram feitas em triplicata experimentais.

#### **4.4. Análise Proteômica**

##### **4.4.1. Extração do intestino e obtenção do extrato proteico da lagarta de soja**

O intestino foi extraído após dissecação dos grupos de lagarta do 5º ínstar submetidos aos tratamentos 1, 2 e controle (item 4.3.). Os intestinos foram acondicionados em microtubos (tipo Eppendorf) contendo 0,5 mL de solução de água com HCl pH 3,0 a 4 °C, mantendo sempre a proporção de 2 intestinos por 0,5 mL de solução. O extrato proteico foi obtido através do rompimento celular resultante de três ciclos de congelamento rápido (aproximadamente 10 seg) em nitrogênio líquido, seguido de maceração através da amostra congelada em microtubos com bastão de vidro. A suspensão obtida foi centrifugada a 9500 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante foi denominado extrato proteico bruto e armazenado a - 20 °C. Para as análises, o extrato proteico foi concentrado por precipitação com TCA/Acetona 10 % (p/v) na proporção 3:1 (solução:amostra), durante 12 h, a - 20 °C. Além de concentrar as proteínas a precipitação também permite retirar os carboidratos, gorduras e outros possíveis interferentes da amostra. Após a precipitação, a solução foi centrifugada a 21380 g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2 vezes com acetona pura. A solução de precipitado proteico e acetona foi vortexado e centrifugado novamente, a 21380 g por 20 min a 4 °C, nas duas vezes. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente por 5 min. Após o tempo de secagem, o precipitado foi ressuspendido em solução de solubilização contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 % (p/v) e armazenado a - 20 °C para análises futuras.

##### **4.4.2. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas dos extratos proteicos proveniente de cada tratamento foi realizada em triplicata, utilizando-se a metodologia de BRADFORD (1976). Para esta quantificação foi preparada uma curva padrão, construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (BSA).

##### **4.4.3. Eletroforese bidimensional**

Para a eletroforese bidimensional utilizou-se o sistema da GE Healthcare, composto dos módulos *Ettan IPGphor 3* (1ª dimensão, focalização isoeletrica) e *EttanDALTSix* (2ª dimensão, eletroforese em gel de SDS-PAGE).

#### 4.4.3.1. Focalização isoeétrica (1ª dimensão)

Para a isoeletrofocalização das proteínas foram utilizadas fitas de gel de poliacrilamida com gradientes de pH imobilizado (*IPG strips*, GE Healthcare) de 7 cm e 24 cm. A utilização de fitas 7 cm teve como finalidade conhecer o perfil proteico das amostras, após a precipitação das mesmas. Enquanto a fita de 24 cm possibilitou a obtenção de gel com boa qualidade dos *spots* para a análise de abundância proteica. As fitas com pH de 3 a 10 foram reidratadas com 1,300 µg do extrato proteico (amostras dos tratamentos 1, 2 e controle – item 4.3.), utilizando a relação 1:1 da solução de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 % (p/v) e da solução *Destreak* (GE Healthcare), acrescido de 1 % de solução de anfólitos (*IPG buffer*, GE Healthcare), para um volume final de 450 µL (para fitas de 24 cm) ou, alternativamente 125 µL (para fitas de 7 cm). As fitas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 h a 20 h, conforme o comprimento, para a completa reidratação. No dia seguinte, as fitas reidratadas foram submetidas à focalização isoeétrica no equipamento *IPGPhor 3* (GE Healthcare), de acordo com as seguintes etapas para fitas de 7 cm: início com 200 V constante por 12 h, seguido de 1000 V em gradiente a 300 Vhr, 2000 V gradiente por 1 h, 2000 V constante por 2000 Vhr, 3000 V gradiente por 1,5 h, 3000 V constante por 3000 Vhr, 5000 V gradiente por 1,5 Vhr e 5000 V gradiente por 3000 Vhr (Protocolo obtido no manual *2-D Electrophoresis* da GE Healthcare); e para fitas de 24 cm: início com 100 V constante por 1 h, seguido de 500 V constante por 1 h, 1000 V constante por 1 h, 2000 V constante por 1 h, 4000 V constante por 2 h, 8000 V constante por 3 h, 8000 V gradiente por 6 h e 50 V constante por 2 h, de acordo com a isoeletrofocalização realizada por MIN et al. (2015) com algumas modificações. As fitas focalizadas foram armazenadas a - 80 °C, ou diretamente utilizadas para a segunda dimensão.

#### 4.4.3.2. Equilíbrio das fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG)

O equilíbrio das fitas foi realizado de acordo com o manual *2-D Electrophoresis* (GE Healthcare). Após a isoeletrofocalização, o equilíbrio das proteínas focalizadas foi realizado em duas etapas. As fitas focalizadas foram reduzidas e alquiladas por meio de incubações em tampão de equilíbrio (Tris-HCl pH 8,8, 75 mM, SDS 2 %, glicerol 30 %, uréia 6 M, azul de bromofenol 0,002 %) sob constante agitação por 30 min. Na primeira etapa foi adicionado DTT 1,0 % (m/v) ao tampão de equilíbrio, para a redução. Na segunda etapa, para a alquilação das mesmas, utilizou-se iodoacetamida 2,5 % (m/v). Após os dois passos de equilíbrio, as tiras foram lavadas em tampão de corrida, e em

seguida, para iniciar a segunda dimensão, as fitas foram colocadas horizontalmente sobre a parte superior dos géis de SDS-PAGE 12,0 %.

#### **4.4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (2° dimensão)**

A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), utilizando mini-géis de 10 cm x 8 cm x 0,75 mm em cuba miniVE ou, alternativamente, géis de 20 cm x 25 cm x 1,5 mm. Os géis de SDS-PAGE de 24 cm foram preparados utilizando o sistema de *Ettan DALTSix gel caster* (GE Healthcare). Cada gel foi carregado com uma fita única em conjunto com o marcador molecular. A corrida foi realizada à temperatura de 8 °C, na primeira etapa foi utilizada uma corrente de 20 mA/gel, por 45 min e, em seguida, uma corrente de 40 mA/gel, até o final da corrida. Para os géis pequenos (fita de 7 cm) realizou-se a corrida em temperatura ambiente, utilizando-se a voltagem de 90 V e corrente de 20 mA por gel. Para ambos os sistemas de eletroforese utilizados para a 2° dimensão, a corrida foi interrompida quando o corante migrou aproximadamente 90 % do comprimento do gel. Para os dois casos acima, antes de iniciar a corrida, as fitas foram seladas ao gel de poliacrilamida com solução de agarose.

O marcador de massa molecular de ampla faixa foi o Broad Range (Bio Rad), composto por miosina (200.000 Da),  $\beta$ -galactosidase (116.250 Da), fosfolipase b (97.400 Da), soroalbumina bovina (66.200 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (31.000 Da), inibidor de tripsina (21.500 Da), lisozima (14.400 Da) e aprotinina (6.500 Da).

#### **4.5. Coloração do gel**

Após o término da 2° dimensão, os géis foram fixados com solução contendo ácido acético 15,0 % (v/v) e metanol 10,0 % (v/v) por aproximadamente 12 h. Posteriormente, essa solução foi retirada e adicionada a solução de coloração contendo sulfato de amônio 10,0 % (m/v), ácido fosfórico 1,0 % (v/v), Coomassie Blue G-250 0,1 % (v/v) e metanol 20,0 % (v/v). A solução de coloração foi mantida em contato com o gel por aproximadamente 72 h e depois descartada. Em seguida, a solução de descoloração contendo ácido acético 5,0 % (v/v) foi adicionada aos géis e estes foram armazenados até a retirada dos *spots* para a proteólise das proteínas.

#### 4.6. Captura de imagens e análise da expressão

Os géis foram digitalizados usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente. As imagens dos géis foram utilizadas para análises comparativas utilizando o *software Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). Através deste *software* foi feita a detecção automática dos *spots* e as correções manuais quando necessárias. Ainda com a utilização do *software*, foram obtidos o ponto isoeletrico e a massa molecular de cada proteína e seus níveis de abundância. A comparação foi feita entre os géis das amostras de lagartas tratadas entre si, nas diferentes horas e também entre géis de amostras não tratadas com inibidores na dieta, para verificar a diferença de abundância proteica. Nas análises foram considerados como *spots* diferencialmente abundantes aqueles que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*ratio*) acima de 1,5 e ANOVA com *p* valor menor que 0,05. Para os *spots* diferencialmente abundantes foi calculada a porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a abundância relativa entre os tratamentos.

#### 4.7. Tripsinização das amostras

Os *spots* contendo proteínas com abundância diferencial foram retirados dos géis e submetidos ao processo de proteólise com a enzima tripsina (*Trypsin Gold, mass spectrometry*, Promega) segundo SHEVCHENKO et al. (1996; 2007). As proteínas no gel foram descoradas através de sucessivas lavagens com solução contendo acetonitrila 50 % (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM, descartando o sobrenadante. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação em vortex.

A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila 100 % por 5 min e secos em *speed vac* por 15 min, por duas vezes. A seguir, as proteínas foram reduzidas com solução de DTT a 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min a 56 °C, em banho seco. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min, a 25 °C.

Na próxima etapa, os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min, por duas vezes. Logo após, os pedaços de gel foram desidratados em acetonitrila 100 % por 5 min e secos em *speed vac* por 15 min.

A proteólise foi realizada com a enzima tripsina à concentração final de 500 ng/mL. Para cada amostra, os *spots* de géis foram reidratados com 20 µL de solução de

clivagem, contendo a enzima tripsina em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10 %, de forma a cobrir os pedaços do gel. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 45 min para a enzima penetrar no gel antes do início da digestão. Após este período, 50  $\mu$ L da solução de bicarbonato de amônio 40 mM foram adicionados em cada tubo e incubados a 37 °C por 18 h.

Após a digestão, os microtubos com pedaços de gel foram submetidos a banho de ultrassom por 10 min, centrifugados a 1500 g por 2 min e a solução removida para novos tubos. A cada pedaço de gel restante, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 40  $\mu$ L da solução de ácido fórmico 5 % (v/v) contendo acetonitrila 50 % (v/v), sendo submetidos à agitação por 2 min em vortex e incubados por 15 min a temperatura ambiente, para recuperar a maior quantidade de fragmentos tripticos. Em seguida, foram novamente incubados por mais 10 min no banho ultrassom, centrifugados e toda a solução foi removida e adicionada à solução do microtubo novo. As amostras, contendo os peptídeos clivados foram concentradas até a secagem completa em *speed vac*.

#### **4.8. Análise das proteínas por espectrometria de massas**

Para a análise por espectrometria de massas os peptídeos tripticos dos *spots* que apresentaram diferença na abundância de proteínas foram ressuspensos em 10  $\mu$ L de solução de acetonitrila 50 % acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. A matriz utilizada foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizada na mesma solução da qual os peptídeos tripticos foram ressuspensos, para uma concentração final de 10 mg/mL. Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (*Peptide Calibration Standard II*) (Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, 1  $\mu$ L de amostra e 1  $\mu$ L de matriz foram aplicados e homogeneizados em cada *spot* de placa de aço apropriada para a espectrometria. Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo *Ultraflex III* (Bruker Daltonics).

Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo *software Flexcontrol*, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2

processados com o auxílio do software *flexAnalysis*, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato *mascot generic format* (mgf) pelo aplicativo *BioTools*, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

#### **4.9. Identificação das proteínas**

As listas de massas foram confrontadas contra o Banco de Dados de proteínas da classe *Insecta*, depositadas no UNIPROT (*download* em 19/01/2017, com 2.560.922 entradas), usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (*Matrix Science, London, UK*). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo MASCOT como “*Uncharacterized*” foram analisadas usando o *software* BLAST, versão 2.4.0 (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Nessa análise foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados *protein non-redundant* (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “*Uncharacterized*”.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo aplicativo *SCAFFOLD*, versão 3.6.4 (*Proteome Software INC., Portland, OR*). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (KELLER *et al.*, 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (NESVIZHSHKII *et al.*, 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90 % de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

#### **4.10. Caracterização funcional das proteínas**

A classificação funcional das proteínas identificadas e validadas foi realizada por meio da comparação das suas sequências com as proteínas ortólogas de eucariotos disponíveis no banco de dados *EuKarioto Orthologous Groups* KOG (TATUSOV *et al.*, 2003). Nessa classificação, um ID do KOG foi atribuído a cada proteína que alinhou significativamente (*E-value* < 1E-4) com aquelas depositadas nesse banco de dados, usando o *Reverse Position Specific* BLAST (RPS-BLAST) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2002; SCHÄFFER *et al.*, 1999).

As redes de interação entre as proteínas identificadas e validadas foram reconstruídas utilizando o aplicativo STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, versão 10.0, [http:// http://string-db.org/](http://string-db.org/)) (SZKLARCZYK *et al.*, 2014). Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Bombyx mori* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados por meio das estratégias de *textmining*, *experiments*, *database* e *co-expression*, dentro de um nível de confiança acima de 0,90 e no máximo 20 interações na primeira chamada. O gráfico da rede de interações foi gerado no modo *confidence view*, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação.

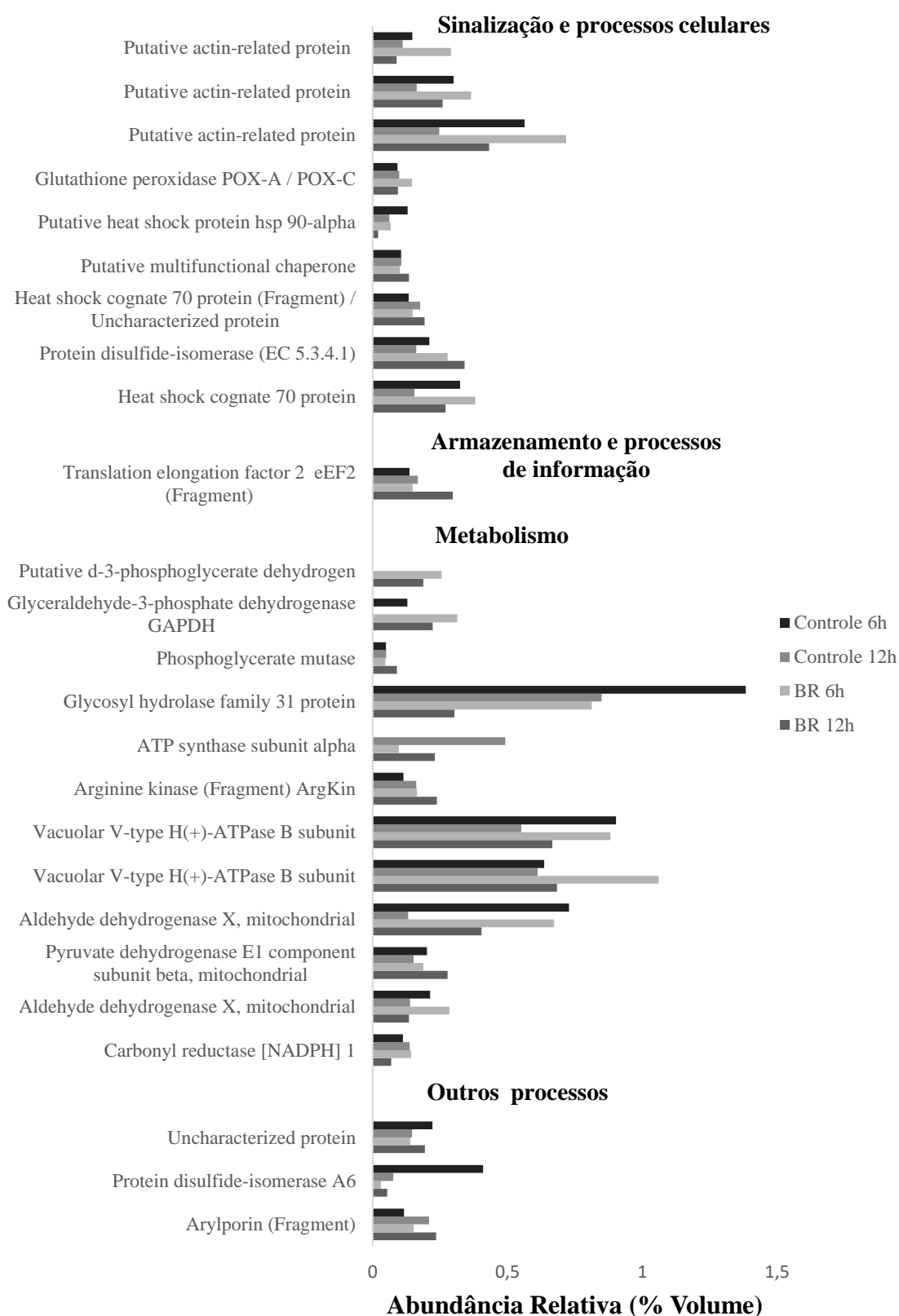
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Proteoma diferencial em resposta ao inibidor de protease sintético berenil no intestino de *Anticarsia gemmatalis*

Usando a análise de eletroforese 2D foram investigadas as mudanças nos perfis proteicos em resposta ao inibidor de protease sintético berenil, comparado nas diferentes horas: 6 h (BR6h), 12 h (BR12h), 24 h (BR24h) e 48 h (BR48h); além da comparação com os controles (C). Para cada tratamento, realizados em triplicatas experimentais, foi apresentado uma alta resolução na separação dos *spots* nos géis de poliacrilamida.

Na análise do proteoma do intestino das lagartas tratadas com o inibidor berenil por 6, 12, 24 e 48 horas encontraram-se variações entre o número de *spots* detectados em cada tempo. Assim para os tratamentos BR6h, BR12h, BR24h e BR48h foram detectados 432, 421, 445 e 414 *spots*, respectivamente. Enquanto na comparação dos perfis proteicos entre as horas dos tratamentos, os contrastes BR6h X BR12h, BR6h X BR24h, BR6h X BR48h apresentaram abundância diferencial em 61, 54 e 63 dos *spots*, respectivamente. Enquanto no perfil proteico dos controles foram detectados 376, 382, 379, 372 *spots* nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas. Na comparação entre os contrastes C6h X C12h, C6h X C24h, C6h X C 48h também foi encontrado *spots* com abundância diferencial entre as proteínas identificadas com um padrão de abundância destas proteínas diferente dos tratamentos com berenil. Observando que esta diferença de abundância entre os contrastes e em relação ao número de *spots* indica uma variação na resposta dos tratamentos, que pode ser devido à defesa da lagarta ao estresse ocasionado pelo inibidor em relação ao tempo.

Dos 61 *spots* diferenciais obtidos na comparação entre os tratamentos BR6h e BR12h, identificaram 25 que corresponderam a 20 proteínas (Figura 4). Estas proteínas estão relacionadas com variação de abundância relativa entre os tratamentos, sendo que houve um aumento na abundância em 11 proteínas (Fosfoglicerato mutase, proteína não caracterizada, fragmento do fator de alongação da tradução 2 (eEF2), fragmento da arginina quinase (ArgKin), duas proteína dissulfeto-isomerase A6, fragmento da proteína do choque térmico (Hsp 70), putativa chaperona multifuncional, piruvato desidrogenase -componente da subunidade beta (E1), mitocôndrial, fragmento da arilporina, ATP sintase subunidade alfa) e redução em 14 (duas proteínas H(+)-ATPase do tipo vacuolar ATPase (subunidade B), três putativa proteínas relacionada a actina (proteína não caracterizada), putativa proteína choque térmico Hsp 90  $\alpha$ , duas enzimas aldeído



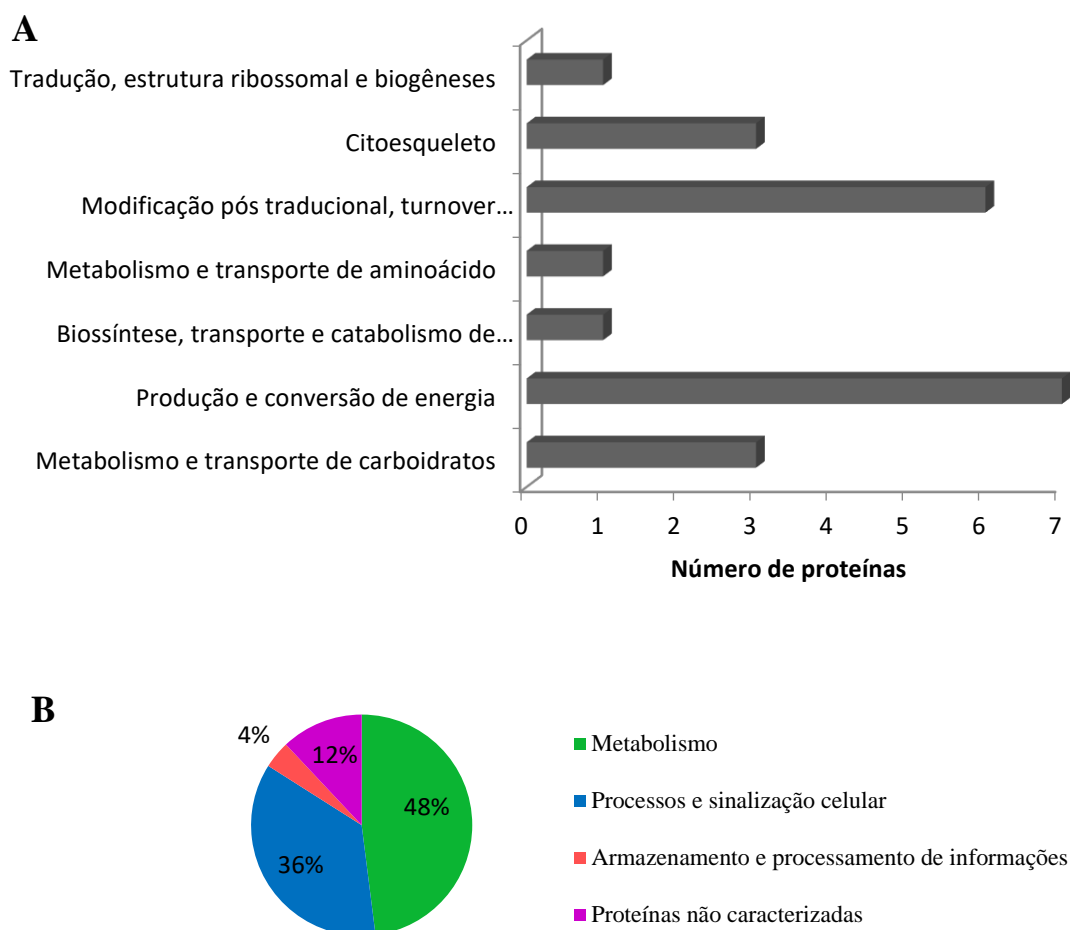
**Figura 4.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 12 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 12 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

desidrogenase X, mitocôndrial, glicosil hidrolase, carbonil redutase [NADPH], gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína do choque térmico (Hsp 70), putativa D-3-fosfoglicerato desidrogenase, glutaciona peroxidase POX-A/POX-C).

Na tabela do Anexo 1 foram apresentadas todas as 25 proteínas com a identificação dos *spots* que tiveram abundância diferencial nos tratamentos, e que foram identificados por espectrometria de massa através do MASCOT MS/MS *ion search*. Apresentou-se na tabela também outros dados como o número de acesso das proteínas no UNIPROT, ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) preditos da proteína, dados obtidos no MASCOT; além do ponto isoelétrico experimental, massa molecular experimental, porcentagem de volume e *fold change* do *spot* determinados pelo *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* e porcentagem de cobertura e o número de peptídeos obtidos no *software Scaffold*. No Anexo 2 estão representados na imagem do gel bidimensional os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número de identificação.

As proteínas identificadas do intestino de *A. gemmatalis* foram agrupadas em categorias funcionais, conforme sua possível função molecular, com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG. Estas proteínas com abundância diferencial identificadas do tratamento com o inibidor berenil apresentaram envolvimento em determinados processos nas diferentes horas do tratamento. Proteínas relacionadas a partir do número de acesso no UNIPROT (Anexo 3).

No tratamento BR12h comparado com BR6h, os 25 *spots* identificados que correspondem a 20 proteínas, foram agrupadas nas seguintes categorias funcionais: Processos e sinalização celular (citoesqueleto; modificação pós traducional, *turnover* proteico e chaperonas), armazenamento e processamento de informações (tradução, estrutura ribossomal e biogêneses) e metabolismo (metabolismo e transporte de aminoácido; metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia; biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários) (Figura 5A). Podemos observar que na classificação funcional pelo KOG, predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, que representam aproximadamente 48,0 % e 36,0 %, respectivamente. Enquanto armazenamento e processamento de informações corresponderam a 4,0 % e 12,0 % das proteínas do tratamento não obtiveram classificação no KOG (Figura 5B).



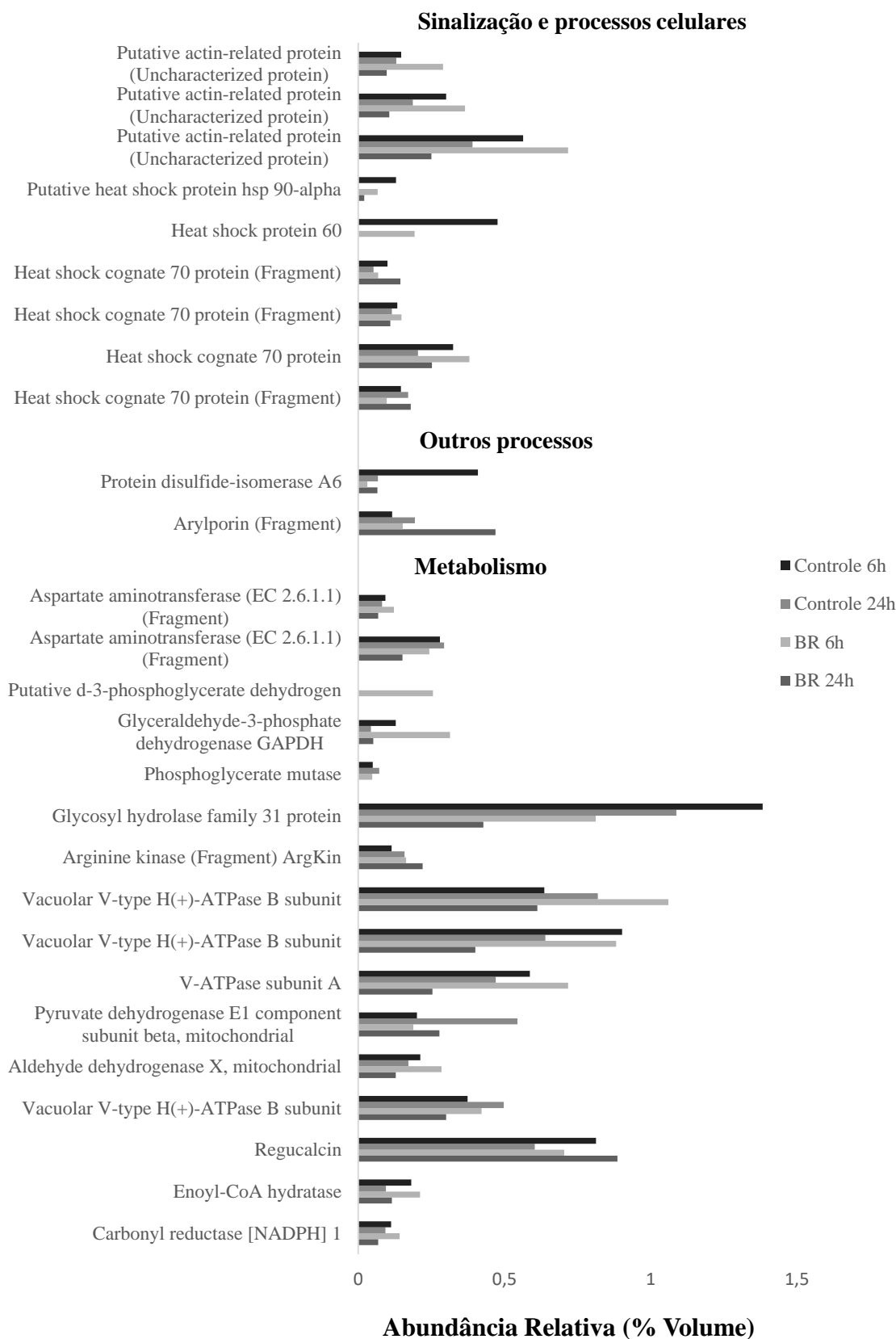
**Figura 5.** Classificação funcional das proteínas identificadas no intestino da lagarta *A gemmatalis* nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 12 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

Esses resultados indicaram que a diminuição na abundância relativa ocorreu em proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos ao metabolismo energético como glicólise, respiração e produção de ATP. Entre essas proteínas estão ATPase, aldeído desidrogenase e glicosil hidrolase. Proteínas indicativas do estresse celular obtiveram um número equivalente de *spot* que aumentaram e diminuíram a abundância relativa, como as proteínas de choque térmico. Indicando a diminuição da ativação da maioria destes processos metabólicos no tratamento BR12h em relação ao BR6h, devido a menor abundância das proteínas identificadas após 12h de tratamento dos insetos com berenil. Além da tentativa de controle do estresse celular pela variação na abundância das proteínas de choque térmico. Analisando as proteínas identificadas em relação suas variações no perfil proteico dos controles C6h X C12h observamos que houve também

diferença significativa na variação de abundância destas proteínas. As proteínas que atuam no metabolismo do inseto como aldeído desidrogenase e as ATPase obtiveram a abundância diminuída mais vezes no contraste do controle que do tratamento. Enquanto as proteínas de estresse celular também apresentaram diferenças significativas entre os contrastes do controle e dos tratamentos com berenil. Verificando que houve uma resposta da presença do inibidor berenil no intestino da lagarta.

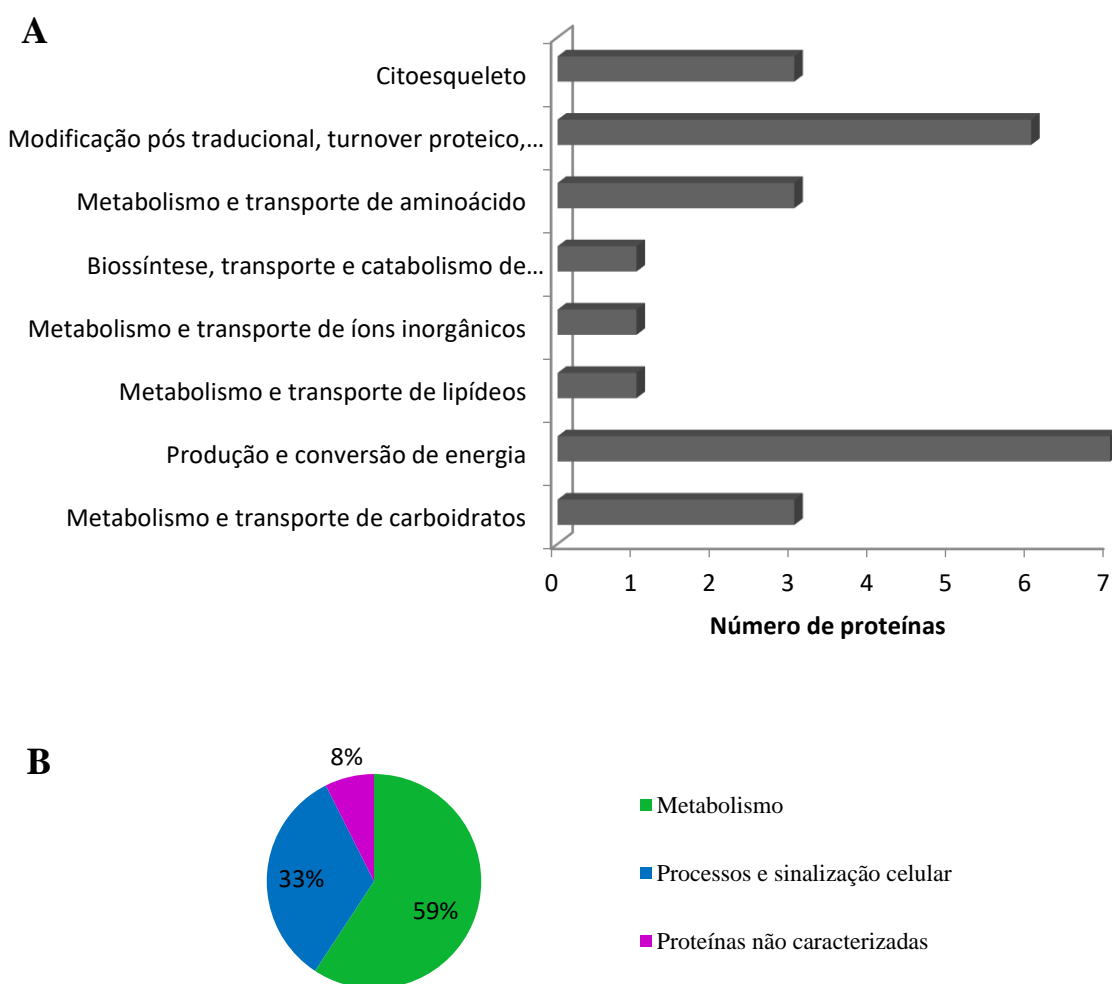
Enquanto no contraste dos tratamentos BR6h X BR24h, dos 54 *spots* com abundância diferencial, identificaram 27 que corresponderam a 19 proteínas (Figura 6). Sendo que houve um aumento na abundância em 7 proteínas (fragmento da arginina quinase (ArgKin), duas proteínas do choque térmico (HSP 70) (fragmento), proteína dissulfeto-isomerase A6, *regucalcin*, piruvato desidrogenase - componente da subunidade beta (E1), mitocôndrial, fragmento da arilporina) e redução em 17 (três proteínas H(+)-ATPase do tipo vacuolar ATPase (subunidade B), enoil-CoA hidratase, três putativa proteínas relacionada a actina (proteína não caracterizada), putativa proteína do choque térmico Hsp 90  $\alpha$ , duas proteínas da aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1) (fragmento), glicosil hidrolase, carbonil redutase [NADPH], gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), aldeído desidrogenase X, mitocôndrial, duas proteínas do choque térmico (HSP 70), ATP sintase subunidade alfa). Entretanto, três proteínas foram exclusivas no tratamento de 6 horas, Fosfoglicerato mutase, proteína do choque térmico Hsp 60, e putativa D-3-fosfoglicerato desidrogenase.

Na tabela do Anexo 4 foram apresentadas todas as 27 proteínas com a identificação dos *spots* que foram diferenciais no contraste dos tratamentos berenil nas 6 e 24 horas. No Anexo 5 estão representados na imagem do gel do contraste BR6h X BR24h os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número da identificação.



**Figura 6.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 24 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 24 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

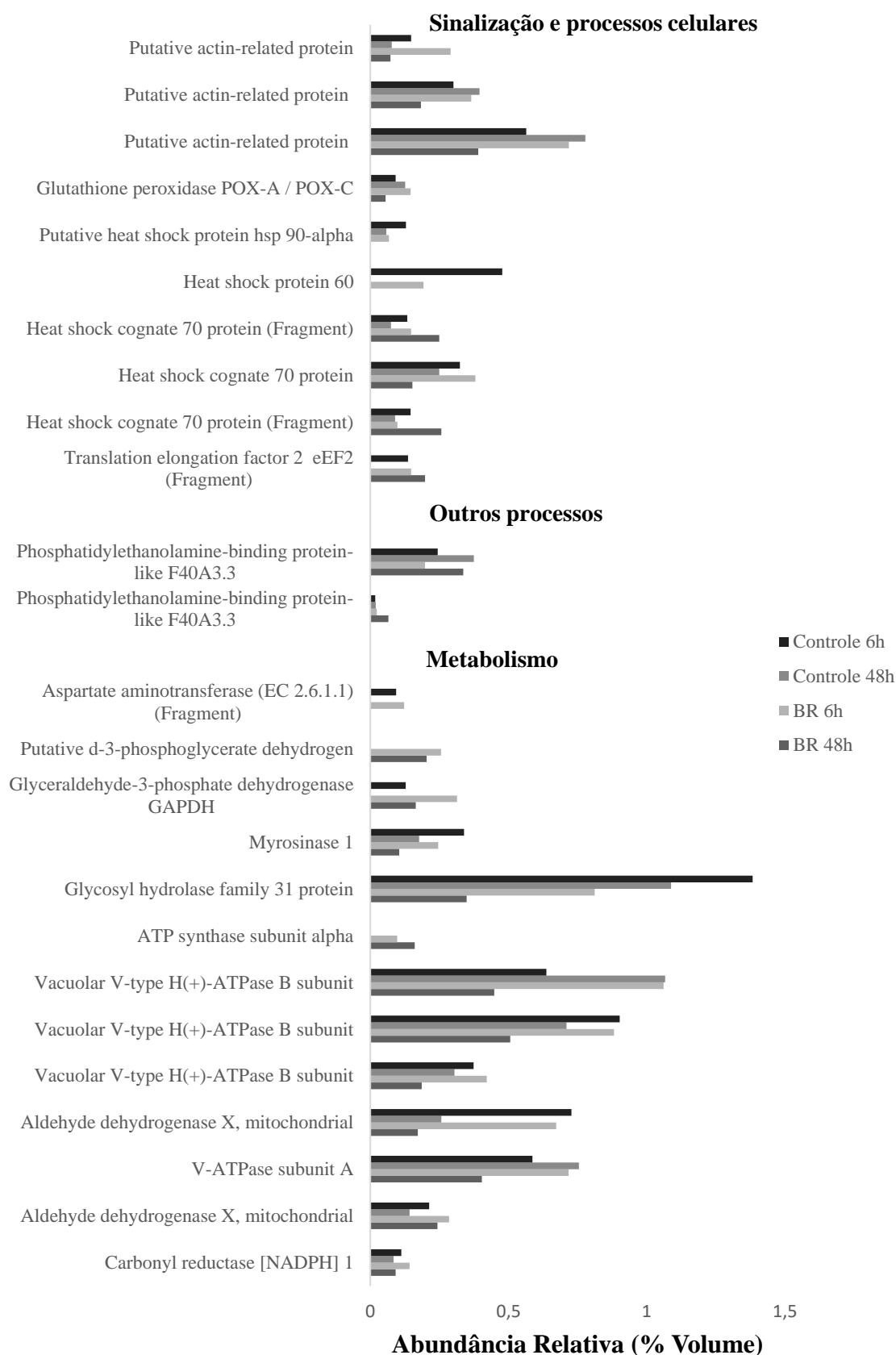
Enquanto no tratamento BR24h comparado com BR6h, identificaram 27 *spots* correspondendo a 19 proteínas, que foram enquadradas nas seguintes categorias funcionais pelo KOG: Processos e sinalização celular (citoesqueleto; modificação pós traducional, *turnover* proteico, chaperonas) e metabolismo (metabolismo e transporte de aminoácido; metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia; metabolismo e transporte de íons inorgânicos; metabolismo e transporte de lipídeos; biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários) (Figura 7A) (Anexo 3). Na classificação funcional, observamos que predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, que representam aproximadamente 59,2 % e 33,3 %, respectivamente. Enquanto apenas 7,5 % das proteínas do tratamento não obtiveram classificação no KOG (Figura 7B).



**Figura 7.** Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta *A. gemmatalis* nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 24 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

Os resultados deste contraste BR6h x BR24h foi semelhante a resposta do contraste analisado anteriormente, que indica maior número de proteínas diferencial em processos de metabolismo e sinalização celular, apesar de apresentar maior número de proteínas com abundância reduzida. A abundância das ATPases no tratamento BR24h diminuiu em relação ao BR6h e também se apresentou menor que o controle C24h e o tratamento BR12h. Outras proteínas que participam também do metabolismo do inseto, como aldeído desidrogenase, glicosil hidrolase e fosfoglicerato mutase, diminuíram sua abundância proteica, com esta diminuição maior no tratamento BR24h que no controle C24h. As proteínas relacionadas ao estresse celular obtiveram *spots* que aumentaram e diminuíram a abundância relativa, como as proteínas de choque térmico.

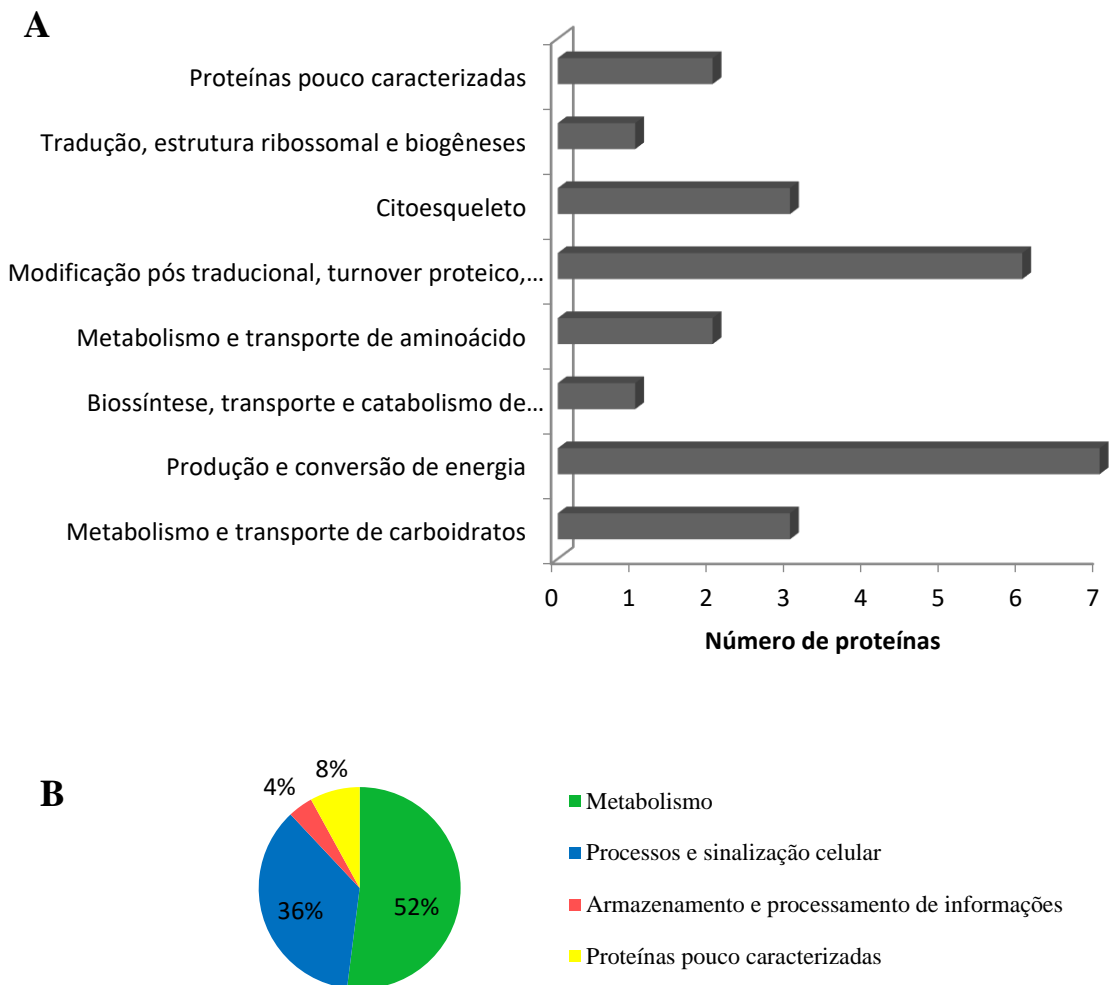
No último contraste dos tratamentos com o berenil, BR6h X BR48h, dos 63 *spots* diferenciais, identificaram 25 que corresponderam a 17 proteínas (Figura 8). Sendo que houve um aumento na abundância em 6 proteínas (fragmento do fator de alongação da tradução 2 (eEF2), duas proteínas *Phosphatidylethanolamine-binding protein-like* F40A3.3, duas proteínas do choque térmico (HSP 70) (fragmento), ATP sintase subunidade alfa) e redução em 16 (três H(+)-ATPase do tipo vacuolar ATPase (subunidade B), três putativas proteínas relacionada a actina (proteína não caracterizada), glicosil hidrolase, duas enzimas aldeído desidrogenase X, mitocôndrial, ATPase do tipo vacuolar (subunidade A), mirosinase, carbonil redutase [NADPH], gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína do choque térmico (HSP 70), putativa D-3-fosfoglicerato desidrogenase, glutathiona peroxidase POX-A/POX-C). Sendo que três proteínas foram exclusivas do tratamento nas 6 horas, proteína do choque térmico Hsp 90, fragmento da aspartato aminotransferase (E.C.2.6.1.1) e proteína do choque térmico Hsp 60.



**Figura 8.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease sintético berenil, comparação entre as 6 e 48 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 48 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

Na tabela do Anexo 6 foram apresentadas todas as 25 proteínas com a identificação dos *spots* que foram diferenciais no contraste dos tratamentos berenil nas 6 e 48 horas. No Anexo 7 estão representados na imagem dos géis do contraste BR6h x BR 48h os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número de identificação. Enquanto nos Anexos 8, 9 e 10 estão representados os *spots* identificados nas imagens dos géis dos controles C6h x C12h, C6h x C24h e C6h x C48h, respectivamente; e nos Anexos 11, 12 e 13 são apresentados os dados da abundância relativa dos controles C6h x C12h, C6h x C24h e C6h x C48h, respectivamente.

No tratamento BR48h comparado com BR6h, identificaram 25 *spots* correspondendo a 17 proteínas, que foram enquadradas nas seguintes categorias funcionais: Processos e sinalização celular (citoesqueleto; modificação pós traducional, *turnover* proteico, chaperonas), armazenamento e processamento de informações (tradução, estrutura ribossomal e biogêneses), metabolismo (metabolismo e transporte de aminoácido; metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia; biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários) e proteínas pouco caracterizadas (Figura 9A) (Anexo 3). Podemos observar que na classificação funcional pelo KOG, predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, que representam aproximadamente 52,0 % e 36,0 %, respectivamente. Enquanto armazenamento e processamento de informações corresponderam a 4,0 % e proteínas pouco caracterizadas 8,0 % (Figura 9B).



**Figura 9.** Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta *A. gemmatalis* nos tratamentos com inibidor sintético berenil nas 6 e 48 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

Os resultados foram semelhantes a resposta dos contrastes anteriores, que indica maior número de proteínas diferencial em processos de metabolismo e sinalização celular, além de apresentar também maior número de proteínas com abundância reduzida. Ocorreu uma diminuição na abundância relativa em proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos ao metabolismo energético como ATPases, glicosil hidrolase e aldeído desidrogenase. A abundância dessas proteínas foi menor no tratamento BR48h que no controle C48h e no tratamento BR6h. As proteínas relacionadas ao estresse celular, como as proteínas de choque térmico, obtiveram *spots* que aumentaram e diminuíram a abundância relativa, enquanto no controle todas os *spots* diminuíram sua abundância ou não estavam presentes no controle C48h.

De forma geral no tratamento com o inibidor berenil, foi observado que na classificação funcional pelo KOG, predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular entre todas as proteínas identificadas do trato intestinal do organismo estudado. Esses resultados indicam que a presença de inibidores de proteases na alimentação das lagartas altera, em sua maioria, a abundância relativa de proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos a estresse como glicólise, respiração, estresse oxidativo e os processos envolvendo o envelhecimento, síntese e degradação de proteínas.

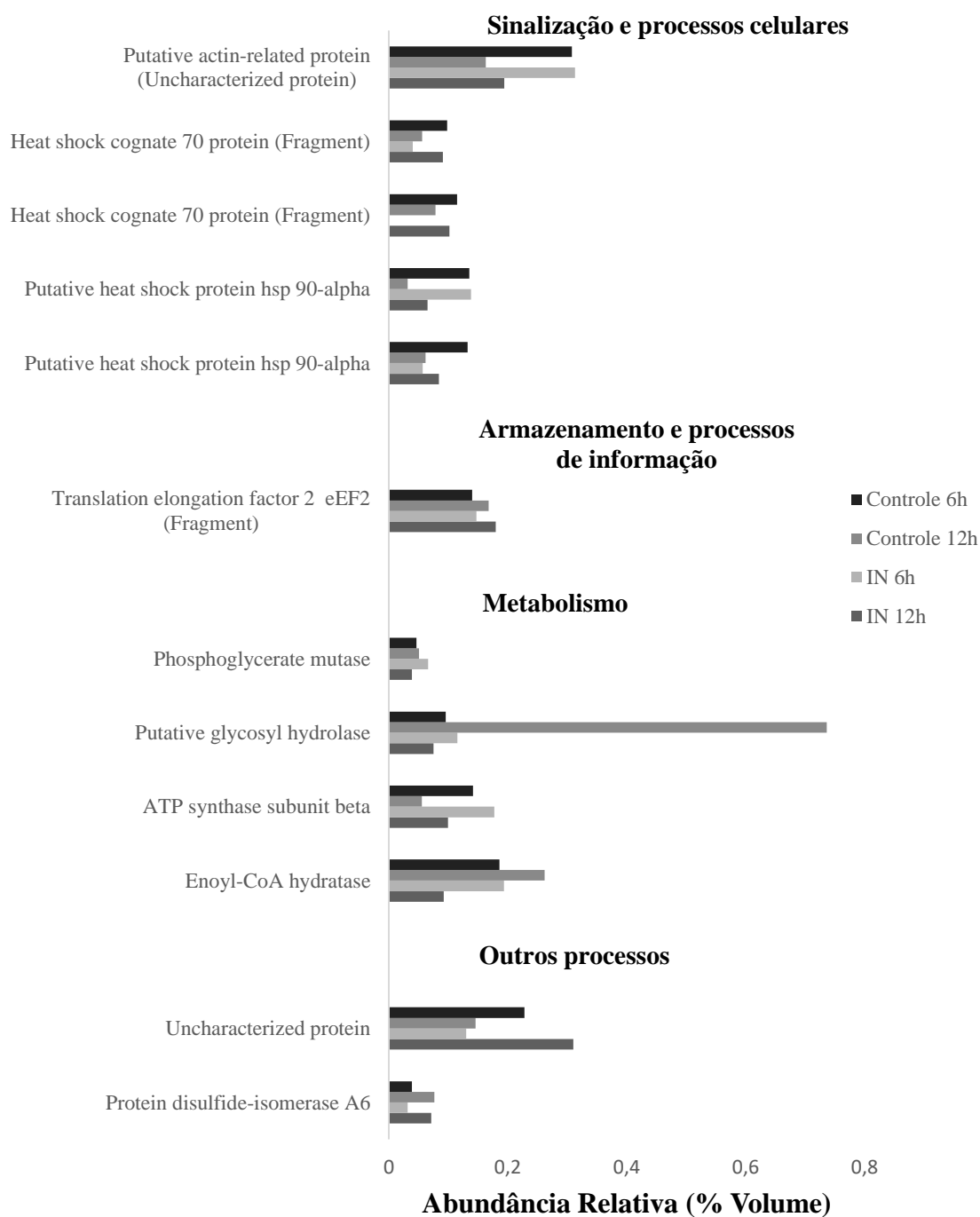
O processo de metabolismo foi a classificação que mais obteve proteínas com abundância diferencial, e na maioria das vezes, havia uma diminuição dessa abundância como a proteína ATPase do tipo vacuolar, aldeído desidrogenase, glicosil hidrolase. A proteína dessa classe funcional que obteve aumento na abundância relativa foi a ATP sintase, principalmente por estar presente nas 48h do tratamento berenil e não no controle. Resultado que demonstra a necessidade de produção de energia no intestino do inseto pela ATP sintase, através do gradiente de íons entre membranas. Nos processos e sinalização celular as chaperonas moleculares foram a maioria das proteínas identificadas. Algumas proteínas do choque térmico Hsc 70 e a multifuncional chaperona apresentaram aumento na abundância relativa, enquanto as proteínas de choque térmico 60 e 90 e algumas das Hsc 70 apresentaram diminuição na abundância relativa ou não estavam presentes no tratamento com berenil.

## 5.2. Proteoma diferencial em resposta ao inibidor de protease de soja tipo Kunitz (SKTI) no intestino de *Anticarsia gemmatalis*

Na análise de eletroforese 2D foram investigadas a variação nos perfis proteicos em resposta ao inibidor de proteases de soja do tipo Kunitz (SKTI), comparando nas diferentes horas: 6 h (IN6h), 12 h (IN12h), 24 h (IN24h) e 48 h (IN48h); além da comparação com os controles. Os tratamentos realizados em triplicatas experimentais apresentaram uma alta resolução na separação dos *spots* nos géis SDS-PAGE.

No proteoma do intestino das lagartas tratadas com o inibidor de soja por 6, 12, 24 e 48 horas encontraram-se variações entre o número de *spots* detectados em cada tempo. Assim para os tratamentos IN6h, IN12h, IN24h e IN48h foram detectados 344, 415, 348 e 410 *spots*, respectivamente. Na comparação dos perfis proteicos entre os contrastes IN6h X IN12h, IN6h X IN24h, IN6h X IN48h houve abundância diferencial em 67, 85 e 73 dos *spots*, respectivamente. Nos contrastes dos controles (C6h X C12h, C6h X C24h, C6h X C48h), como apresentado no item 5.1., encontramos *spots* com abundância diferencial entre as proteínas identificadas. E estes apresentaram um padrão de abundância das proteínas com diferenças em relação aos tratamentos com o inibidor Kunitz. O que permite acreditar que a variação da resposta em relação ao número de *spots* com abundância diferencial entre os contrastes pode ser devido à resposta de defesa da lagarta ao estresse ocasionado pelo Kunitz em relação ao tempo.

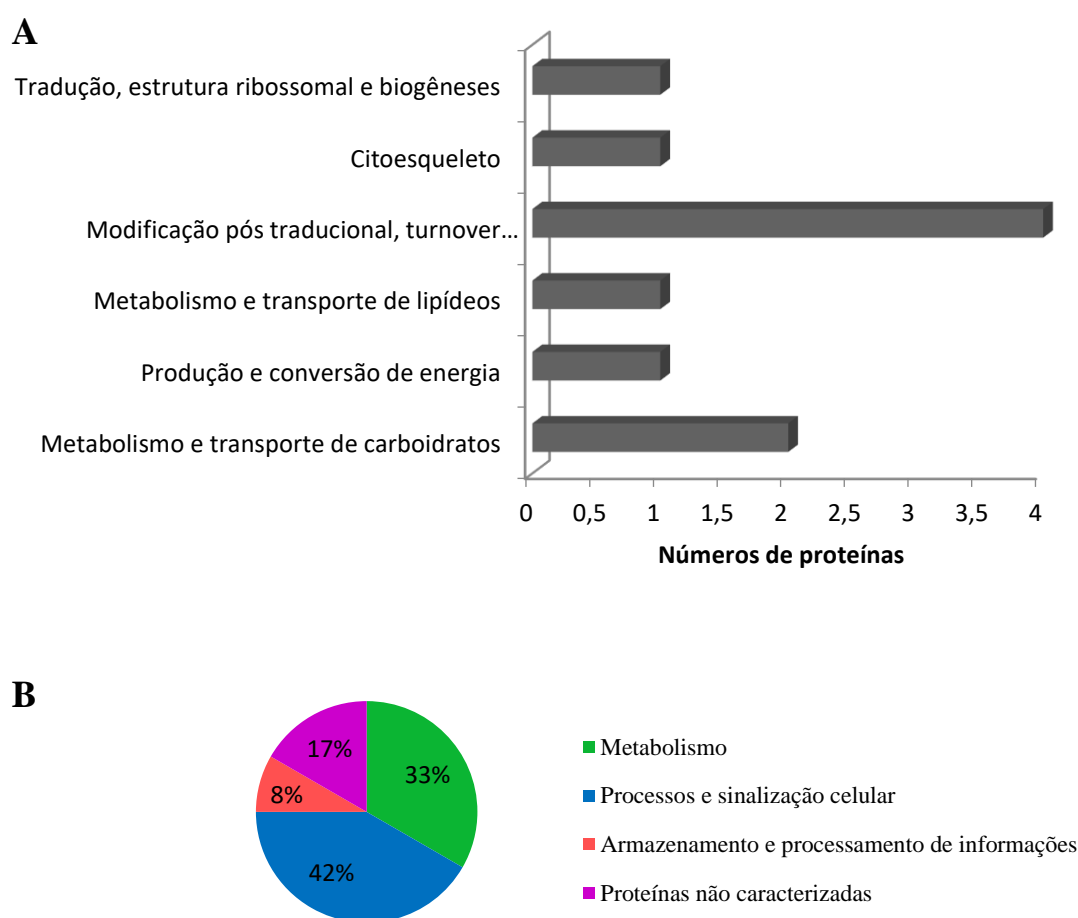
Na análise do tratamento IN6h com o IN12h, dos 67 *spots* com abundância diferencial identificaram 12 proteínas que corresponderam 10 proteínas diferentes (Figura 10). O aumento na abundância ocorreu em 5 proteínas (Proteína não caracterizada, fragmento do fator de alongação da tradução 2 (eEF2), o fragmento da proteína do choque térmico (HSP 70), proteína dissulfeto-isomerase A6, putativa proteína do choque térmico – subunidade alfa (HSP 90)) e redução de abundância em 6 (fosfoglicerato mutase, putativa proteína do choque térmico – subunidade alfa (HSP 90), putativa glicosil hidrolase, enoil-CoA hidratase, putativa proteína relacionada a actina (proteína não caracterizada), ATP sintase subunidade  $\beta$ ). Sendo que uma proteína foi exclusiva do tratamento nas 12 horas, o fragmento da proteína do choque térmico (HSP 70), com aumento de abundância.



**Figura 10.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 12 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 12 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

No tratamento IN12h comparado com IN6h, identificaram 12 *spots* correspondendo a 10 proteínas, que foram agrupadas nas seguintes categorias funcionais: Processos e sinalização celular (citoesqueleto; modificação pós traducional, *turnover* proteico e chaperonas), armazenamento e processamento de informações (tradução,

estrutura ribossomal e biogêneses), metabolismo (metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia; metabolismo e transporte de lipídeos) (Figura 11A) (Anexo 3). Podemos observar que na classificação funcional pelo KOG, predominaram as classes correspondentes a processos e sinalização celular e metabolismo, que representam aproximadamente 41,6 % e 33,3 %, respectivamente. Enquanto armazenamento e processamento de informações corresponderam a 8,5 %, além de 16,6 % das proteínas do tratamento que não obtiveram classificação no KOG (Figura 11B).



**Figura 11.** Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta *A. gemmatalis* nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 12 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

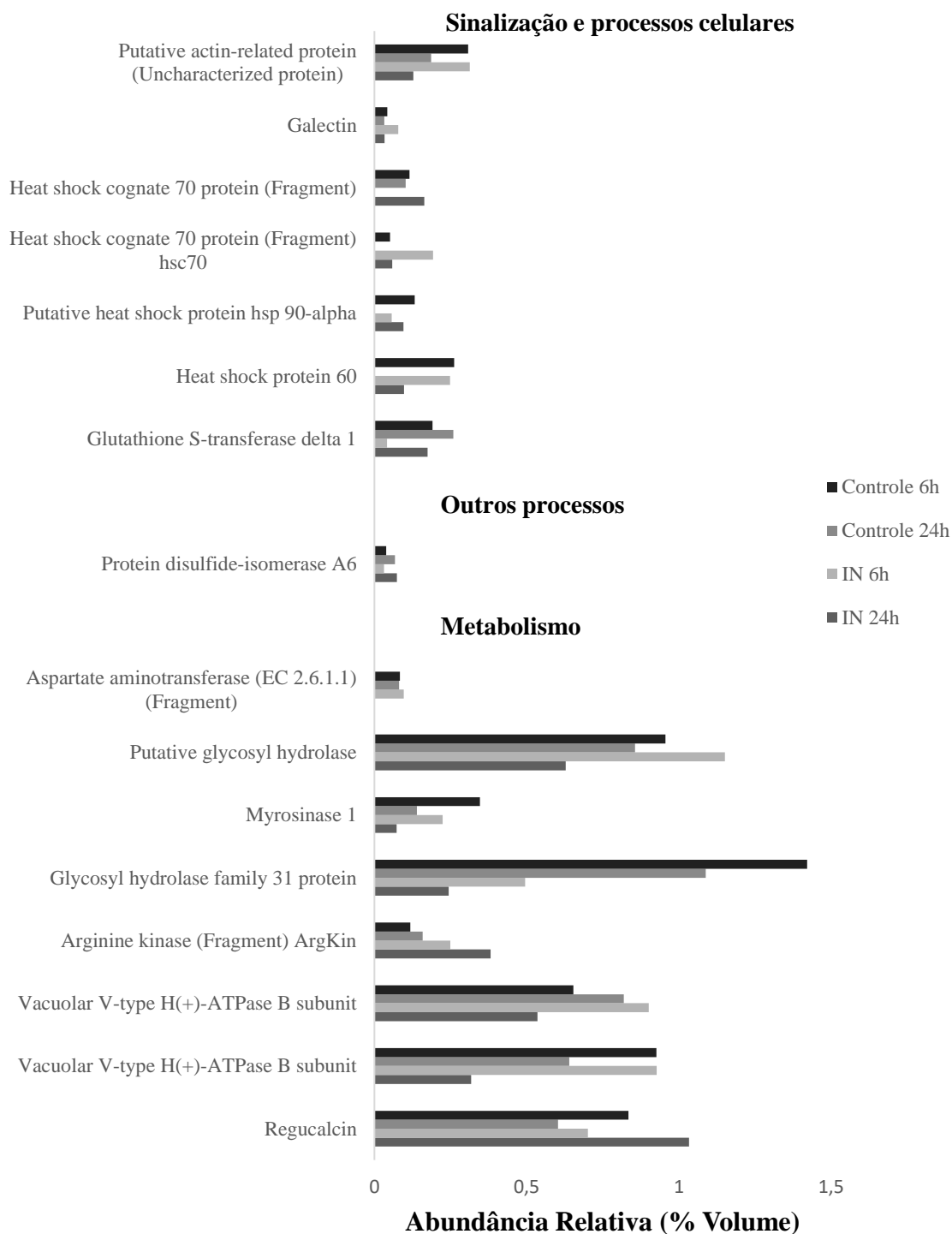
Na tabela do Anexo 14 foram apresentadas todas as 12 proteínas com a identificação dos *spots* que foram diferenciais no contraste dos tratamentos Kunitz nas 6 e 12 horas. No Anexo 15 estão representados na imagem do gel do contraste IN6h X

IN12h os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número de identificação.

O primeiro contraste IN6h X IN12h analisado do inibidor Kunitz apresentou um número menor de proteínas identificadas comparado aos contrastes do berenil. Apesar da semelhança no resultado que mostra maior quantidade de proteínas identificadas nos processos de metabolismo e sinalização celular. As proteínas responsivas pelo metabolismo de carboidratos e de produção de energia diminuíram a abundância na IN12h de tratamento, como a ATP sintase. A fosfoglicerato mutase e a glicosil hidrolase também apresentaram abundância menor que o controle em 12 h. As proteínas de choque térmico em sua maioria apresentaram abundância maior em IN12h que em IN6h. Enquanto no controle todas as proteínas relacionadas ao estresse diminuíram a abundância em 12 h de tratamento.

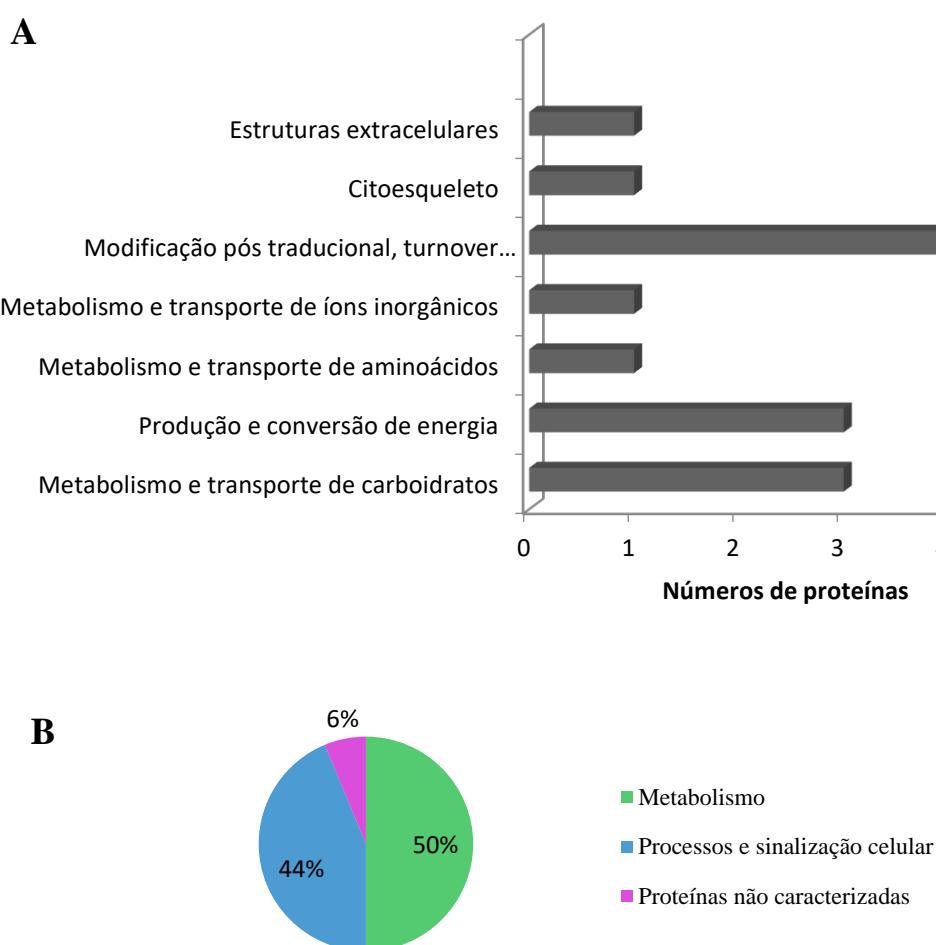
Enquanto no contraste dos tratamentos IN6h X IN24h, dos 85 *spots* diferenciais, identificaram 16 que corresponderam a 15 proteínas (Figura 12). Um aumento na abundância ocorreu em 5 proteínas (fragmento da arginina quinase (ArgKin), proteína dissulfeto-isomerase A6, *regucalcin*, putativa proteína do choque térmico – subunidade alfa (HSP 90), glutathione S-transferase) e redução em 9 (duas proteínas H(+)-ATPase do tipo vacuolar ATPase (subunidade B), putativa glicosil hidrolase, putativa proteína relacionada a actina (proteína não caracterizada), galectina, mirosinase, proteína do choque térmico (HSP 60), o fragmento da proteína do choque térmico (Hsc 70), glicosil hidrolase). Sendo que apenas uma proteína foi exclusiva do tratamento nas 24 horas, o fragmento da proteína do choque térmico (Hsc 70), com aumento de abundância. Enquanto a proteína aminotransferase aspartato (E.C. 2.6.1.1) foi exclusiva do tratamento nas 6 horas.

Na tabela do Anexo 16 foram apresentadas todas as 16 proteínas com a identificação dos *spots* que foram diferenciais no contraste dos tratamentos Kunitz nas 6 e 24 horas. No Anexo 17 estão representados na imagem do gel do contraste IN6h X IN24h os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número de identificação.



**Figura 12.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 24 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 24 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

No tratamento IN24h comparado com IN6h, identificaram 16 *spots* correspondendo a 15 proteínas, que foram agrupadas nas seguintes categorias funcionais: Processos e sinalização celular (citoesqueleto; estruturas extracelulares; modificação pós traducional, *turnover* proteico e chaperonas), metabolismo (metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia; metabolismo e transporte de íons inorgânicos; metabolismo e transporte de aminoácidos) e proteínas pouco caracterizadas. (Figura 13A) (Anexo 3). Podemos observar que na classificação funcional pelo KOG, predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, que representam aproximadamente 50,0 % e 43,7 %, respectivamente. Enquanto 6,3 % das proteínas do tratamento não obteve classificação no KOG (Figura 13B).

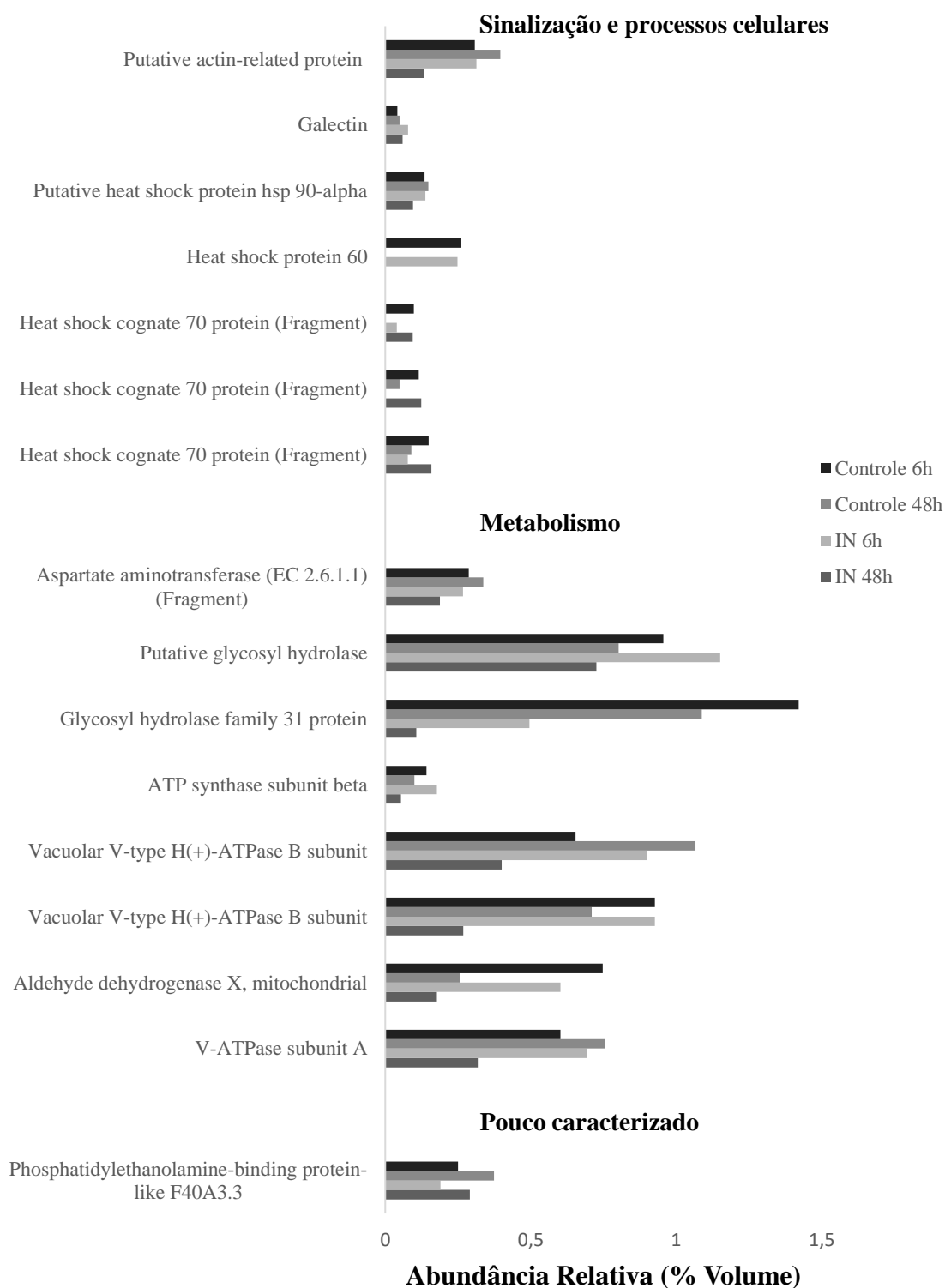


**Figura 13.** Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta *A. gemmatalis* nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 24 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

Os resultados deste contraste IN6h x IN24h foi semelhante a resposta do contraste analisado anteriormente, que indica maior número de proteínas diferencial em processos de metabolismo e sinalização celular, menor número de proteínas identificadas que os tratamentos de berenil, além de apresentar maior número de proteínas com abundância reduzida. As proteínas envolvidas no metabolismo do carbono e na produção de ATP, como a ATPase e glicosil hidrolase, apresentaram *spots* com diminuição na abundância em IN6h para IN24h, e também menor comparando com o controle em 24 h. As proteínas relacionadas ao estresse celular obtiveram *spots* que aumentaram e diminuíram a abundância relativa em IN24h, como as proteínas de choque térmico. Na comparação com o controle, alguns destes *spots* não estavam presentes em C24h ou a abundância era menor que IN24h.

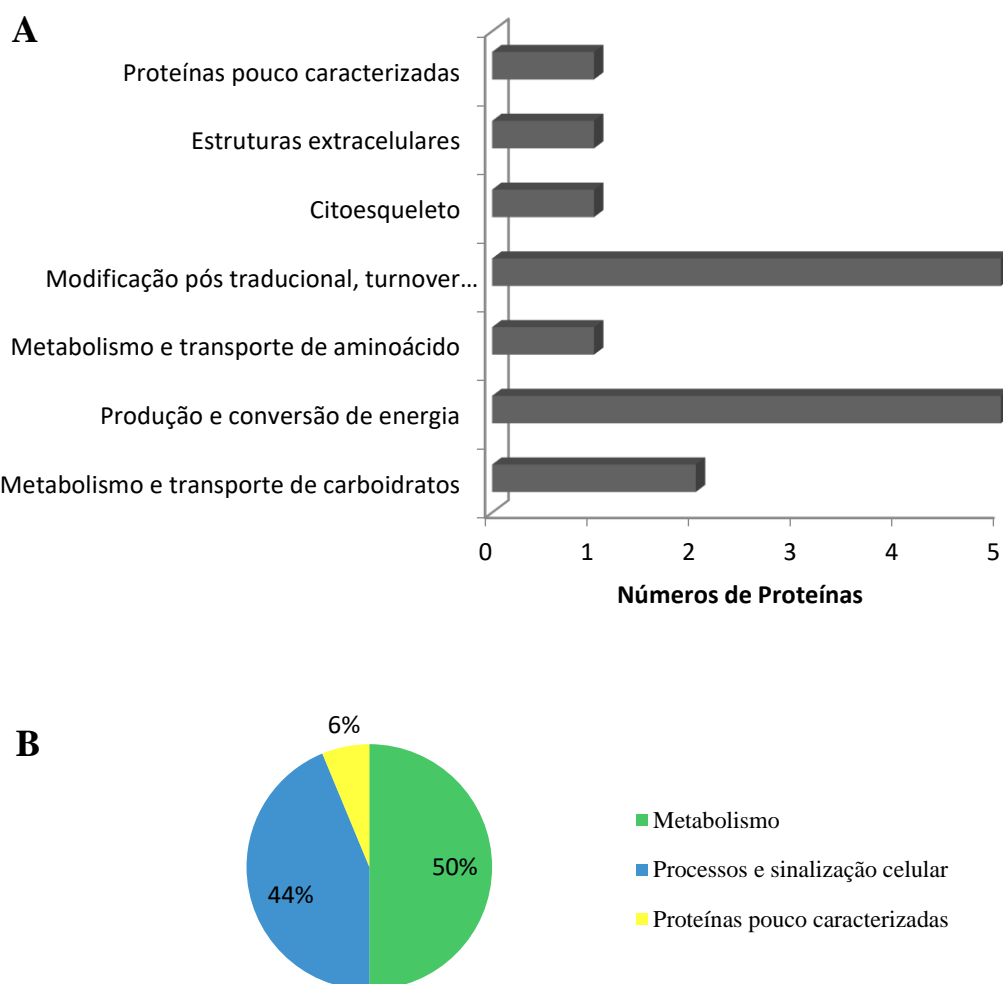
Já na análise do contraste dos tratamentos IN6h X IN48h, dos 73 *spots* diferenciais, identificaram 16 que corresponderam a 13 proteínas (Figura 14). Destas 3 proteínas apresentaram um aumento na abundância (Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3, duas proteínas do choque térmico (HSP 70 - fragmento)) e 11 redução de abundância (duas proteínas H(+)-ATPase do tipo vacuolar ATPase (subunidade B), ATP sintase subunidade  $\beta$ , putativa proteína do choque térmico – subunidade alfa (HSP 90), putativa glicosil hidrolase, outra proteína glicosil hidrolase, putativa proteína relacionada a actina (proteína não caracterizada), galectina, fragmento da aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1), aldeído desidrogenase X, mitocôndrial, ATPase do tipo vacuolar (subunidade A)). Para as proteínas que foram exclusivas nos tratamentos, uma proteína foi identificada para o fragmento da proteína do choque térmico (HSP 70) exclusiva para 48 horas, com aumento de abundância. E a proteína do choque térmico (HSP 60) foi exclusiva do tratamento de 6 horas.

Na tabela do Anexo 18 foram apresentadas todas as 16 proteínas com a identificação dos *spots* que foram diferenciais no contraste dos tratamentos Kunitz nas 6 e 48 horas. No Anexo 19 estão representados na imagem do gel do contraste IN6h X IN48h os *spots* que apresentaram abundância diferencial através do número de identificação



**Figura 14.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais nos tratamentos com inibidor de protease de soja Kunitz, comparação entre as 6 e 48 horas; em conjunto com a comparação entre os controles as 6 e 48 h; e sua identificação no MASCOT (Banco de dados: Insecta 2017). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do KOG.

Enquanto no tratamento IN48h comparado com IN6h, identificaram 16 *spots* correspondendo a 13 proteínas, que foram enquadradas nas seguintes categorias funcionais Processos e sinalização celular (citoesqueleto; estruturas extracelulares; modificação pós traducional, *turnover* proteico e chaperonas), metabolismo (metabolismo e transporte de aminoácido; metabolismo e transporte de carboidratos; produção e conversão de energia) e proteínas pouco caracterizadas. (Figura 15A) (Anexo 3). Na classificação funcional pelo KOG observamos a predominância das classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, que representam aproximadamente 50,0 % e 43,7 %, respectivamente. Enquanto as proteínas pouco caracterizadas corresponderam a 6,3 % (Figura 15B).



**Figura 15.** Classificação funcional das proteínas identificadas em intestino da lagarta *A. gemmatalis* nos tratamentos com inibidor de soja Kunitz nas 6 e 48 horas, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (A) Proteínas distribuídas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Agrupamento das proteínas em grupos conforme as classes funcionais.

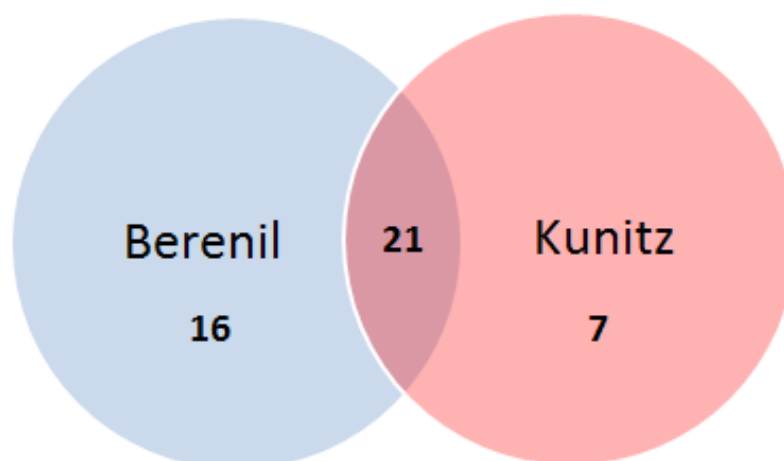
Os resultados mostram-se semelhante a resposta dos contrastes anteriores, que indicam maior número de proteínas diferencial em processos de metabolismo e sinalização celular e apresentam maior número de proteínas com abundância reduzida. As proteínas ATPase, glicosil hidrolase, ATP sintase e aldeído desidrogenase apresentaram *spots* com diminuição na abundância em IN6h para IN48h, e também menor comparando com o controle em 48 h. As proteínas relacionadas ao estresse celular obtiveram *spots* que aumentaram abundância em IN48h, enquanto diminuíram no controle C48h, como a proteína de choque térmico 70. Além das proteínas de choque térmico 60 e 90, em que o *spot* não estava presente ou diminuiu de abundância em IN48h. No controle C48h as proteínas de choque térmico diminuíram a abundância ou não houve variação diferencial.

De modo geral no tratamento com o inibidor de soja tipo Kunitz foi observado resposta semelhante ao tratamento com inibidor berenil, em que predominaram as classes correspondentes ao metabolismo e processos e sinalização celular, entre todas as proteínas identificadas no intestino da lagarta. O que indica que o inibidor de proteases Kunitz na alimentação das lagartas também alterou a abundância relativa de proteínas envolvidas nos processos responsivos ao estresse e metabolismo celular, como glicólise, respiração, estresse oxidativo e os processos envolvendo o enovelamento, síntese e degradação de proteínas.

A maioria das proteínas na classificação de processo de metabolismo apresentou uma diminuição na abundância diferencial, como a proteína ATPase do tipo vacuolar, glicosil hidrolase, aldeído desidrogenase, fosfoglicerato mutase e ATP sintase. Nos processos e sinalização celular as proteínas mais representativas foram as proteínas de choque térmico, que aumentaram a abundância como algumas proteínas Hsc 70 e Hsp 90, enquanto alguma das proteínas Hsc 70 e as Hsp 60 apresentaram diminuição na abundância relativa.

### 5.3. Análise das proteínas identificadas no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos controles e com inibidores berenil e de soja Kunitz e as suas interações funcionais

Dos 270 *spots* de proteínas analisados em todo o trabalho, 44 *spots* de proteínas foram identificados, nos tratamentos com inibidores de proteases berenil e Kunitz, nas diferentes horas, que correspondeu a 33 proteínas diferentes. A maioria das proteínas obteve abundância diferencial em ambas as condições (na presença do inibidor berenil e do inibidor de soja), o que corresponde a 21 proteínas, sendo diferencialmente abundantes nos tratamentos com os inibidores em pelo menos uma das horas. Das proteínas com abundância diferencial exclusivas em algum dos tratamentos, 16 proteínas obtiveram diferença de abundância somente na condição com o inibidor berenil, enquanto 7 proteínas foram diferencialmente abundantes na condição com o inibidor de soja (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Perfil geral dos spots proteicos identificados por espectrometria de massa no modo MS/MS em intestino de *Anticarsia gemmatalis* apresentados comparando o inibidor berenil e o inibidor Kunitz, sendo diferencialmente abundantes nos tratamentos com os inibidores em pelo menos uma das horas.

Das proteínas que foram identificadas somente no tratamento com Kunitz, a maioria participa de processos celulares ligados as chaperonas moleculares, como as proteínas de choque térmico 70 e 90. Enquanto, no tratamento com berenil foi observado um aumento no número de *spots* identificados, tanto no metabolismo quanto em processos celulares relacionados as chaperonas e modificação pós transcricional, como as

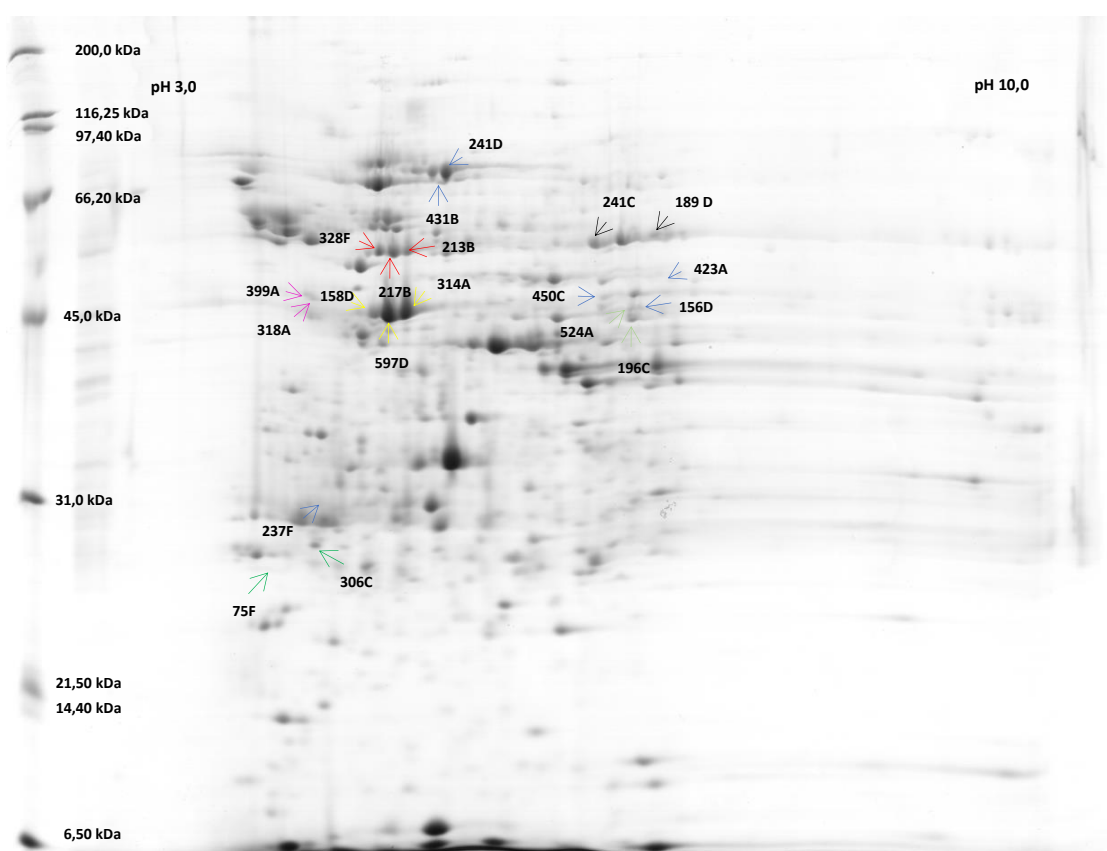
proteínas ATPase, ATP sintase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase, que participam de produção de energia e no metabolismo do carboidrato.

Algumas proteínas foram identificadas em *spots* diversos nos diferentes tratamentos, podendo haver a existência de isoformas, modificação pós traducionais de uma mesma proteína, ou o peptídeo identificado pertence a uma região bastante conservada entre as famílias de proteínas. Um exemplo disso seriam as proteínas homólogas com as proteínas do choque térmico Hsc70 (*Heat shock cognate 70*) identificadas com número de acesso A0A0A7HBC8, as quais foram detectadas tanto nos tratamentos com o inibidor berenil (*spot* 156D, *spot* 237F, *spot* 241D e *spot* 450C), quanto nos tratamentos com o inibidor Kunitz (*spot* 423A, *spot* 431B, *spot* 450C, *spot* 237F). As referidas proteínas compartilham peptídeos entre si e a identificação das mesmas foi processada utilizando, pelo menos, um peptídeo sequenciado. Foi observado que a variação do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) experimentais entre as proteínas identificadas e a proteína do choque térmico 70 apresentou uma ampla faixa de diferença, com valores de pI e MW entre 4,39 e 6,73; 30 e 76,3 kDa, respectivamente. Os *spots* abaixo apresentaram pI e MW experimentais seguintes, respectivamente: *spot* 156D (6,73 e 42,4 kDa), *spot* 237F (4,40 e 30 kDa), *spot* 241D (5,32 e 71,4 kDa) nos tratamentos com berenil, e o *spot* 450C (6,35 e 46,3 kDa), *spot* 423A (7,03 e 44,4 kDa), *spot* 431B (5,35 e 75,5 kDa) nos tratamentos de Kunitz, enquanto o pI e MW preditos da proteína do choque térmico Hsc 70 foram: 5,45 e 74 kDa, respectivamente (Figura 16). VASUDHA *et al.*, 2006 observaram 5 diferentes *heat shock* de 84, 62, 60, 47 e 33 kDa em lagartas do quinto instar de *Bombyx mori*. Em *Agrotis c-nigrum* foi encontrado *heat shock* de 71,6 kDa (WANG *et al.*, 2015).

Outro exemplo são as proteínas que apresentaram homologia com a proteína H<sup>+</sup>-ATPase do tipo vacuolar (subunidade B) identificadas com número de acesso A0A0U1XFD8, estas foram detectadas nos dois tratamentos: o inibidor berenil (*spot* 213B, *spot* 217B e *spot* 328F), e com o inibidor Kunitz (*spot* 213B e *spot* 217B). As referidas proteínas compartilham peptídeos entre si e a identificação das mesmas foi processada utilizando, pelo menos, um peptídeo sequenciado. Foi observado estreita variação do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) experimentais entre as proteínas identificadas e a H<sup>+</sup>-ATPase do tipo vacuolar (subunidade B). Os *spots* abaixo apresentaram pI e MW experimentais, respectivamente: *spot* 217B (4,96 e 56,5 kDa), *spot* 328F (4,85 e 56,5 kDa) e *spot* 213B (5,06 e 56,5 kDa) no tratamento BR24h, enquanto o pI e MW preditos da H<sup>+</sup>-ATPase do tipo vacuolar (subunidade B) foram: 5,32 e 55 kDa

respectivamente (Figura 16). Na purificação de uma ATPase vacuolar de *Mythimna separata* por LU *et al.* (2014), esta foi encontrada com 54,8 kDa e pI de 6,26.

Além das proteínas citadas acima, outras também apresentaram *spots* identificados com a mesma proteína, como a aspartato aminotransferase (código de acesso A0A0L7KY52), proteína do choque térmico Hsp 90 (A0A023F9K3), aldeído desidrogenase (A0A0N1ICB7), Phosphatidylethanolamine-binding (A0A194PJH0) e uma proteína relacionada a actina (A0A023ES50) como mostrado na Figura 16, os dados sobre pI e MW estão apresentados nas Tabelas do Anexo.



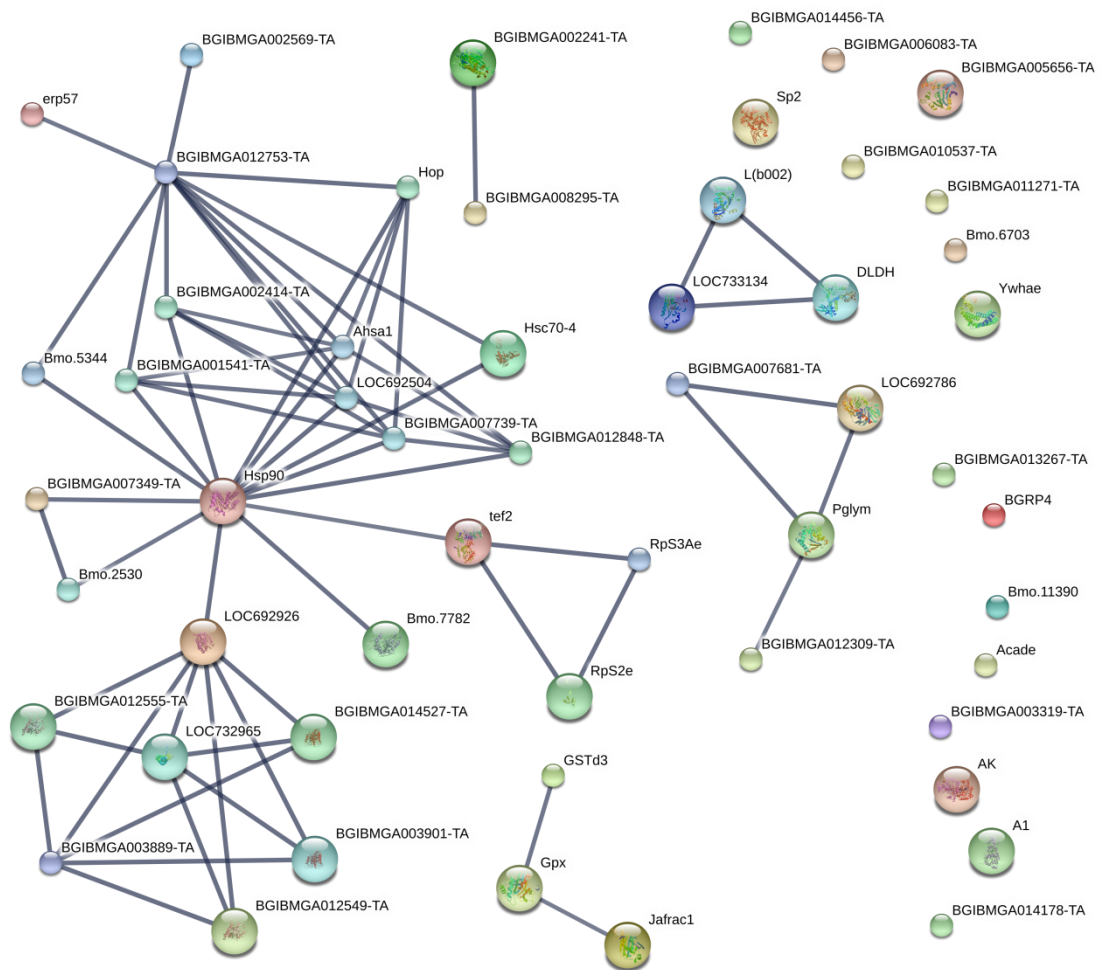
**Figura 16.** Representação dos spots que apresentaram identificação para a mesma proteína, no gel de eletroforese bidimensional do perfil proteico do inibidor de protease Kunitz nas 6 horas de tratamento. (\*) Proteína do choque térmico Hsc 70. (\*) V-ATPase. (\*) Pr Proteína de ligação ao fosfatidiletanolina. (\*) Proteína de ligação a actina. (\*) Proteína de choque térmico Hsp 90. (\*) Aldeído desidrogenase. (\*) Aspartato aminotransferase.

Na identificação das proteínas, o *spot* 156D com abundância diferencial no tratamento com o inibidor berenil apresentou homologia com as proteínas do choque térmico Hsc70 e uma proteína não caracterizada, identificadas com números de acesso

A0A0A7HBC8 e A0A182GCU6, respectivamente (Anexo 1). As duas proteínas do *spot* foram identificadas com apenas um peptídeo, e estes peptídeos diferentes entre si, o que indica a presença das duas proteínas no *spot* analisado. Os valores de pI e MW experimentais e os preditos apresentaram ampla variação entre os *spots*. A proteína presente no *spot* 156D no tratamento BR6h X BR12h apresentou pI e MW experimentais 6,73 e 42,4 kDa, enquanto o pI e MW preditos das proteínas do choque térmico Hsc70 e uma proteína não caracterizada foram: 5,45 e 74 kDa, e 5,74 e 70 kDa, respectivamente.

Outro *spot* também apresentou homologia com duas diferentes proteínas, o *spot* 63D foi identificado como glutathiona peroxidase POX-A e a POX-C, números de acesso A0A088MG62 e A0A088MGF5, respectivamente (Anexo 1). Os pI e MW experimentais entre a proteína identificada e as POX-A e POX-C foram similares, somente o pI da POX-A apresentou diferença maior. A proteína presente no *spot* 63D no tratamento BR6h x BR12h apresentou pI e MW experimentais 5,69 e 21,6 kDa, enquanto o pI e MW preditos das POX-A e POX-C foram: 8,50 e 22 kDa, e 6,30 e 22 kDa, respectivamente.

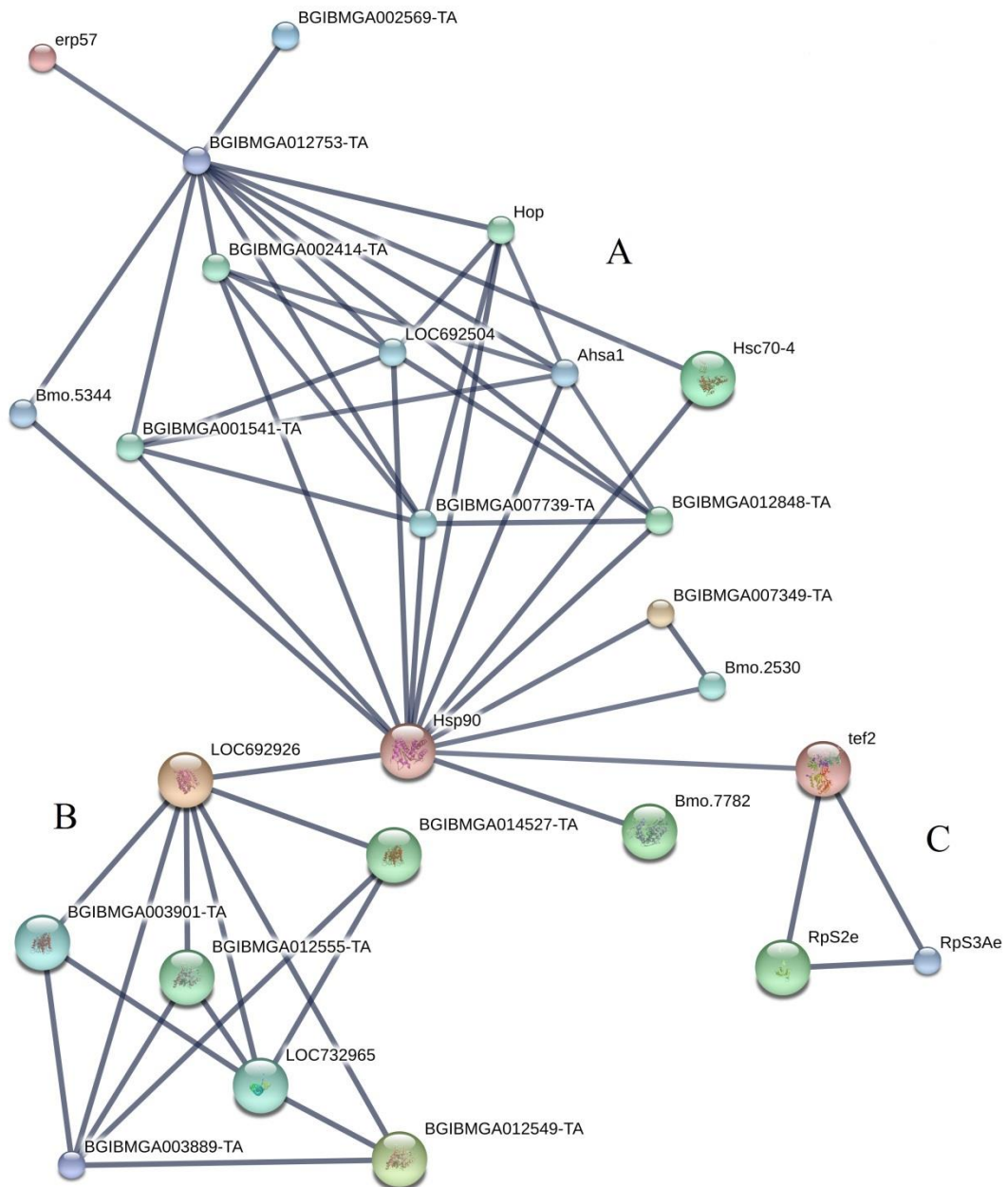
As interações proteína-proteína foram avaliadas usando o banco de dados STRING visando obter informações adicionais sobre a atuação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas no metabolismo da lagarta *A. gemmatalis*, quando submetidas à dieta com inibidores de proteases. Para essa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Bombyx mori* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados. Sendo assim, grande parte das proteínas diferencialmente abundantes identificadas da lagarta *A. gemmatalis* exibiram interações funcionais entre si, considerando interações com maior ou menor intensidade. Portanto, das 33 proteínas identificadas na espectrometria, 16 apresentaram interações entre si e/ou com proteínas da mesma rede de interação. Entre estas estão as proteínas do choque térmico HSP90 (Hsp90), a HSP70 (Hsc70-4), três proteínas não caracterizadas, que participam da síntese de ATP (erp57, BGIBMGA007349-TA, BGIBMGA002569-TA), a proteína fator de alongação da tradução 2 (tef2), e a ATP sintase subunidade alfa (LOC692926), que formam uma grande rede de interações que pode ser subdividida em três vias funcionais. Algumas proteínas como a enoil-CoA hidratase (BGIBMGA005656-TA), a proteína não caracterizada (BGIBMGA013267-TA), a 14-3-3 epsilon (Ywhae, uma chaperona multifuncional), a acil-coenzimaA desidrogenase (Acade), a arginina quinase (AK) e a actina muscle-type A1 (A1) não apresentaram interação funcional com os grupos descritos acima (Figura 17).



**Figura 17.** Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial nos tratamentos com o inibidor berenil e o inibidor de soja Kunitz, nas diferentes horas. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “*confidence view*”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida.

A primeira via funcional que envolve as proteínas identificadas citadas acima é o processo de enovelamento proteico, atuando a fim de evitar as interações incorretas de proteínas, na síntese, dobramento e degradação proteica (CAPLAN *et al.*, 2007; YOUNG *et al.*, 2010). As famílias das proteínas de choque térmico, nos diferentes pesos moleculares (Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90) participam desse processo, muitas expressas constitutivamente e algumas, induzidas e moduladas em resposta a condições de estresses submetidas a células intestinais do inseto (ZHAO & JONES, 2012; PRODROMOU *et al.*, 2016).

As Hsp 90 são chaperonas dependentes de ATP e atuam no citoplasma integrando uma maquinaria multi chaperônica, atuando no enovelamento final das proteínas (próximo do estado nativo), que inclui Hsp 70, proteínas com atividade isomerasas, proteínas de ligação a ATPs e outras chaperonas (RIGGS *et al.*, 2004; YOUNG *et al.*, 2004; BORGES *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2001). Entre as proteínas que interagiram com as proteínas identificadas estão: proteínas envolvidas no processo de ligação de ATP (ATP *binding*), com funções como enovelamento proteico e resposta a estresse: as proteínas não caracterizadas (BGIBMGA012753-TA; Bmo.2530; BGIBMGA007349-TA), a proteína ativador de ATP sintase (Ahsa1), a proteína P23-*like* (LOC692504), a proteína do choque térmico 68 (Bmo.7782), a proteína organizadora Hop Hsc 70 / Hsp 90 (Hop) e além de quatro proteínas não caracterizadas (BGIBMGA002414-TA, BGIBMGA001541-TA, BGIBMGA007739-TA, BGIBMGA012848-TA) (Figura 18A).



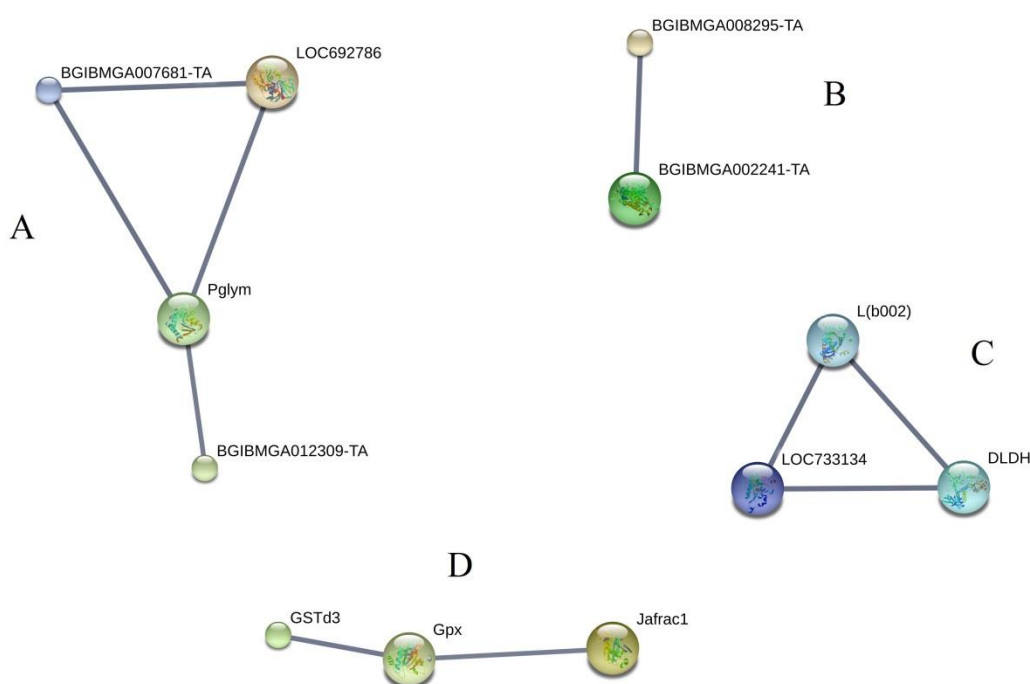
**Figura 18.** Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial em ambos os tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, nas diferentes horas. (A) Interações envolvendo proteínas do enovelamento, síntese e degradação de proteínas. (B) Interações envolvendo proteínas chaperonas e produção de ATP. (C) Interações envolvendo proteínas chaperonas e processo de tradução proteica. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “*confidence view*”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida.

Outra via funcional é conectada a via de enovelamento de proteína, que mostra a interação da proteína identificada do choque térmico Hsp 90 com outra proteína também identificada, a ATP sintase subunidade alfa (LOC692926). Esta proteína possui múltiplas subunidades e se localiza nas mitocôndrias de células eucarióticas, onde o gradiente eletroquímico é estabelecido através da membrana mitocondrial interna por fosforilação oxidativa, para a produção de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (FUTAI *et al.*, 2000). A ATP sintase interage com Hsp90 funcionando como um co-chaperona, modulando a ação da Hsp90 no processo de maturação de proteínas enoveladas (HALL *et al.*, 2014; PAPATHANASSIU, *et al.*, 2006). Outras proteínas encontradas na rede de interação participam da produção de ATP, como a proteína identificada ATP sintase subunidade beta (BGIBMGA12549-TA), interagindo diretamente com a Hsp 90; e que por sua vez apresentou interações com a ATP sintase subunidade gamma (LOC732965), ATP sintase subunidade beta (BGIBMGA003901-TA), a protein-transporting ATP synthase (BGIBMGA003889-TA), a proteína de ligação de ATP (BGIBMGA014527-TA), e a proteína não caracterizada (BGIBMGA012555-TA) (Figura 18B).

A terceira via funcional, que envolve a proteína fator de alongação da tradução 2 (tef2), participa do processo de tradução das proteínas. Esta catalisa o passo de translocação ribossomal dependente de GTP durante o alongamento da tradução. Durante este passo, o ribossoma muda do estado pré-translocacional para o estado pós-translocacional, quando o peptidil-tRNA recente formado tRNA ligado ao sítio A e o tRNA desacilado ligado ao sítio P deslocam-se para os sítios P e E, respectivamente. Catalizando assim, o movimento coordenado das duas moléculas de tRNA, o mRNA e as alterações conformacionais no ribossomo. Enquanto a proteína Hsp 90, envolvida no enovelamento final de diversas proteínas, participa em conjunto com o complexo ribossômico, fatores de alongação, fatores de transcrição, proteínas quinase e isomerases (NISSEN *et al.*, 2000; RICHTER & BUCHNER, 2001; RAMOS *et al.*, 2008). A Hsp 90 identificada interage diretamente com outra proteína identificada, a tef2 (fator de alongação 2), que por sua vez interagem com outras proteínas nessa via como a proteína ribossomal 40s 53a (RpS3Ae), um componente estrutural do ribossomo; e a proteína ribossomal S2 (RpS2e), que tem como definição funcional tradução, componente estrutural do ribossomo e ligação do RNA (RNA Binding) (Figura 18C).

A proteína identificada fosfoglicerato mutase (Pglym) atua na conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato na via glicolítica, que resulta na produção de energia na forma de ATP e NADH, utilizada em vários processos celulares. Esta apresentou

interações funcionais diretas com a proteína identificada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (LOC692786), a qual catalisa a reação que converte o gliceraldeído 3-fosfato a 3-fosfo-D-glicerol, liberando NADH; e a fosfoglicerato quinase (BGIBMGA007681-TA), que atua na conversão de 3-fosfo-D-glicerato a 3-fosfo-D-glicerol fosfato, com a quebra de uma molécula de ATP (NELSON & COX, 2003). Além de interagir com a proteína não caracterizada (BGIBMGA012309-TA), a qual possui a função de oxidoredutase como acceptor de NAD e NADP (Figura 19A).



**Figura 19.** Rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial em ambos os tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, nas diferentes horas. (A) Interações de proteínas na via glicolítica. (B) Interação envolvendo o controle da homeostase de pH em organelas. (C) Interações de proteínas no ciclo de Krebs. (D) Interações envolvendo o estresse oxidativo celular. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do Uniprot. A rede de interações é mostrada no “*confidence view*”, em que a espessura da linha entre as proteínas indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação e as representações maiores das proteínas indicam estrutura 3D conhecida.

A proteína não caracterizada (BGIBMGA002241-TA) corresponde a proteína H<sup>+</sup>-ATPase do tipo vacuolar identificada, responsável por regular o pH de várias organelas, incluindo lisossomas, endossomas e complexos de golgi, através da hidrólise de ATP (FORGAC *et al.*, 2007; SAUTIN *et al.*, 2005). Esta exibiu interações funcionais com a

proteína não caracterizada (BGIBMGA008295-TA), que participa de processo metabólico de ATP e transporte de prótons (Figura 19B).

A proteína piruvato desidrogenase (LOC733134), que participa do processo da biossíntese acetil-CoA a partir de piruvato, exibiu interações funcionais com a diidrolipoil desidrogenase (DLDH) e a proteína componente E1 subunidade alfa da piruvato desidrogenase (L(b002)). No metabolismo do carbono e proteínas, o piruvato pode ser convertido em Acetil-CoA, no ciclo de Krebs. A formação do acetil-CoA é catalisado por um complexo enzimático chamado de complexo piruvato desidrogenase, que é formado por 5 coenzimas - tiamina pirofosfato (TPP), coenzima A (CoA), Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina (NAD<sup>+</sup>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e ácido lipóico) e 3 enzimas: piruvato desidrogenase, diidrolipoil transacetilase e diidrolipoil desidrogenase (NELSO & COX, 2003) (Figura 19C).

A proteína identificada glutathione peroxidase (Gpx) exibiu interação funcionais com a proteína também identificada tiol peroxirredoxina (Jafrac1) e com a glutathione s-transferase 3 (GSTd3). Estas proteínas participam da resposta a estresse oxidativo, envolvidas na degradação de substâncias potencialmente danosas para as células, desempenhando papel crucial na manutenção da homeostase redox e na proteção dos organismos contra o acúmulo de moléculas tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (YAO *et al.*, 2014), detoxificação de compostos endógenos e xenobióticos. Também desempenham funções no transporte intercelular, biossíntese de hormônios e resistência dos insetos contra inseticidas (ENAYATI *et al.*, 2005; KONUS *et al.*, 2013) (Figura 19D).

Um grupo de proteínas identificadas no estudo são referentes funcionalmente ao metabolismo de proteínas, participando em vias de sinalização de modificação pós traducional, *turnover* proteico e chaperonas. Essas proteínas apresentaram vários *spots* com abundância diferenciada no controle e nos tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz, com homologia para a proteína do choque térmico cognata Hsc 70.

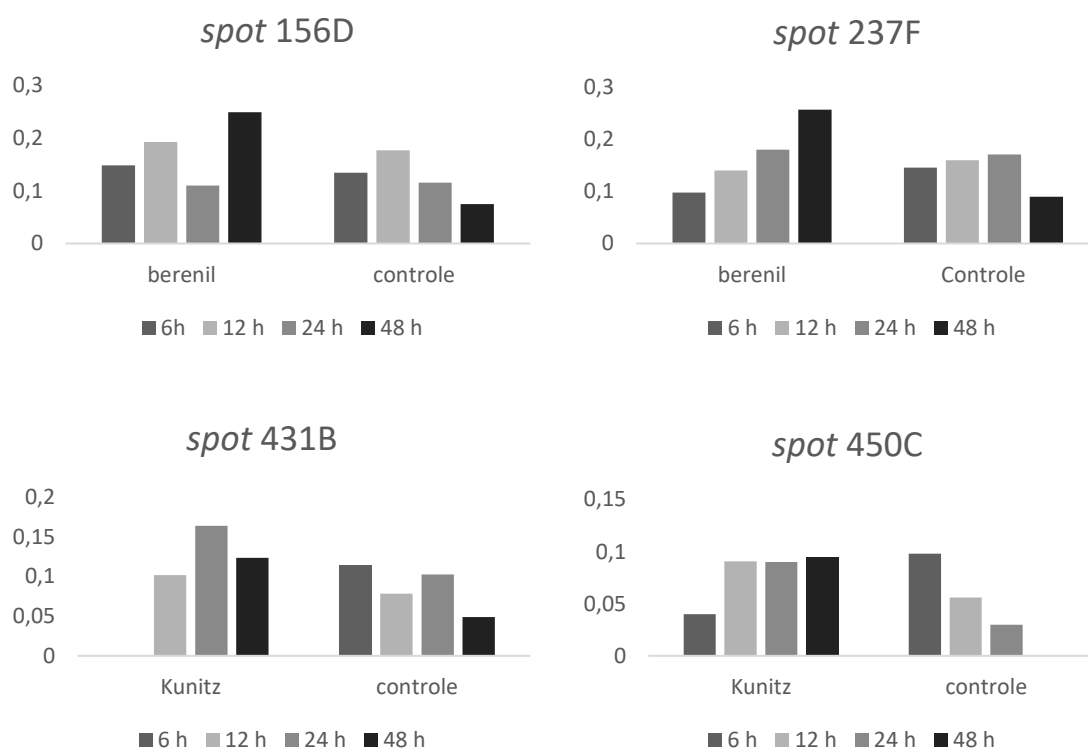
A família de proteínas Hsp70 é pertencente a uma superfamília bastante conservada filogeneticamente, sendo de fundamental importância para o dobramento de proteínas nas células (MAYER & BUKAU, 2005; COLE & MEYERS, 2011; MONZO *et al.*, 2012). As proteínas das Hps são agrupadas de acordo com as sequências de aminoácidos e os pesos moleculares: HSP 27, HSP 60, HSP 70, HSP 90, HSP 100 HSP40 e as pequenas Hsps (sHsps), massa molecular estendendo de 12 a 43 kDa (SØRENSEN

*et al.*, 2003; MIZRAHI *et al.*, 2010). As diferentes proteínas em cada família possuem pesos moleculares similares, mas o padrão de expressão e indução é distinto (KIANG E TSOKOS, 1998; SANTORO 2000; SUN *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação principal das Hsc é o de atuarem como chaperonas moleculares, no qual são responsáveis por mediar atividades essenciais para as células, tais como evitar interações incorretas entre as proteínas, auxiliando na montagem final, secreção, bem como em sua síntese, dobramento e degradação, além de regular fatores de transcrição e proteínas quinases (KING & MACRAE, 2015, CAPLAN *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2013).

A proteína de choque térmico 70 foi identificada em diferentes *spots* e suas isoformas apresentaram respostas distintas entre os tratamentos e o controle. Na análise do contraste entre os controles, a abundância das proteínas diminuiu ou se manteve constante nas 12, 24 e 48 h em relação ao tempo 6 h. Em ambos os tratamentos berenil e Kunitz os *spots* apresentaram, no geral, aumento na abundância relativa, nas 12 h, 24 h e 48 horas, das várias proteínas Hsc 70 identificadas, o que pode estar relacionado à condição de estresse submetida às lagartas ao ingerir inibidores de proteases, que em condições adversas aumentou a abundância para minimizar os efeitos deletérios, como na degradação dos inibidores e/ou aumento de expressão de proteases (PAULILLO *et al.*, 2000; ZHU-SALZMAN 2003; PILON *et al.*, 2012). A resposta aos estresses é caracterizada por um aumento extremamente rápido na expressão das proteínas Hsc, o que não ocorre apenas após exposição ao calor, mas também quando as células são expostas a diversos outros estímulos, incluindo análogos de aminoácidos, hormônios, diversos metais pesados, infecção microbiana, antibióticos e outros venenos metabólicos (SANTORO, 2000; MORALES *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2016).

Os *spots* 237F e 156D foram identificados com homologia a proteína do choque térmico 70 e apresentaram abundância diferencial no tratamento com berenil e no controle. Os *spots* 431B e 450C foram diferenciais em kunitz e no controle. Foi observado uma abundância maior nas isoformas dos *spots* no tratamento com berenil e kunitz em relação ao controle, durante as horas. Apresentando um aumento significativo nas 24 e 48 horas dos inibidores, enquanto no controle a abundância da proteína foi menor durante as horas (Figura 20).



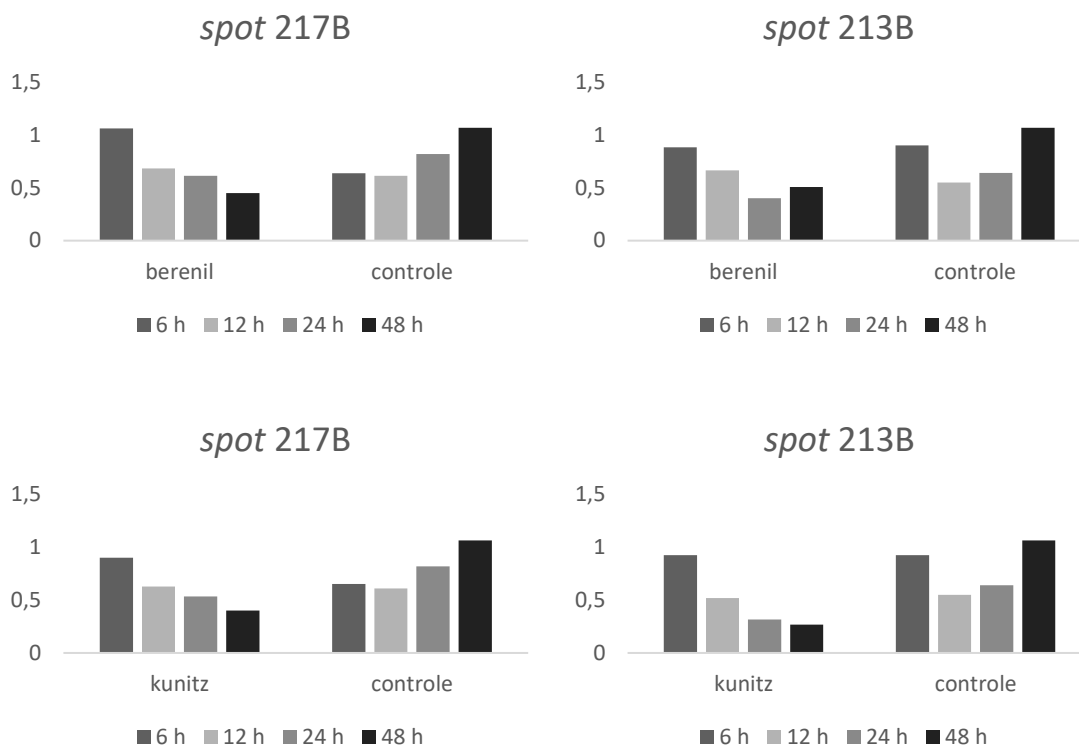
**Figura 20.** Abundância relativa (% volume) de spots identificados com homologia com a proteína do choque térmico Hsc 70 entre o controle e os tratamentos berenil e Kunitz, nas diferentes horas.

Essas proteínas são abundantemente expressas em insetos, sendo geralmente induzidas e moduladas em resposta a estresses abióticos, como o calor, o frio, a radiação ultravioleta, estresse oxidativo, os pesticidas químicos, bem como estresses bióticos causados por vírus, bactérias, fungos e outros insetos (ZHAO & JONES, 2012; TIROLI-CEPEDA *et al.*, 2011), e também em alta densidade populacional de indivíduos (WANG *et al.*, 2007), assim, o aumento da expressão de Hsc está associado à proteção celular contra os efeitos gerados por essas condições (ZHANG & DENLINGER *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014).

Os inibidores de proteases são moléculas que funcionam como substratos específicos para as proteases digestivas, pois formam um complexo estável o qual limita a velocidade de proteólise e interfere no consumo e assimilação do alimento, afetando negativamente o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos (MENDONÇA *et al.*, 2012). Alguns insetos são bem adaptados ao mecanismo de defesa a inibidores de proteases de plantas hospedeiras. Uma dessas adaptações refere-se ao aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes, na tentativa de burlar o efeito inibitório (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Com ingestão constante de inibidores, a biodisponibilidade de aminoácidos estaria sendo utilizado para a síntese de mais proteases ao invés da biossíntese de outras proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento normal do inseto, já que a ingestão deste é dependente de tripsina-*like* (HAQ *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2008; PILON *et al.*, 2012). MENDONÇA *et al.* 2012, verificou aumento da atividade proteica acompanhado do decréscimo no peso larval e aumento do ciclo larval de *A. gemmatalis* alimentada com inibidores de proteases de soja do tipo Kunitz e Bowman-Birk desde o 1º ínstar. O aumento da abundância de Hsc70 também pode estar relacionado com a necessidade rápida de aumento de expressão de tripsina-*like*, em quantidade maior que os inibidores podem se ligar, ou proteases insensíveis ao inibidor. Entre estas HSPs, a família HSP70 representa uma das proteínas mais altamente conservadas (MAYER & BUKAU, 2005), que também tem várias funções em organismos eucarióticos, incluindo translocação, dobramento de proteínas sintetizadas, degradação de proteínas instáveis e desmoldadas, bem como prevenção e dissolução de complexos de proteínas (DAUGARRD *et al.*, 2007; TIROLI-CEPEDA *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2016).

Outro grupo de proteínas identificadas no estudo é referente ao metabolismo energético, participando da produção e conversão de energia no inseto. Essas isoformas que obtiveram abundância diferenciada no controle e nos tratamentos com os inibidores berenil e Kunitz são as proteínas ATPase do tipo vacuolar subunidade b. Na análise do perfil proteico do inibidor berenil e do Kunitz, nas diferentes horas, a proteína presente nos *spots* 217B e 213B, com homologia para a ATPase do tipo vacuolar (Subunidade b) apresentou menor abundância na amostra de intestino de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo os inibidores comparado ao controle, o que pode estar relacionado à condição de estresse que foi submetida as lagartas ao ingerir os inibidores (Figura 21).



**Figura 21.** Abundância relativa (% volume) de spots identificados com homologia com a proteína ATPase do tipo vacuolar (subunidade b) entre o controle e os tratamentos berenil e Kunitz, nas diferentes horas.

A proteína identificada é uma proteína  $H^+$  - ATPase do tipo vacuolar (ou tipo V) é uma proteína amplamente distribuída em todas as células eucariontes e está localizada principalmente em endomembranas e membranas plasmáticas sendo a fonte de energia primária para a secreção e absorção, servindo como um transportador de  $H^+/K^+$  eletrogênico pelo epitélio do intestino dos insetos (WIECZOREC *et al.*, 1999; WIECZOREK *et al.*, 2000; HIRATA *et al.*, 2003). Nos compartimentos intracelulares, a  $H^+$  - ATPase do tipo vacuolar regula o pH de várias organelas intracelulares, incluindo lisossomas, endossomas, vesículas secretoras e complexos de golgi. Na membrana plasmática, sua função é permitir a extrusão de  $H^+$  da célula, participando, portanto, do controle do pH e energização da membrana (MALNIC, 2000; SAUTIN *et al.*, 2005; HOLLIDAY *et al.*, 2014). Em todos os eucariotos, as V-ATPases medeiam diversos processos celulares, como o transporte ativo secundário, *endosomal protein sorting* (endossomal triagem de proteínas), glicosilação de proteínas no complexo de golgi e carregamento de vesículas secretoras (HURTADO-LORENZO *et al.*, 2006; CORBACHO *et al.*, 2012).

Em insetos, além da função de acidificar organelas intracelulares específicas, as V-ATPases também possuem um papel vital no transporte de cátions transepitelial nos epitélios de glândulas salivares, glândulas labiais, intestino e sensilas sensoriais, cooperando com o transporte através da membrana de  $K^+/H^+$  e canais de iônicos (JEFFERIES *et al.*, 2008). As V-ATPases nas membranas apicais de células calciformes de intestino médio de *Tobacco hornworm* foi a primeira ATPase do tipo vacuolar de inseto encontrada em membrana plasmática, e é responsável por alcalinização do lúmen do intestino (WIECZOREK *et al.*, 2003; WIECZOREK *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2014).

LU *et al.* (2014) observou no trabalho desenvolvido para avaliação da ATPase vacuolar em todo ciclo de vida de *Mythimna separata* que a expressão desta enzima é elevada nos últimos instares do desenvolvimento larval, o que é uma característica comum na família da ordem Lepidoptera. As V-ATPases são responsáveis na regulação do pH citoplasmático, que é um provável sistema de sinalização (DOW *et al.*, 1997). O bloqueio destas enzimas em culturas de células aumenta a suscetibilidade à apoptose (NISHIHARA *et al.*, 1995; NAKASU *et al.*, 2008). A baixa abundância da ATPase vacuolar pode estar conectada com alguma mudança no pH do intestino do inseto, que por qualquer alteração, talvez causada por condição de estresse, pode alcalinizar o pH do lúmen (LU *et al.*, 2014).

BABU *et al.* (1996) demonstrou que a atividade de ATPase no intestino de *Helicoverpa armigera* diminuiu significativamente, devido a efeito tóxico de azadirachtin, substância presente nas sementes de nim, que atua como inseticida por causar restrição alimentar e diminuir o desenvolvimento de insetos. A inibição da ATPase pode afetar o transporte de íons ativos, levando à alteração da regulação de eletrólitos. Após tratamento com o extrato de nim SENTHIL-NATHAN *et al.* (2005a,b) observou diminuição na abundância da ATPase, que reflete a uma redução no metabolismo no inseto e pode ser devido a efeitos tóxicos no componente de nim na permeabilidade da membrana, especialmente no epitélio intestinal.

Em experimentos feitos por COSTA *et al.*, (2016), quando larvas *Aedes aegypti* foram expostas a doses letais de squamocina, composto extraído da planta *Annona mucosa* com propriedade inseticida, houve diminuição na expressão de ATPases vacuolar no intestino comparado com o controle, diminuição esta que pode estar associada a anormalidades citológicas e autofagia no intestino larval. O bloqueio de substâncias transportadas através da membrana plasmática no intestino médio pode ativar a autofagia

nessas células, o que, apesar do papel essencial para a manutenção da homeostase celular, quando ativadas em excesso, pode destruir proteínas e organelas celulares, resultando num colapso celular (MIZUSHIMA *et al.*, 2008). Alteração na abundância de enzimas que medeiam à absorção e o transporte de metabólitos e nutrientes, como íons e não eletrólitos, especialmente em epitélio intestinal possivelmente afeta o crescimento e desenvolvimento do inseto que pode leva-lo a morte (DESNEUX *et al.*, 2007). Assim, doses elevadas de inibidores de proteases ingerido pelo inseto afeta processos essenciais ao desenvolvimento do inseto, como foi observado nos estudos em que lagartas alimentadas com inibidores benzamidina, berenil e de soja, aumentaram o ciclo de vida, diminuindo o desenvolvimento larval e aumentando a mortalidade (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2012).

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- A presença dos inibidores berenil e Kunitz no intestino da lagarta *Anticarsia gemmatalis* alteraram o perfil de proteínas durante as horas de tratamentos;
- Foram identificadas proteínas com abundância diferencial envolvidas em processos celulares, como o metabolismo energético, do carbono, de lipídeos, aminoácidos e que participam do estresse oxidativo e síntese e degradação de proteínas, em ambos tratamentos;
- Alguns *spots* foram identificados com homologia para a proteína ATPase e estas isoformas apresentaram abundância menor em relação ao controle, durante as horas de ambos tratamentos;
- As isoformas identificadas da proteína choque térmico 70 apresentaram abundância maior que o controle, durante as horas de ambos tratamentos;
- No perfil proteico de berenil outras proteínas apresentaram aumento da abundância relativa como a piruvato desidrogenase, arginina quinase, fosfoglicerato mutase e a ATP sintase;
- Enquanto outras proteínas apresentaram diminuição na abundância relativa como a aldeído desidrogenase, glicosil hidrolase, carbonil redutase e a aspartato aminotransferase;
- No perfil proteico do inibidor Kunitz outras proteínas apresentaram aumento da abundância relativa como a proteína arginina quinase e a proteína do choque térmico Hsp 90;
- Enquanto outras proteínas apresentaram diminuição na abundância relativa, como as proteínas glicosil hidrolase, enoil CoA hidratase, fosfoglicerato mutase, ATP sintase e a aspartato aminotransferase;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B. (2005). Bases Ecológicas das Interações entre Insetos e Plantas no Manejo Ecológico de Pragas Agrícolas. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Ed.). Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica Sustentável. Brasília, DF; Embrapa Informação Tecnológica, p. 323-339.
- AHN, J.E., ZHU-SALZMAN, K. (2009). CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology*, Vol.55, p.678–685.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol.215(3),p.403-410.
- ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. (2004). Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). *Arq. Inst. Biol.* Vol.71, p.391-398.
- BABU, R., MURUGAN, K., VANITHAKUMARI, G. (1996). Interference of Azadirachtin on the food utilization efficiency and midgut enzymatic profiles of *Helicoverpa armigera*. *Indian J. Environ. Toxicol.*, Vol.6, p.81–84.
- BARBARA, K.A. (2000). Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Disponível em: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm> >, acessado em 21 de fevereiro de 2017.
- BARRETT, A.J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* Vol.244, p.1-15.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Journal of Biological Chemistry.* Vol.382, p.727–733.
- BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; DEMO, C.; MARTINI, E.S.; PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; BROD, C.S.; MONNERAT, R.G. (2005). Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n.82, EMBRAPA.
- BORGES, J.C., RAMOS, C.H. (2005). Protein folding assisted by chaperones, *Protein Pept. Lett.* 12, p.257-261.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteinase in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary proteinase inhibitors. *Physiol.Entomol.* Vol.29, p.278–290.
- BRADFORD, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72.n.1-2.p.248-254.

- BRANDON, D.L.; FRIEDMAN, M. (2002). Immunoassays of soy proteins. *J. Agr. Food Chem.* Vol.50, p.6635-6642.
- CAPLAN, A.J., MANDAL, A.K., THEODORAKI, M.A. (2007). Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol.* Vol.17,p.87–92
- CARTER, P. & WELLS, J.A. (1988). Dissecting the catalytic triad of serine protease. *Nature.* Vol.332, p.564-568.
- CASTRO, S.V., LOBO, C.H., FIGUEIREDO, J.R.de., RODRIGUES, A.P.R. (2013). Proteínas de choque térmico Hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.4, p.261-271.
- CHI, Y.H.; SALZMAN, R.A.; BALFE, S.; AHN, J.E.; SUN, W.; MOON, J.; YUN, D.J.; LEE, S.Y.; HIGGINS, T.J.; PITTENDRIGH, B.; MURDOCK, L.L.; ZHU-SALZMAN, K. (2009). Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin—costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology.* Vol.18, p.97–110.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Estudos de Prospecção de mercado. Perspectivas agropecuárias, Brasília.Vol.4,p.1-129, set. 2016.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Estudos de Prospecção de mercado. Perspectivas agropecuárias, Brasília.Vol.3,p.1-156, set. 2015.
- COLE, J.A., MEYERS, S.A. (2011). Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. *Journal of Andrology*, Vol.32(4), p.402-410.
- CORBACHO, I., TEIXIDÓ, F., OLIVERO, I., HERNÁNDEZ, L.M. (2012). Dependence of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi functions on V-ATPase activity. *FEMS Yeast Res*, Vol.12, p.341–350.
- COSTA, M.d.S., PAULA, S.O.d., MARTINS, G.F., ZANUNCIO, J.C., SANTANA, A.E.G., SERRÃO, J.E. (2016). Multiple Modes of Action of the Squamocin in the Midgut Cells of *Aedes aegypti* Larvae. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0160928, p.1-13.
- DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H. (2010). Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira, Circular Técnica 74 Embrapa Soja, Londrina, Paraná.
- DOW, J.A.T., DAVIES, S.A., GUO, Y., GRAHAM, S., FINBOW, M.E., KAISER, K. (1997). Molecular genetic analysis of V-ATPase function in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology*, Vol.200, p.237-245.
- DAUGARRD, M., ROHDE, M., JÄÄTTELÄ, M. (2007). The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*, 581, 3702-3710.
- DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPUECH, J.M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol.*, Vol.52, p.81–106.

DUNAEVSKY, Y.E.; ELPIDINA, E.N.; VINOKUROV, K.S.; BELOZERSKY, M.A. (2005). Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Molecular Biology*. Vol.39, n°.4, p.608–613.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Resultados do manejo integrado de pragas de soja na safra 2016/2017. 70p, 2017.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.15. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2012 e 2013. 261p, 2011.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Artrópodes que atacam as folhas de soja. Cap4.122p. 2012.

ENAYATI, A.A., RANSON, H., HEMINGWAY, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, Vol.14, p.3–8.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*. Vol.4, p.129-134.

FLEMING, PA., HOFMYER, S.D., NICOLSON, S.D. (2007). Role of insects in the pollination of *Acacia nigrescens* (Fabaceae). *South African Journal of Botany*. Vol.73, p.49-55.

FORGAC, M. (2007). Vacuolar ATPases: Rotary próton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev.Mol.Cell Biol.*, Vol.8, p.917-929.

FUGI, C.G.Q.; LOURENCAO, A.L.; PARRA, J.R.P. (2005). Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agrícola*. Vol.62, p.31-35.

FUTAI, M., OMOTE, H., SAMBONGI, Y., WADA, Y. (2000). Synthase (H<sup>+</sup> ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation *Biochim. Biophys Acta*, Vol.145,8 p.276–288

GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Genetic engineering of plants for insect resistance. [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-010-9646-1\\_4#page-2](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-010-9646-1_4#page-2), acessado em 24 de fevereiro de 2017.

HALL, J.A., KUSUMA, B.R., BRANDT, G.E.L., BLAGG, B.S.J. (2014). A Binds F1F0 ATP Synthase To Modulate the Hsp90 Protein Folding Machinery. *ACS Chem. Biol*. Vol.9, p.976–985

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol.431, p.145-159.

- HIRATA, T., NAKAMURA, N., OMOTE, H., WADA, Y., FUTAI, M. (2003). Regulation and reversibility of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J.Biol. Chem.*, vol.275, n.1, p. 386-389.
- HOLLIDAY, L.S. (2014). Vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase: An essential multitasking enzyme in physiology and pathophysiology. *New J. Sci*, Vol.2014, p.1–21.
- HURTADO-LORENZO, A., SKINNER, M., ANNAN, J.E., FUTAI, M., SUN-WADA, G.-H., BOURGOIN, S., CASANOVA, J., WILDEMAN, A., BECHOUA, S., AUSIELLO, D.A., BROWN, D., MARSHANSKY, V. (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat. Cell Biol*, Vol.8, p.124–136.
- JAMAL, F.; PANDEY, P.K.; SINGH, D.; KHAN, M.Y. (2012). Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Ver. Publicação online*: 14 novembro 2012.
- JEFFERIES, K.C., CIPRIANO, D.J., FORGAC, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol.476, n.1, p.33-42.
- JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. (1997). The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. Vol.43, p.885-895.
- JUNQUEIRA, R.G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. (1992). Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*Vol.25.p.873-887.
- KANT, M. R., BALDWIN, I. (2007). T.The ecogenetics and ecogenomics of plant–herbivore interactions: rapid progress on a slippery road. *Current Opinion in Genetics & Development*. Vol.17, p.519–524.
- KELLER, A., NESVIZHSHKII, A.I., KOLKER, E., AEBERSOLD, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*, Vol.74(20).p.5383-5392.
- KIANG, J.G., TSOKOS, G.C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther*, Vol.80, p.183-201.
- KING, A.M., MACRAE, T.H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, Vol.60, p.59-75.
- KONUS, M., KOY, C., MIKKAT, S., KREUTZER, M., ZIMMERMANN, R., ISCAN, M., GLOCKER, M.O. (2013). Molecular adaptations of *Helicoverpa armigera* midgut tissue under pyrethroid insecticide stress characterized by differential proteome analysis and enzyme activity assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, Vol.8, P.152-162.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol.227, p.680-685.

- LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.5, p.93-109.
- LOUATI, H.; ZOUARI, N.; MILED, N.; GARGOURI, Y. (2011). A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scorpio maurus*: purification and biochemical characterization. *Lipids in Health and Disease*. Vol.10, p.121.
- LU, L., QI, Z., Wu, W. (2014). Cloning, Expression and Purification of Subunit H of Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase from *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.15, p15443-15455.
- MACEDO, M.L.R., KUBO, C.E.G., FREIRE, M.G.M., JUNIOR, R.T.A., PARRA, J.R.P. (2014). Entomocidal effects of beech apricot, *Labramia bojeri*, seed extract on a soybean pest, the velvetbean moth, *Anticarsia gemmatalis*, and its enzymatic activity. *Journal of Insect Science*. Vol.14, n.27, p.1-13.
- MALNIC, G. (2000) Cell biology of H<sup>+</sup> transport in epithelia. *ARBS Ann. Rev. Biomed. Sci.* p. 25-37.
- MAYER, M.P., BUKAU, B. (2005). Hsp 70 chaperons: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular. Life sciences*, Vol.62, p.670-684.
- MARCHLER-BAUE, R A., PANCHENKO, A.R., SHOEMAKER, B.A., THIESSEN, P.A., GEER, L.Y., BRYANT, S.H. (2002). CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, Vol.30(1), p.281-283.
- MARES-GUIA, M., ROGANA, E., AMORIN, A.F., MAGALHÃES-ROCHA, N.M. (1981). Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *J. Biol. Chem.* Vol.256.p.1661-1668.
- MENDONCA, E.G., OLIVEIRA, M.G.A, VISOTTO, L.E., GUEDES, R.N.C. (2012) Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hubner)) *J Pest Sci.* Vol.85.p.117–123.
- MIELE, S.A.B., GARAVAGLIA, M.J., BELAICH, M.N., GHIRINGHELLI, P.D. (2011). Baculovirus: Molecular Insights on Their Diversity and Conservation. *International Journal of Evolutionary Biology*. Vol.1, p456-471.
- MIZRAHI, T., HELLER, J., GOLDENBERG, S., ARAD, Z. (2010). Heat shock proteins and resistance to desiccation in congeneric land snails. *Cell Stress & Chaperones*, Vol.15, p.351–363.
- MONZO, C., HAOUZI, D., ROMAN, K., ASSO, S., DECHAUD, H., HAMAMAH, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, Vol.27(7), p.2160-2168.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A.M., KLIONSKY, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, Vol.451(7182), p.1069–75.

- MORALES, M., PLANELLÓ, R., MARTÍNEZ-PAZ, P., HERRERO, O., CORTÉS, E., MARTÍNEZ-GUITARTE, J.L, MORCILLO, G. (2011). Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, Vol.153, p.150-158.
- MOREIRA, L.F.; CAMPOS, W.G.; RIBEIRO, F.R.; GUEDES, R.N.C.; Oliveira, M.G.A. (2011). Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). *Crop Protection*. Vol.30, p.1285-1290.
- NAKASU, E.Y.T. (2008). Potenciais receptores de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) para toxinas cry de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS. 145p
- NESVIZHSKII, A.I., KELLER, A., KOLKER, E., ABERSOLD, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Vol.75(17), p.4646-4658.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. 2003. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed 3 edição.
- NISHIHARA, T., AKIFUSA, S., KOSEKI, T., KATO, S., MURO, M., HANADA, N. (1995). Specific inhibitors of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.212, p.255-262.
- NISSEN, P., HANSEN, J., BAN, N., MOORE, P.B., STEITZ, T.A. (2000). Functional Insights from the Structures of the Large Ribosomal Subunit and its Complexes with Ligands *Science*, Vol.289, p.920-930.
- NOHATTO, M.J.; HENNIGEN, F.J.; GARCIA, F.R.M. (2010). Avaliação de diferentes concentrações de Baculovirus anticarsia (AGMNPV) no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) em lavoura de soja. *Revista de ciências ambientais*. Vol.4, n.1, p.65-76.
- OLIVEIRA, M.G.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. *J. Biol. Chem.*268:26893-26903.
- OLIVEIRA, M.G.A.; 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*. Vol.140B, p.369-380.
- OPPERT, B.; ELPIDINA, N.; TOUTGES, M.; MAZUMDAR- LEIGHTON, S. (2010). Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol.5, p.280–287.

- PAGE, M.J.; Di CERA, E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol.65, p.1220-1236.
- PAPATHANASSIU, A.E., MACDONALD, N.J., BENCSURA, A., VU, H.A. (2006) F1F0-ATP synthase functions as a co-chaperone of Hsp90– substrate protein complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol.345, p.419–429.
- PAULILLO, L.C.M.S., LOPES, A.R., CRISTOFOLETTI, P.T., PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C. (2000). Changes in midgut endopeptidases activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidade) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. J. Econ. Entomol., Vol.93, p.892-896.
- PERONA, J.J.; CRAIK, C.S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. Protein Science. Vol.4, p.337-360.
- PETEK, M.; TURNSEK, N.; GASPARIC, M. B.; NOVAK, M.P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N., POPOVIC, T. , STRUKELJ, B. JONGSMA, M.A. (2012). Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. Vol.79, No. 3, p.153–181.
- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. (2006). Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol.86, p.23-29.
- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; PILON, F.M.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, J.A.; FAZOLLO, A. (2009). Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera:Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. Revista Ceres. Vol.56, p.744-748.
- PILON, F.M. (2012). Clonagem e expressão de serino-proteases de *Anticarsia gemmatilis* e caracterização cinético-enzimática de tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota intestinal. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 129p.
- PILON, F.M., VISOTTO, L.E., GUEDES, R.N.C., OLIVEIRA, M.G.A. (2013). Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. Journal of comparative physiology b. Vol.183.p.735-747.
- PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. (2006). *Anticarsia gemmatilis*/Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196).
- PRODROMOU, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation . Biochem. J, Vol.473, p.2439–2452.
- RAMOS, P.C., MATIAS, A.C., MARQUES, A.J. (2008). Química, Vol.109, p.31 – 39.

- RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol.62, p.597-635.
- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRET, A.J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. Vol.34,p.D270-272.
- REIS, D.T.C. (2009). Purificação e caracterização de proteases digestivas *tripsina-like* do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 106 p.
- RICHTER, K., BUCHNER, J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol*. Vol.188, p.281-290.
- RIGGS, D.L., COX, M.B., CHEUNG-FLYNN, J., PRAPAPANICH, V., CARRIGAN, P.E., SMITH, D.F. (2004). Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. Vol.39, p.279-295.
- SANDHU, S.S., SHARMA, A.K., BENIWAL, V., GOEL, G., BATRA, P., KUMAR, A., JAGLAN, S., SHARMA, A.K., MALHOTRA, S. (2012). Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism and regulation. *Journal of Pathogens*. Vol.2012.p.1-10.
- SANTORO, M.G. (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol*, Vol.59, p.55-63.
- SAUTIN, Y.Y., Lu, M., GLAUGLER, A., ZHANG, L., GLUCK, S.L. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H<sup>+</sup> - ATPase Assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, v.25, n.2, p.575-589.
- SAVIO, G.M., PINOTTI, E.B. (2008). Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. *Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF)*. Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral.
- SCHÄFFER, A.A., WOLF, Y.I., PONTING, C.P., KOONIN, E.V., ARAVIND, L., ALTSCHUL, S.F. (1999). IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics*, Vol.15(12), p.1000-1011.
- SCOTT, I. M.; THALER, J.S.; SCOTT, J.G. (2010). Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato *J Chem Ecol*. Vol.36, p.490–499.
- SENTHIL-NATHAN, S., KALAIIVANI, K., and CHUNG, P. (2005a). The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab.(Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol.83, p.46–57.

- SENTHIL-NATHAN, S., KALAIVANI, K., MURUGAN, K., and CHUNG, P. G. (2005b). The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. *Pestic. Biochem. Physiol.* Vol.81, p.113–122.
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry.* Vol.68,p.850-858.
- SHEVCHENKO, A., THOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols.* Vol.1,n.6,p.2856-60.
- SILVA-FIALHO, M.C.; FALCO, M.C. (2000). Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento.* Vol.12, p.38-42.
- SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L. P. PIOVESAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A. (2002). Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico.* Vol.69, p.67-74.
- SILVA, F.W.S., VIOL, D.L., FARIA, S.V., LIMA E., VALICENTE F.H., ELLIOT, S.L. (2013). Two's a crowd: Phenotypic adjustments and prophylaxis in *Anticarsia gemmatalis* larvae are triggered by the presence of conspecifics. *PLOS ONE.* Vol.8.n4:e61582.
- SILVA, F.W.S. & ELLIOT, S.L. (2016). Temperature and population density: interactional effects of environmental factors on phenotypic plasticity, immune defenses, and disease resistance in an insect pest. *Ecology and evolution.* Vol.6.n11,p.3672-3683
- SØRENSEN, J.G., KRISTENSEN, G.T.N., LOESCHCKE, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters,* Vol.6, p.1025–1037.
- SOSA-GOMEZ, D.R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera:Noctuidae). *Genetics and molecular biology.* Vol.27.n.3.p.378-384.
- SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. (2006). Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters.* Vol.11, p.132-154.
- SUN, Y., ZHAO, J., SHENG, Y., XIAO, Y.F., ZHANG, Y.J., BAI, L.X., TAN, Y., XIAO, L.B., XU, G.C. (2016). Identification of heat shock cognate protein 70 gene (Alhsc70) of *Apolygus lucorum* and its expression in response to different temperature and pesticide stresses. *Insect Sci.,* Vol.23(1), p.37-49.
- SZKLARCZYK, D., FRANCESCHINI, A., WYDER, S., FORSLUND, K., HELLER, D., HUERTER-CEPAS, J., SIMONOVIC, M., ROTH, A., SANTOS, A., TSAFOU, K.P., KUHN, M., BORK, P., JENSEN, L.J., MERING, C.V. (2014). STRING v10: protein-

protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, Vol.43, p.D447-52.

TATUSOV, R.L., FEDOROVA, N.D., JACKSON, J.D., JACOBS, A.R., KIRYUTIN, B., KOONIN, E.V., KRYLOV, D.M., MAZUMDER, R., MEKHEDOV, S.L., NIKOLSKAYA, A.N., RAO, B.S., SMIRNOV, S., SVERDLOV, A.V., VASUDEVAN, S., WOLF, Y.I., YIN, J.J., NATALE, D.A. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, Vol.4,p.1-14.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (1994). Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.109B, p.1-62.

TERRA, W.; FERREIRA, C. & BAKER, J.E. (1996). Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p.206-235.

TIROLI-CEPEDA AO, RAMOS CH. (2011). An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Pept Lett*, Vol.18, p.101–9.

TIROLI-CEPEDA, A.O., LIMA, T.B., BALBUENA, T.S., GOZZO, F.C., RAMOS, C.H.I. (2014). Structural and functional characterization of the chaperone Hsp70 from sugarcane. Insights into conformational changes during cycling from cross-linking/mass spectrometry assays. *Journal of Proteomics*, Vol.104, p.48 – 56.

VASUDHA, B.C., APARNA, H.S., MANJUNATHA, H.B. (2006). Impact of heat shock on heat shock proteins expression, biological and commercial traits of *Bombyx mori*. *Insect Science*. Vol.13,p.243-250.

VIANNA, U.R.; PRATISSOLI, D.; ZANUNCIO, J.C.; ALENCAR, J.R.C.C. DE; ZINGER, F.D. (2011). Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (hymenoptera: trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (lepidoptera: noctuidae), *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. Vol.78, n.1, p.81-87.

VISÓTTO, L.E.; OLIVEIRA, M.G.A.; RIBON, A.O.B.; MARES-GUIA, T.R.; GUEDES, R.N.C. (2009). Characterization and Identification of Proteolytic Bacteria From the Gut of the Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Entomology Ecology*. Vol.38, n.4, p.1078-1085.

WANG, L., YANG, S., ZHAO, K., HAN, L. (2015). Expression profiles of the heat shock protein 70 gene in response to heat stress in *Agrotis c-nigrum*. *Journal of Insect Science*. Vol.15,n.9.p1-6.

WANG, H.S., WANG, X.H., ZHOU, C.S., HUANG, L.H., ZHANG, S.F., GUO, W., KANG, L. (2007). cDNA cloning of heat shock proteins and their expression in the two phases of the migratory locust. *Insect Molecular Biology*, Vol.16, p.207-219.

WIECZOREK, H., BEYENBACH, K.W., HUSS, M., VITAVSKA, O. (2009). Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *J. Exp. Biol*, Vol.212(6), p.1611–1619.

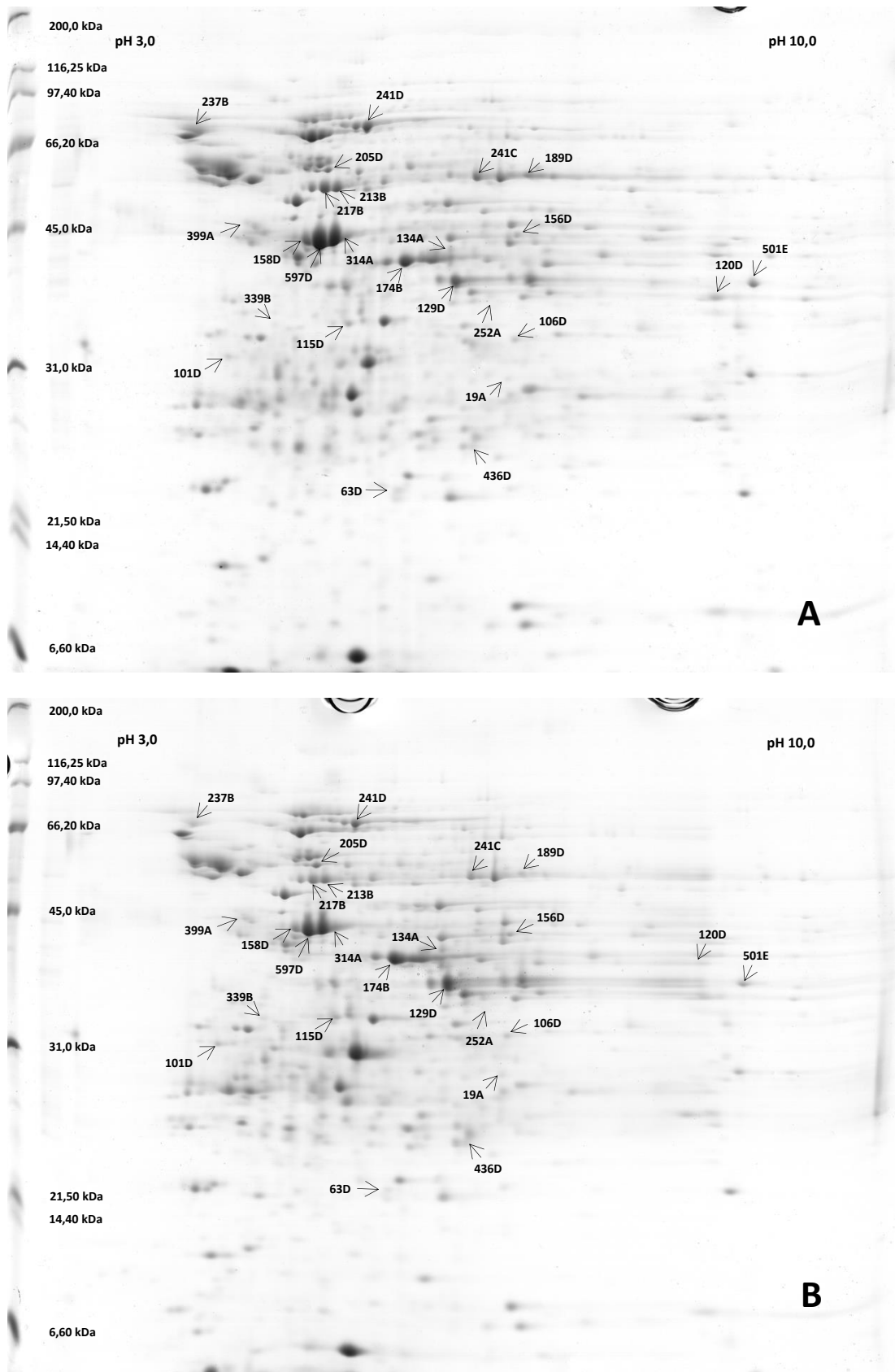
- WIECZOREK, H. MARKUS, H. HANS, M., STEPHAN, R., OLGA, V., WOLFGANG, Z. (2003). The insect plasma membrane H<sup>+</sup> V-ATPase: Intra-, inter-, and supramolecular aspects. *J. Bioenerg. Biomembr.*, Vol.35, p.359–366.
- WIECZOREK, H., GRUBER, G., HARVEY, W.R., HUSS, M. (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H<sup>+</sup> V-ATPase. *J. Exp. Biol.*, Vol.203, p.127–135.
- WIECZOREK, H., GRÜBER, G., HARVEY, W.R., HUSS, M., MERZENDORFER, H. (1999). The plasma membrane H<sup>+</sup>-V-ATPase from tobacco hornworm midgut. *J Bioenerg Biomembr.*, Vol.31(1), p.67–74.
- WUNSCH, H.; BALDWIN, I.T.; WU, J.S. (2011). Nitrosogluthathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata* *Journal of Experimental Botany*. Vol.62, No.13, p.4605–4616.
- YAO, P., CHEN, X., YAN, Y., LIU, F., ZHANG, Y., GUO, X. (2014). Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.68, p.335-346.
- YOUNG, J.C., MOAREFI, I., HARTL, F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool *J. Cell Biol.*, Vol.154, p.267–273.
- YOUNG, J.C., AGASHE, V.R., SIEGERS, K., HARTL, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol.5, p.781-791.
- YOUNG J.C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol.*, Vol.88, p.291–300.
- ZHAN, O.; ZHENG, S.; FENG, O.; LIU, L. (2011). A midgut-specific Chymotrypsin cDNA (slc1p1) from *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, localization and expression analysis, *ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY*. Vol.76, No. 3, p.130–143.
- ZHANG, C.; ZHOU, D.; ZHENG, S.; LIN, L.; TAO, S.; YANG, L.; HU, S.; FENG, Q. (2010). A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. *Journal of Insect Physiology*. Vol.56, p.788–799.
- ZHANG, Q.R., DENLINGER, D.L. (2010). Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of Insect Physiology*, Vol.56, p.138-150.
- ZHAO, L.; JONES, W.A. (2012). Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal*, Vol.9, p.93-101.

ZHU-SALZMAN, K., KOIWA, H., SALZMAN, R.A., SHADES, R.E., AHN, J.E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome the plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.*, Vol.12(2), p.135-145.

**Anexo 1.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com berenil nas 6 e 12 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume $\pm$ DP Berenil em 6h    Berenil em 12h		Abundance Fold
<b>217B</b>	53	5,05	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	8%	3	1,060 $\pm$ 0,106	0,684 $\pm$ 0,059	<1,55048
<b>213B</b>	53	5,05	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	19%	7	0,882 $\pm$ 0,083	0,666 $\pm$ 0,031	>1,324
<b>436D</b>	24,5	6,36	A0A023F937	ATP synthase subunit alpha	59733	8,95	2%	1	0,097 $\pm$ 0,019	0,230 $\pm$ 0,049	>2,36779
<b>237B</b>	70,8	4,01	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	72024	4,58	1%	1	0,812 $\pm$ 0,090	0,303 $\pm$ 0,100	<2,67609
<b>241C</b>	54	6,39	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,672 $\pm$ 0,113	0,403 $\pm$ 0,053	<1,66579
<b>189D</b>	54,5	7,04	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,284 $\pm$ 0,004	0,134 $\pm$ 0,026	<2,11295
<b>106D</b>	32,4	7,08	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	32951	5,43	4%	2	0,141 $\pm$ 0,019	0,068 $\pm$ 0,012	<2,07942
<b>115D</b>	33,8	5,25	A0A067RJD6	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	43907	8,09	4%	1	0,188 $\pm$ 0,045	0,277 $\pm$ 0,029	>1,47445
<b>120D</b>	35,9	8,45	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35579	7,70	8%	2	0,314 $\pm$ 0,021	0,223 $\pm$ 0,024	<1,40756
<b>501E</b>	37,6	8,78	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogen	35964	8,33	3%	1	0,255 $\pm$ 0,155	0,187 $\pm$ 0,027	<1,39531
<b>19A</b>	29,3	6,67	K7W491	Phosphoglycerate mutase	28691	5,76	9%	2	0,047 $\pm$ 0,011	0,089 $\pm$ 0,020	<1,88393
<b>174B</b>	39,9	5,75	A0A1D8RC41	Arginine kinase (Fragment) ArgKin	15256	7,14	12%	1	1,641 $\pm$ 0,221	2,381 $\pm$ 0,369	>1,45124
<b>241D</b>	71,4	5,32	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	74115	5,45	6%	3	0,380 $\pm$ 0,025	0,270 $\pm$ 0,030	<1,40826

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Berenil em 6h    Berenil em 12h		Abundance Fold
<b>156D</b>	42,4	6,73	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein hsc70	74115	5,45	1%	1	0,147 ± 0,008	0,192 ± 0,012	>1,30199
			A0A182GCU6	Uncharacterized protein	69692	5,74	3%	1			
<b>399A</b>	45,7	4,41	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,066 ± 0,020	0,020 ± 0,007	>3,28858
<b>101D</b>	31,5	4,24	A0A023ENU3	Putative multifunctional chaperone	29571	4,70	4%	1	0,100 ± 0,018	0,134 ± 0,008	>1,34316
<b>314A</b>	43,3	5,13	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	7%	2	3,650 ± 0,482	2,598 ± 0,330	<1,40508
<b>597D</b>	44,1	4,8	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	10%	3	0,290 ± 0,065	0,089 ± 0,033	<3,25956
<b>158D</b>	43,6	4,9	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	18%	5	0,717 ± 0,078	0,431 ± 0,121	<1,66402
<b>63D</b>	21,6	5,69	A0A088MG62	Glutathione peroxidase POX-A	22415	8,5	6%	1	0,145 ± 0,007	0,093 ± 0,006	<1,55349
			A0A088MGF5	POX-C	22124	6,3	7%	1			
<b>252A</b>	32	6,27	E1CGB6	Translation elongation factor 2 eEF2 (Fragment)	41999	5,69	8%	2	0,147 ± 0,007	0,296 ± 0,002	> 2,00597
<b>205D</b>	57,3	5,08	G6CPN3	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	55101	5,36	2%	1	0,278 ± 0,023	0,340 ± 0,004	>1,22356
<b>339B</b>	35,1	4,62	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	8693	4,44	16%	1	0,031 ± 0,008	0,053 ± 0,011	>1,72893
<b>134A</b>	41,3	6,15	A0A182MUP3	Uncharacterized protein	46657	4,90	3%	1	0,139 ± 0,008	0,193 ± 0,017	>1,39276
<b>129D</b>	37,6	6,2	A0A1B3PEI2	Arylporin (Fragment)	82011	5,49	2%	1	1,522 ± 0,305	2,347 ± 0,204	>1,54269



**Anexo 2.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 12 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

**Anexo 3.** Lista das proteínas identificadas em intestino de *Anticarsia gemmatalis* nas condições de tratamentos com o inibidor berenil e o inibidor de soja Kunitz, nas diferentes horas, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.

Uniprot ID	% identity	KOG Description	KOG Class	Class Description	Group
A0A023ES50	81.38	Actin and related proteins	Z	Cytoskeleton	Cellular processes and signaling
A0A0N0PA48	42.25	Galectin: galactose-binding lectin	W	Extracellular structures	Cellular processes and signaling
A0A023ENU3	79.76	Multifunctional chaperone (14-3-3 family)	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
G6CPN3	43.96	Protein disulfide isomerase (prolyl 4-hydroxylase beta subunit)	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A0K0KJ78	73.31	Mitochondrial chaperonin: Cpn60/Hsp60p	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A075X2J6	44.95	Glutathione S-transferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A088MG62	57.06	Glutathione peroxidase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A088MGF5	73.85	Alkyl hydroperoxide reductase: thiol specific antioxidant and related enzymes	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A182GCU6	60.00	Molecular chaperones GRP78/BiP/KAR2: HSP70 superfamily	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling

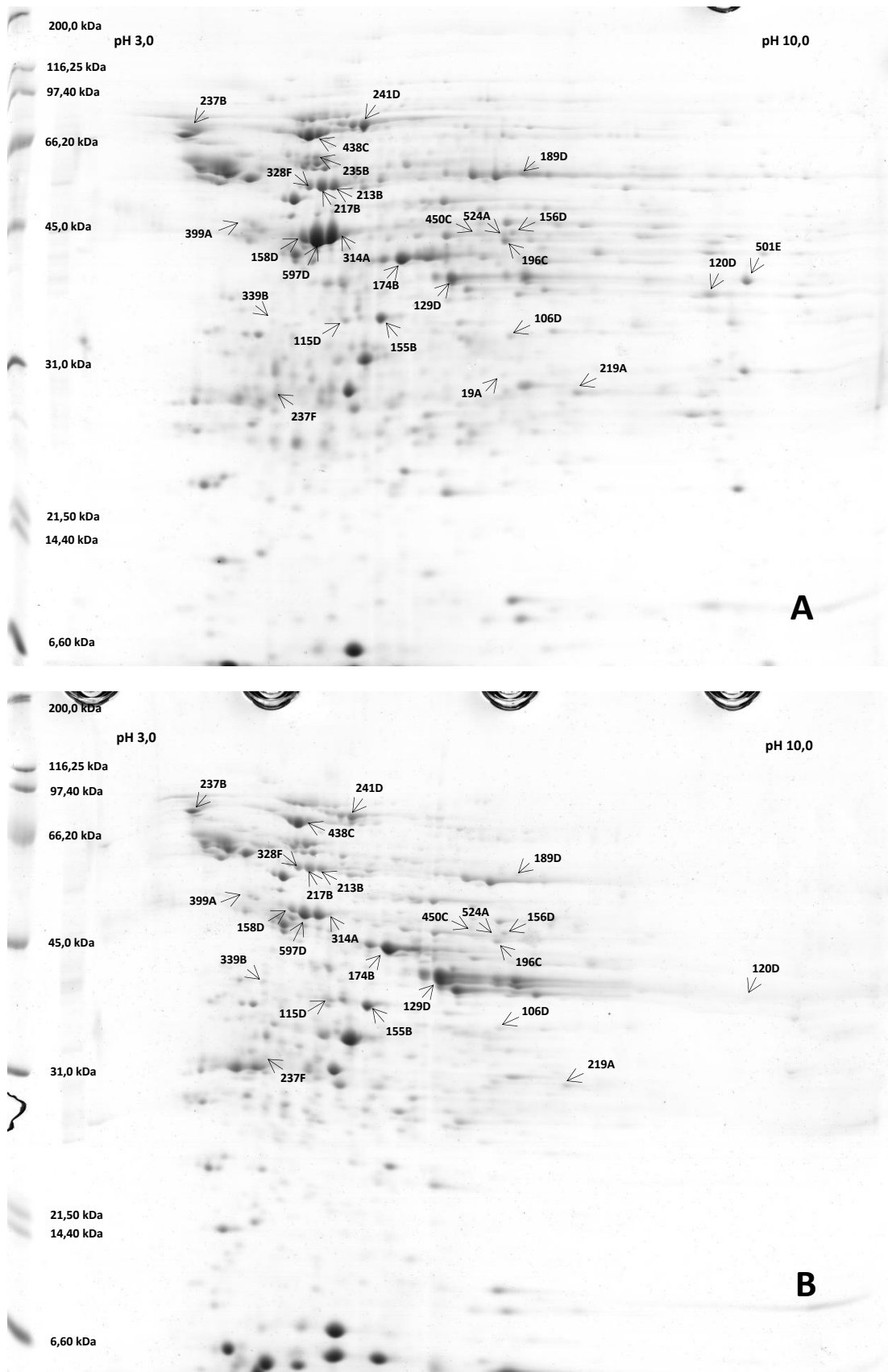
<b>Uniprot ID</b>	<b>% identity</b>	<b>KOG Description</b>	<b>KOG Class</b>	<b>Class Description</b>	<b>Group</b>
A0A0A7HBC8	82.82	Molecular chaperones HSP70/HSC70: HSP70 superfamily	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
A0A023F9K3	51.09	Molecular chaperone (HSP90 family)	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
E1CGB6	83.56	Elongation factor 2	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	Information storage and processing
A0A023ER31	51.23	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase: superfamily D-isomer-specific 2-hydroxy acid dehydrogenase	E	Amino acid transport and metabolism	Metabolism
A0A0L7KY52	38.80	Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic transaminase AAT2/GOT1	E	Amino acid transport and metabolism	Metabolism
K7W491	49.36	Phosphoglycerate mutase	G	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
A0A059XPP2	64.69	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	G	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
A0A194PU18	38.22	Beta-glucosidase: lactase phlorizinhydrolase: and related proteins	G	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
G6CX99	25.50	Maltase glucoamylase and related hydrolases: glycosyl hydrolase family 31	G	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
A0A0B5EDK8	40.96	Beta-glucosidase: lactase phlorizinhydrolase: and related proteins	G	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
A0A067RJD6	68.04	Pyruvate dehydrogenase E1: beta subunit	C	Energy production and conversion	Metabolism

<b>Uniprot ID</b>	<b>% identity</b>	<b>KOG Description</b>	<b>KOG Class</b>	<b>Class Description</b>	<b>Group</b>
A0A023F937	63.72	F0F1-type ATP synthase: alpha subunit	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A1D8RC41	63.16	Creatine kinases	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A023ETB9	90.13	F0F1-type ATP synthase: beta subunit	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A0R6XDG1	82.49	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V1 sector: subunit A	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A0N1ICB7	62.59	Aldehyde dehydrogenase	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A0U1XFD8	87.97	Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase V1 sector: subunit B	C	Energy production and conversion	Metabolism
A0A0N1I833	42.52	Ca <sup>2+</sup> -binding protein Regucalcin/SMP30	P	Inorganic ion transport and metabolism	Metabolism
A0A194QDY8	57.83	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	Metabolism
A0A068FKE8	52.17	Enoyl-CoA hydratase	I	Lipid transport and metabolism	Metabolism
A0A194PYN6	27.01	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	Metabolism
A0A194PJH0	50.27	Phosphatidylethanolamine binding protein	R	General function prediction only	Poorly characterized

**Anexo 4.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com berenil nas 6 e 24 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Berenil em 6h	Berenil em 24h	Abundance Fold
<b>438C</b>	72,3	4,94	A0A0R6XDG1	V-ATPase subunit A	68453	5,17	7%	3	0,717 ± 0,131	0,253 ± 0,023	<2,76794
<b>328F</b>	56,5	4,85	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	17%	7	0,421 ± 0,030	0,300 ± 0,058	<1,37752
<b>217B</b>	56,5	4,96	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	8%	3	1,060 ± 0,106	0,612 ± 0,071	<1,69409
<b>213B</b>	56,5	5,06	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	19%	7	0,882 ± 0,083	0,400 ± 0,063	<2,15342
<b>237B</b>	78,3	3,92	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	72024	4,58	1%	1	0,812 ± 0,090	0,428 ± 0,096	<1,85527
<b>524A</b>	45,4	6,56	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Fragment)	39767	8,89	4%	1	0,122 ± 0,024	0,068 ± 0,023	<1,75397
<b>196C</b>	44,1	6,57	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Fragment)	39767	8,89	4%	1	0,243 ± 0,025	0,151 ± 0,024	<1,57286
<b>189D</b>	56	6,97	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,284 ± 0,004	0,128 ± 0,084	<2,16909
<b>106D</b>	34,1	6,99	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	32951	5,43	4%	2	0,141 ± 0,019	0,068 ± 0,007	<2,02636
<b>115D</b>	36,6	5,14	A0A067RJD6	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	43907	8,09	4%	1	0,188 ± 0,045	0,277 ± 0,024	>1,50939
<b>120D</b>	38,1	8,37	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35579	7,70	8%	2	0,314 ± 0,021	0,051 ± 0,000	<5,96882
<b>501E</b>	37,3	8,8	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogenase	35964	8,33	3%	1	0,255 ± 0,155	0,000 ± 0,000	-
<b>19A</b>	31	6,57	K7W491	Phosphoglycerate mutase	28691	5,76	9%	2	0,047 ± 0,011	0,034 ± 0,000	<4,07359

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Berenil em 6h    Berenil em 24h		Abundance Fold
<b>174B</b>	42,6	5,64	A0A1D8RC41	Arginine kinase (Fragment) ArgKin	15256	7,14	12%	1	1,641 ± 0,221	2,201 ± 0,258	>1,37114
<b>219A</b>	29,1	7,21	A0A068FKE8	Enoyl-CoA hydratase	32002	8,87	6%	1	0,211 ± 0,034	0,115 ± 0,009	<1,79563
<b>155B</b>	36,3	5,45	A0A0N1I833	Regucalcin	50702	5,77	3%	1	0,704 ± 0,030	0,886 ± 0,043	>1,28642
<b>450C</b>	46,3	6,35	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	8%	4	0,068 ± 0,014	0,144 ± 0,025	>2,15548
<b>237F</b>	31,1	4,39	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	2%	1	0,097 ± 0,062	0,179 ± 0,020	>1,55684
<b>241D</b>	76,3	5,23	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	74115	5,45	6%	3	0,380 ± 0,025	0,251 ± 0,014	<1,47743
<b>156D</b>	45,4	6,64	A0A0A7HBC8 A0A182GCU6	Heat shock cognate 70 protein hsc70 Uncharacterized protein	74115 69692	5,45 5,74	1% 3%	1 1	0,147 ± 0,008	0,109 ± 0,010	<1,31673
<b>399A</b>	51	4,32	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,066 ± 0,020	0,020 ± 0,015	>3,2098
<b>235B</b>	62	5	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	60833	5,60	3%	1	0,192 ± 0,100	0,000 ± 0,000	-
<b>314A</b>	46,5	5,03	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	7%	2	3,650 ± 0,482	1,062 ± 0,207	<3,35944
<b>597D</b>	48,1	4,7	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	10%	3	0,290 ± 0,065	0,097 ± 0,058	<2,91272
<b>158D</b>	47,1	4,8	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	18%	5	0,717 ± 0,078	0,250 ± 0,019	<2,80602
<b>339B</b>	38,1	4,53	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	8693	4,44	16%	1	0,031 ± 0,008	0,065 ± 0,008	>2,15124
<b>129D</b>	39,8	6,1	A0A1B3PEI2	Arylporin (Fragment)	82011	5,49	2%	1	1,522 ± 0,305	4,692 ± 0,702	>3,15162

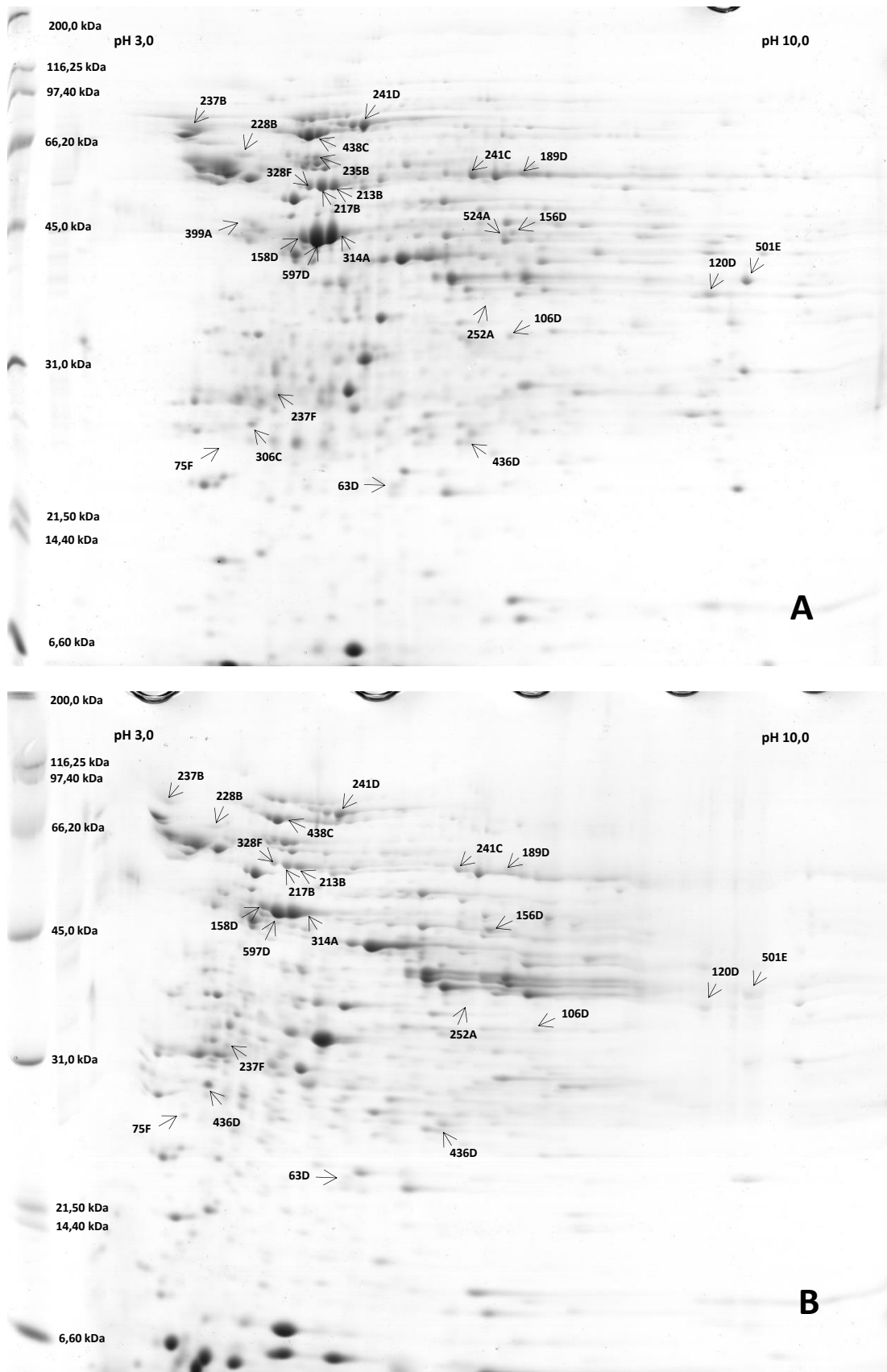


**Anexo 5.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 24 h. As setas indicam os spots diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

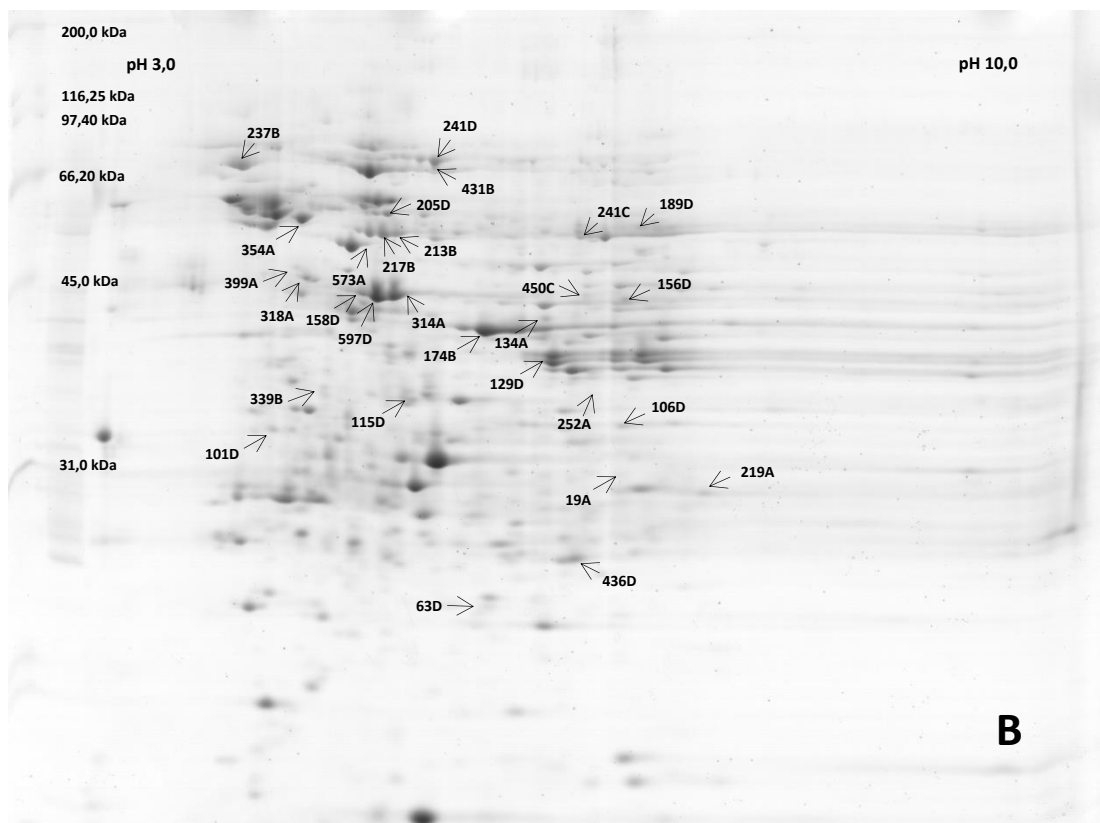
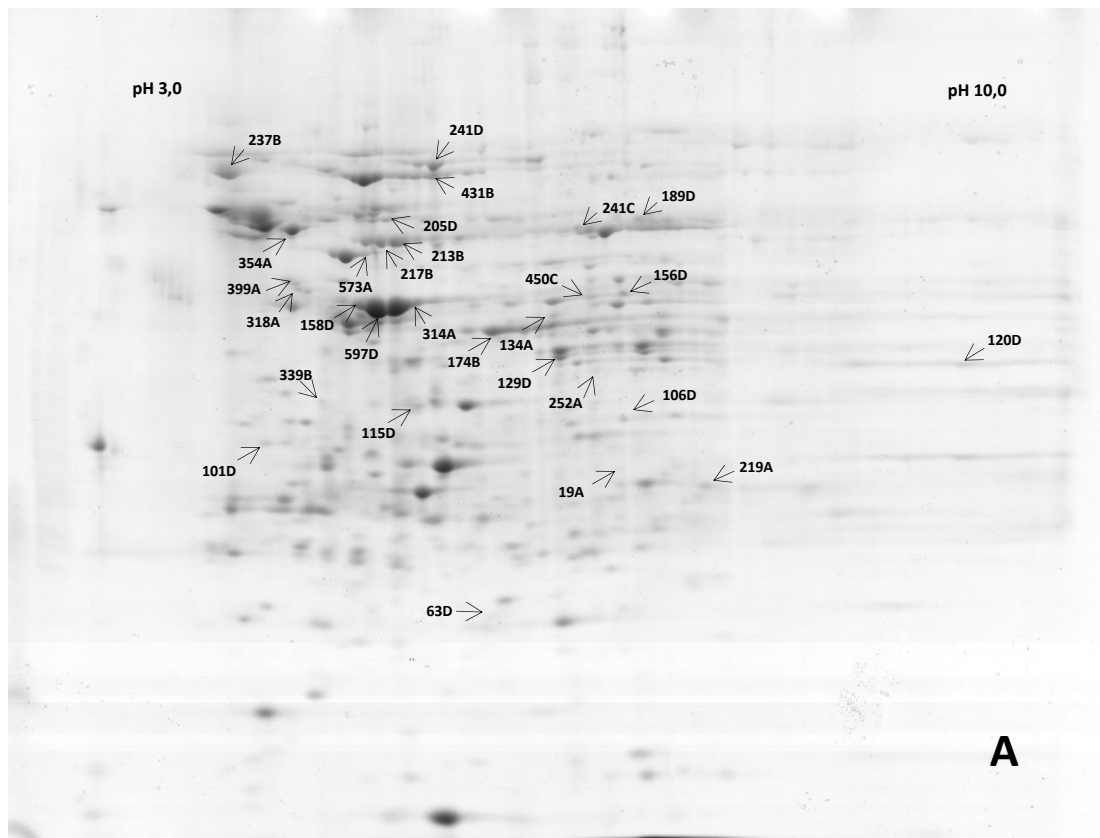
**Anexo 6.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com berenil nas 6 e 48 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume $\pm$ DP		Abundance Fold
									Berenil em 6h	Berenil em 48h	
<b>438C</b>	69,7	4,99	A0A0R6XDG1	V-ATPase subunit A	68453	5,17	7%	3	0,717 $\pm$ 0,131	0,403 $\pm$ 0,022	<1,76799
<b>328F</b>	55	4,89	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	17%	7	0,421 $\pm$ 0,030	0,185 $\pm$ 0,060	<2,2728
<b>217B</b>	54,7	4,99	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	8%	3	1,060 $\pm$ 0,106	0,448 $\pm$ 0,139	<2,35288
<b>213B</b>	55	5,1	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	19%	7	0,882 $\pm$ 0,083	0,506 $\pm$ 0,056	<1,73228
<b>436D</b>	25	6,32	A0A023F937	ATP synthase subunit alpha	59733	8,95	2%	1	0,097 $\pm$ 0,019	0,160 $\pm$ 0,015	>1,66135
<b>237B</b>	74,5	3,94	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	72024	4,58	1%	1	0,812 $\pm$ 0,090	0,348 $\pm$ 0,096	<2,31974
<b>524A</b>	43,6	6,63	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Fragment)	39767	8,89	4%	1	0,122 $\pm$ 0,024	0,000 $\pm$ 0,000	-
<b>241C</b>	55,5	6,36	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,672 $\pm$ 0,113	0,171 $\pm$ 0,013	<3,89382
<b>189D</b>	55	7,02	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,284 $\pm$ 0,004	0,243 $\pm$ 0,021	<1,16596
<b>106D</b>	33	7,04	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	32951	5,43	4%	2	0,141 $\pm$ 0,019	0,091 $\pm$ 0,015	<1,5482
<b>120D</b>	36,1	8,42	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35579	7,70	8%	2	0,314 $\pm$ 0,021	0,164 $\pm$ 0,017	<1,90313
<b>501E</b>	37,3	8,78	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogen	35964	8,33	3%	1	0,255 $\pm$ 0,155	0,203 $\pm$ 0,012	<1,27873
<b>228B</b>	63,5	4,35	A0A194PU18	Myrosinase 1	64966	4,82	2%	1	0,245 $\pm$ 0,022	0,104 $\pm$ 0,020	<2,34798

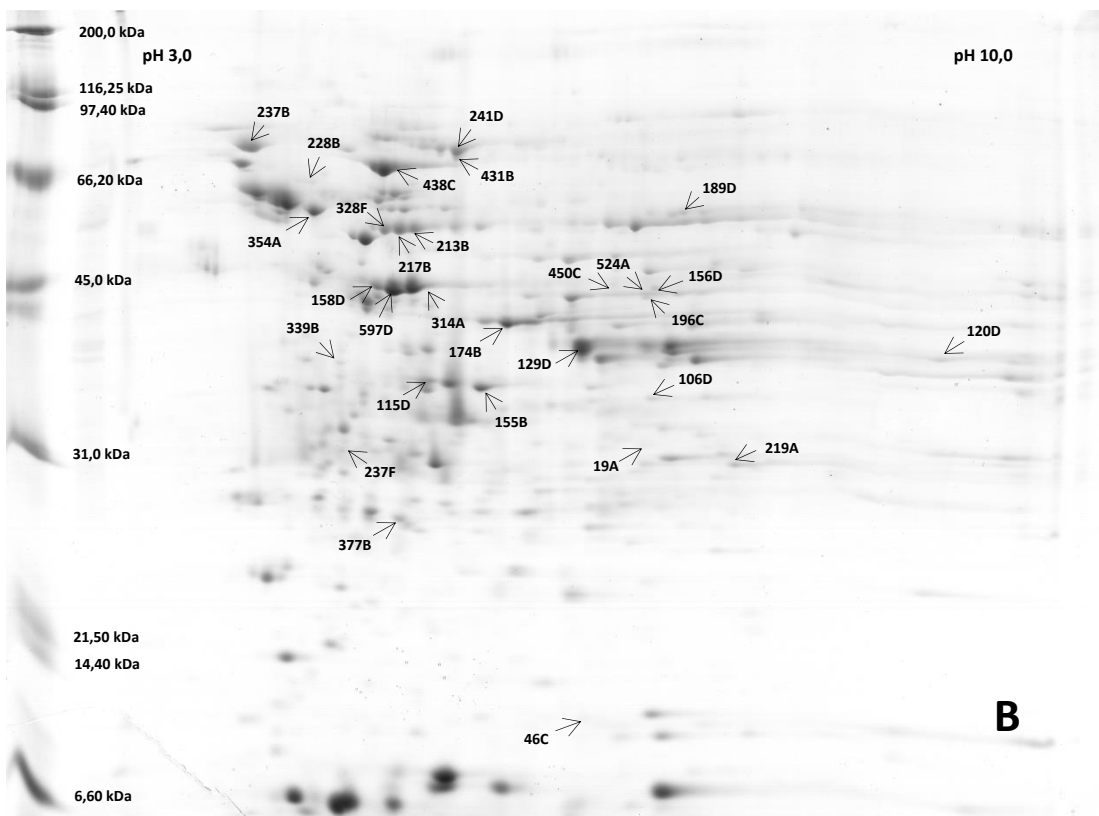
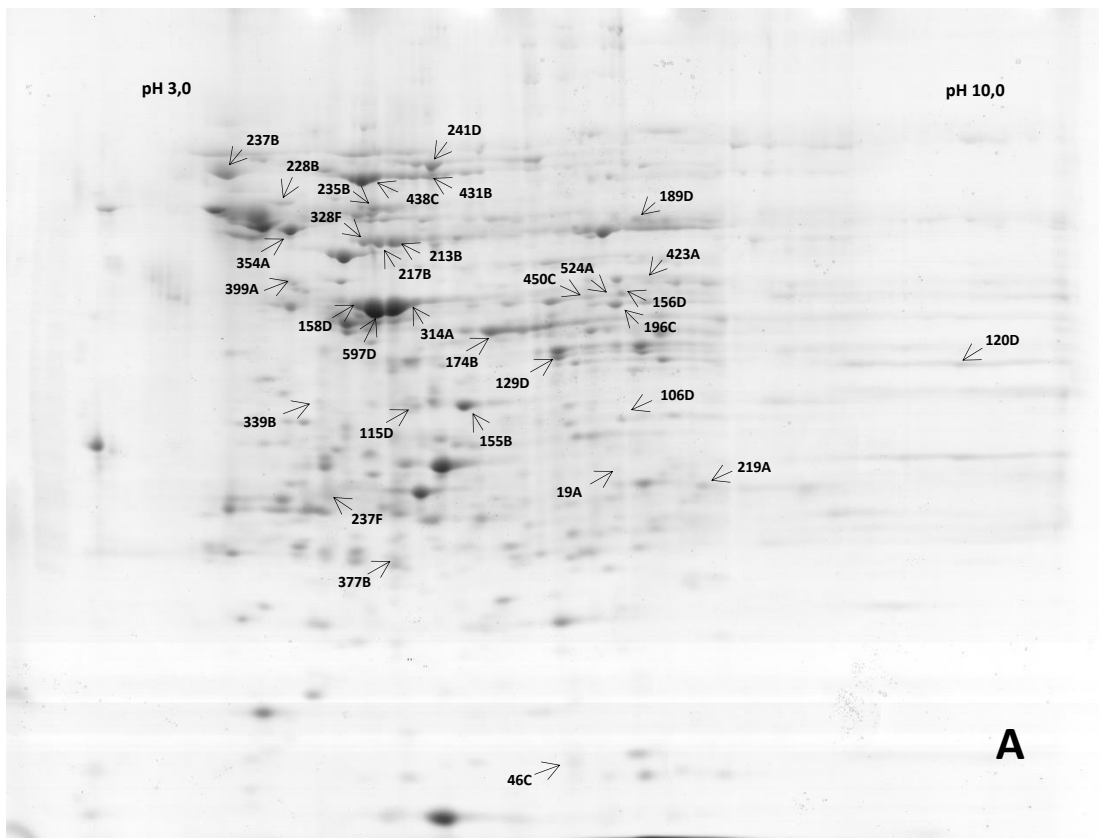
Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Berenil em 6h    Berenil em 48h		Abundance Fold
<b>237F</b>	30	4,4	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	2%	1	0,097 ± 0,062	0,256 ± 0,024	>2,62846
<b>241D</b>	73,5	5,28	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	74115	5,45	6%	3	0,380 ± 0,025	0,152 ± 0,007	<2,485
<b>156D</b>	44,3	6,67	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein hsc70	74115	5,45	1%	1	0,147 ± 0,008	0,249 ± 0,048	>1,69219
			A0A182GCU6	Uncharacterized protein	69692	5,74	3%	1			
<b>399A</b>	47	4,39	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,066 ± 0,020	0,000 ± 0,000	-
<b>235B</b>	62	5	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	60833	5,60	3%	1	0,192 ± 0,100	0,000 ± 0,000	-
<b>314A</b>	45	5,06	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	7%	2	3,650 ± 0,482	1,835 ± 0,124	<1,9792
<b>597D</b>	45,9	4,71	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	10%	3	0,290 ± 0,065	0,072 ± 0,017	<3,98403
<b>158D</b>	45,3	4,82	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	18%	5	0,717 ± 0,078	0,390 ± 0,066	<1,82985
<b>63D</b>	22	5,76	A0A088MG62	Glutathione peroxidase POX-A	22415	8,5	6%	1	0,145 ± 0,007	0,055 ± 0,007	<2,61909
			A0A088MGF5	POX-C	22124	6,3	7%	1			
<b>252A</b>	34,5	6,2	E1CGB6	Translation elongation factor 2 eEF2 (Fragment)	41999	5,69	8%	2	0,147 ± 0,007	0,198 ± 0,016	>1,34745
<b>306C</b>	26,9	4,36	A0A194PJH0	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3	20231	5,13	7%	1	0,198 ± 0,020	0,336 ± 0,052	>1,83199
<b>75F</b>	25	4,14	A0A194PJH0	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3	20231	5,13	7%	1	0,023 ± 0,004	0,065 ± 0,017	>2,78963



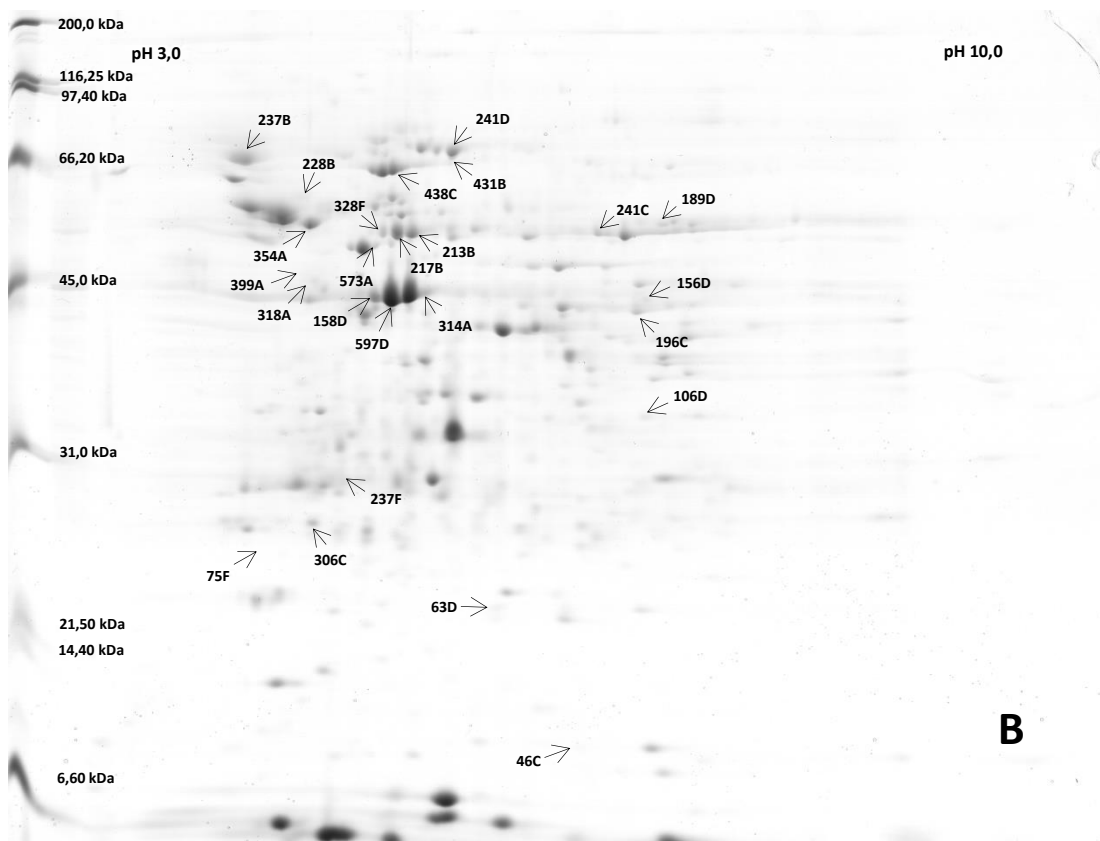
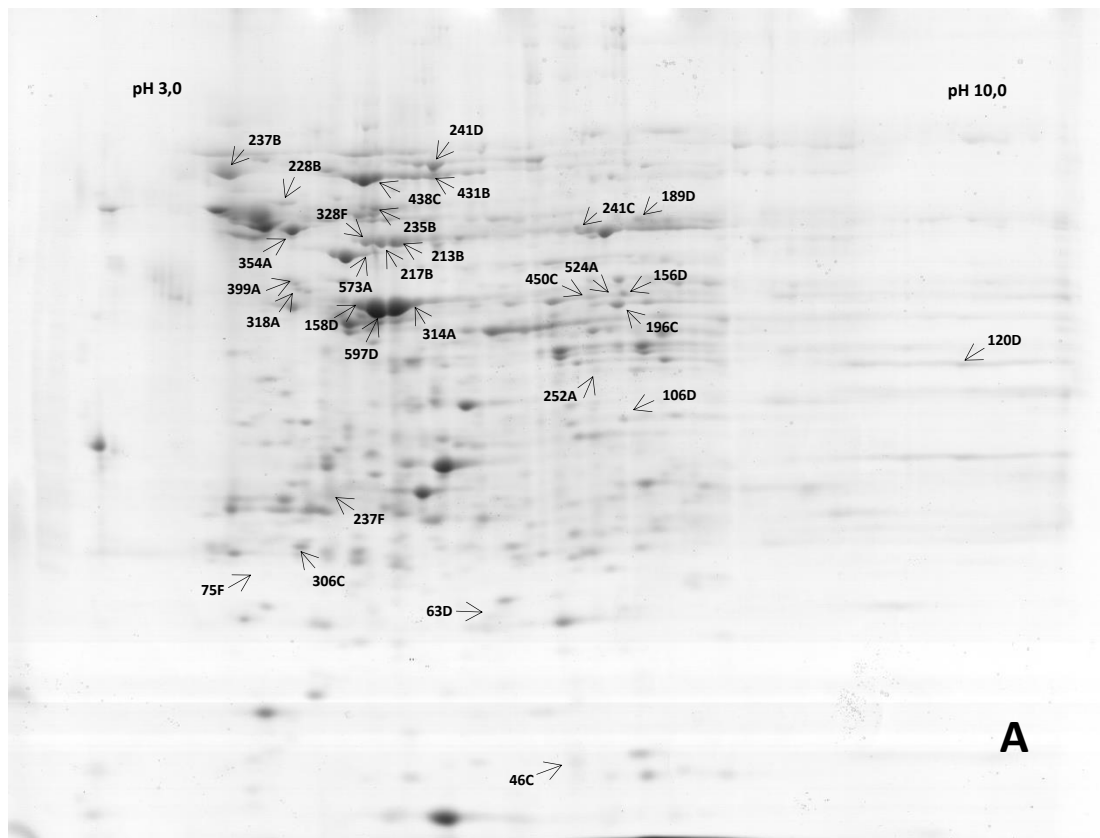
**Anexo 7.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores berenil em 6 h de tratamento. (B) com 48 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.



**Anexo 8.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 12 h. As setas indicam o os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.



**Anexo 9.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 24 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.



**Anexo 10.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta sem a presença de inibidores em 6 h do controle. (B) com 48 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

**Anexo 11.** Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos controles, nas 6 e 12 horas.

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 12h
<b>436D</b>	A0A023F937	ATP synthase subunit alpha	0,000 ± 0,000	0,491 ± 0,048
<b>573A</b>	A0A023ETB9	ATP synthase subunit beta	0,141 ± 0,019	0,055 ± 0,001
<b>217B</b>	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,631 ± 0,106	0,612 ± 0,058
<b>213B</b>	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,902 ± 0,079	0,550 ± 0,033
<b>174B</b>	A0A1D8RC41	Arginine kinase (Fragment) ArgKin	0,114 ± 0,232	0,161 ± 0,359
<b>237B</b>	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	1,383 ± 0,091	0,849 ± 0,100
<b>354A</b>	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	0,095 ± 0,125	0,736 ± 0,043
<b>19A</b>	K7W491	Phosphoglycerate mutase	0,049 ± 0,012	0,050 ± 0,021
<b>241C</b>	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	0,728 ± 0,114	0,131 ± 0,055
<b>189D</b>	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	0,212 ± 0,004	0,138 ± 0,027
<b>115D</b>	A0A067RJD6	Pyruvate dehydrogenase	0,201 ± 0,046	0,152 ± 0,039
<b>106D</b>	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,112 ± 0,019	0,137 ± 0,013
<b>219A</b>	A0A068FKE8	Enoyl-CoA hydratase	0,186 ± 0,022	0,262 ± 0,053
<b>120D</b>	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,128 ± 0,022	0,000 ± 0,000
<b>501E</b>	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogen	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 12h
<b>241D</b>	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	0,324 ± 0,027	0,154 ± 0,038
<b>156D</b>	A0A0A7HBC8 A0A182GCU6	Heat shock cognate 70 protein hsc70 Uncharacterized protein	0,134 ± 0,007	0,176 ± 0,014
<b>431B</b>	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,114 ± 0,001	0,078 ± 0,001
<b>450C</b>	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,098 ± 0,005	0,056 ± 0,017
<b>318A</b>	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	0,135 ± 0,008	0,032 ± 0,012
<b>399A</b>	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	0,129 ± 0,022	0,061 ± 0,009
<b>101D</b>	A0A023ENU3	Putative multifunctional chaperone	0,105 ± 0,021	0,106 ± 0,009
<b>314A</b>	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,300 ± 0,472	0,163 ± 0,321
<b>597D</b>	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,147 ± 0,057	0,111 ± 0,033
<b>158D</b>	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,564 ± 0,078	0,246 ± 0,125
<b>63D</b>	A0A088MG62 A0A088MGF5	Glutathione peroxidase POX-A POX-C	0,091 ± 0,009	0,098 ± 0,008
<b>252A</b>	E1CGB6	Translation elongation factor 2 eEF2 (Fragment)	0,136 ± 0,008	0,167 ± 0,002
<b>129D</b>	A0A1B3PEI2	Arylporin (Fragment)	0,116 ± 0,303	0,209 ± 0,208
<b>205D</b>	G6CPN3	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	0,210 ± 0,025	0,161 ± 0,002
<b>339B</b>	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	0,409 ± 0,008	0,076 ± 0,011
<b>134A</b>	A0A182MUP3	Uncharacterized protein	0,222 ± 0,009	0,146 ± 0,019

**Anexo 12.** Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos controles, nas 6 e 24 horas.

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 24h
438C	A0A0R6XDG1	V-ATPase subunit A	0,587 ± 0,135	0,470 ± 0,027
328F	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,373 ± 0,020	0,497 ± 0,052
217B	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,631 ± 0,102	0,819 ± 0,078
213B	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,902 ± 0,083	0,640 ± 0,053
174B	A0A1D8RC41	Arginine kinase (Fragment) ArgKin	0,114 ± 0,231	0,158 ± 0,267
237B	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	1,383 ± 0,090	1,088 ± 0,084
354A	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	0,956 ± 0,021	0,856 ± 0,019
19A	K7W491	Phosphoglycerate mutase	0,049 ± 0,012	0,072 ± 0,001
524A	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Fragment)	0,093 ± 0,034	0,081 ± 0,001
196C	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)(Fragment)	0,279 ± 0,024	0,293 ± 0,026
189D	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	0,212 ± 0,004	0,171 ± 0,081
115D	A0A067RJD6	Pyruvate dehydrogenase	0,201 ± 0,045	0,544 ± 0,028
106D	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,112 ± 0,020	0,093 ± 0,008
219A	A0A068FKE8	Enoyl-CoA hydratase	0,181 ± 0,034	0,094 ± 0,010
120D	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,128 ± 0,022	0,044 ± 0,008
501E	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogen	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 24h
155B	A0A0N1I833	Regucalcin	0,813 ± 0,030	0,603 ± 0,043
228B	A0A194PU18	Myrosinase 1	0,347 ± 0,074	0,139 ± 0,016
156D	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,134 ± 0,011	0,115 ± 0,016
450C	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,100 ± 0,016	0,052 ± 0,027
423A	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,051 ± 0,061	0,000 ± 0,000
431B	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,114 ± 0,009	0,102 ± 0,027
237F	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,145 ± 0,062	0,170 ± 0,024
241D	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	0,324 ± 0,026	0,204 ± 0,016
399A	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	0,132 ± 0,021	0,000 ± 0,000
235B	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	0,262 ± 0,110	0,000 ± 0,000
158D	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,564 ± 0,077	0,390 ± 0,017
314A	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,308 ± 0,481	0,186 ± 0,207
597D	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,147 ± 0,066	0,130 ± 0,048
377B	A0A075X2J6	Glutathione S-transferase delta 1	0,191 ± 0,031	0,259 ± 0,047
46C	A0A0N0PA48	Galectin	0,041 ± 0,009	0,032 ± 0,012
129D	A0A1B3PEI2	Arylporin (Fragment)	0,116 ± 0,285	0,193 ± 0,609
339B	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	0,409 ± 0,009	0,067 ± 0,016

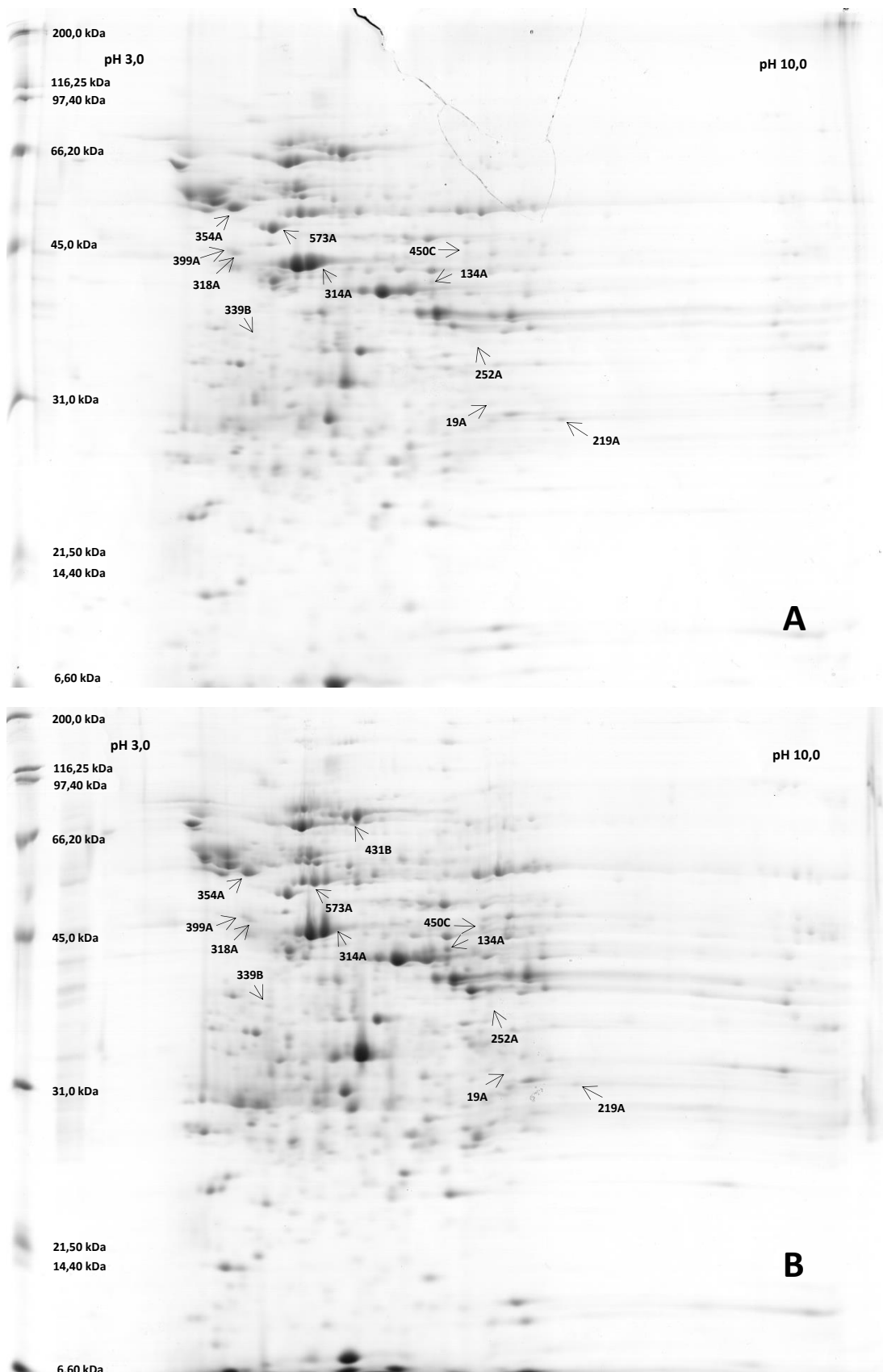
**Anexo 13.** Abundância relativa (% volume) das proteínas identificadas no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos controles, nas 6 e 48 horas.

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 48h
<b>438C</b>	A0A0R6XDG1	V-ATPase subunit A	0,587 ± 0,129	0,754 ± 0,025
<b>436D</b>	A0A023F937	ATP synthase subunit alpha	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<b>573A</b>	A0A023ETB9	ATP synthase subunit beta	0,141 ± 0,023	0,099 ± 0,015
<b>328F</b>	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,373 ± 0,033	0,304 ± 0,061
<b>217B</b>	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,631 ± 0,106	1,066 ± 0,127
<b>213B</b>	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	0,902 ± 0,085	0,710 ± 0,051
<b>237B</b>	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	1,383 ± 0,091	1,088 ± 0,095
<b>354A</b>	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	0,093 ± 0,019	0,000 ± 0,000
<b>196C</b>	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)(Fragment)	0,287 ± 0,028	0,336 ± 0,016
<b>241C</b>	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	0,728 ± 0,110	0,257 ± 0,013
<b>189D</b>	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	0,212 ± 0,008	0,141 ± 0,019
<b>106D</b>	A0A194PYN6	Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,112 ± 0,021	0,084 ± 0,016
<b>120D</b>	A0A059XPP2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,128 ± 0,021	0,000 ± 0,000
<b>501E</b>	A0A023ER31	Putative d-3-phosphoglycerate dehydrogen	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<b>228B</b>	A0A194PU18	Myrosinase 1	0,338 ± 0,027	0,176 ± 0,021
<b>237F</b>	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,145 ± 0,062	0,089 ± 0,029

Spots	Access	Protein	Média da % de volume ± DP	
			Controle 6h	Controle 48h
241D	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein	0,324 ± 0,031	0,249 ± 0,005
156D	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein hsc70	0,134 ± 0,008	0,075 ± 0,051
	A0A182GCU6	Uncharacterized protein		
431B	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,114 ± 0,056	0,048 ± 0,047
450C	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	0,098 ± 0,005	0,000 ± 0,000
318A	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	0,135 ± 0,008	0,148 ± 0,019
399A	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	0,129 ± 0,021	0,057 ± 0,017
235B	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	0,477 ± 0,102	0,000 ± 0,000
314A	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,300 ± 0,482	0,395 ± 0,111
597D	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,147 ± 0,053	0,077 ± 0,015
158D	A0A023ES50	Putative actin-related protein	0,564 ± 0,078	0,778 ± 0,061
63D	A0A088MG62	Glutathione peroxidase POX-A	0,091 ± 0,008	0,126 ± 0,011
	A0A088MGF5	POX-C		
252A	E1CGB6	Translation elongation factor 2 eEF2 (Fragment)	0,136 ± 0,024	0,000 ± 0,000
46C	A0A0N0PA48	Galectin	0,041 ± 0,009	0,048 ± 0,001
306C	A0A194PJH0	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3	0,244 ± 0,024	0,374 ± 0,047
75F	A0A194PJH0	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3	0,017 ± 0,011	0,019 ± 0,022

**Anexo 14.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 12 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Kunitz em 6h	Kunitz em 12h	Abundance Fold
573A	53	4,87	A0A023ETB9	ATP synthase subunit beta	53983	4,99	14%	5	0,177 ± 0,022	0,099 ± 0,000	<1,785
354A	57	4,43	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	57477	4,63	3%	1	1,151 ± 0,125	0,753 ± 0,041	<1,52854
19A	31,5	6,69	K7W491	Phosphoglycerate mutase	28691	5,76	9%	2	0,066 ± 0,011	0,038 ± 0,001	<1,70184
219A	30	7,32	A0A068FKE8	Enoyl-CoA hydratase	32002	8,87	6%	1	0,193 ± 0,022	0,092 ± 0,052	<2,09687
450C	45	6,48	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	8%	4	0,040 ± 0,004	0,090 ± 0,012	>2,04615
431B	75,5	5,35	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	10%	5	0,000 ± 0,000	0,101 ± 0,001	-
318A	47,9	4,44	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,138 ± 0,008	0,064 ± 0,012	<2,12786
399A	48,3	4,39	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,056 ± 0,006	0,084 ± 0,009	>1,48034
314A	45,3	5,09	A0A023ES50	Putative actin-related protein	42149	5,22	7%	2	3,134 ± 0,334	1,942 ± 0,208	<1,61351
252A	35,5	6,31	E1CGB6	Translation elongation factor 2 eEF2 (Fragment)	41999	5,69	8%	2	0,147 ± 0,007	0,179 ± 0,006	>1,21961
339B	36,8	4,64	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	8693	4,44	16%	1	0,031 ± 0,007	0,071 ± 0,001	>2,26036
134A	42,4	6,18	A0A182MUP3	Uncharacterized protein	46657	4,90	3%	1	0,130 ± 0,038	0,310 ± 0,079	>2,38769

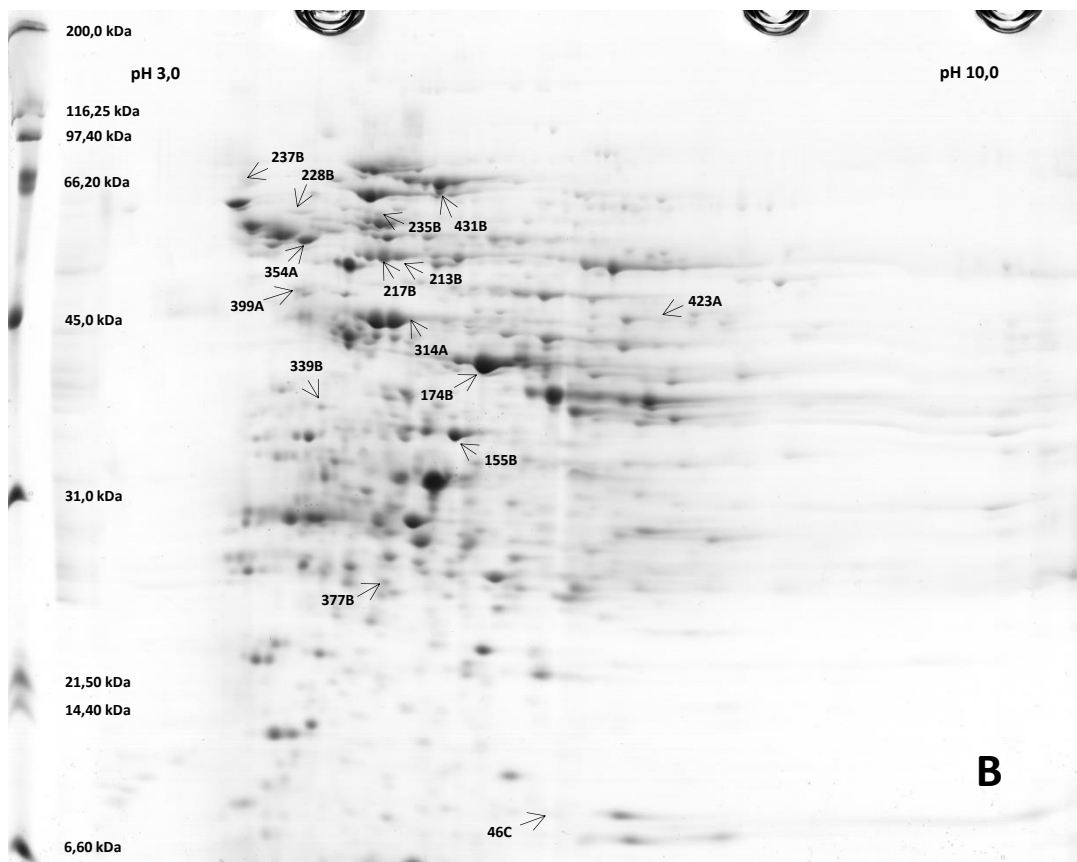
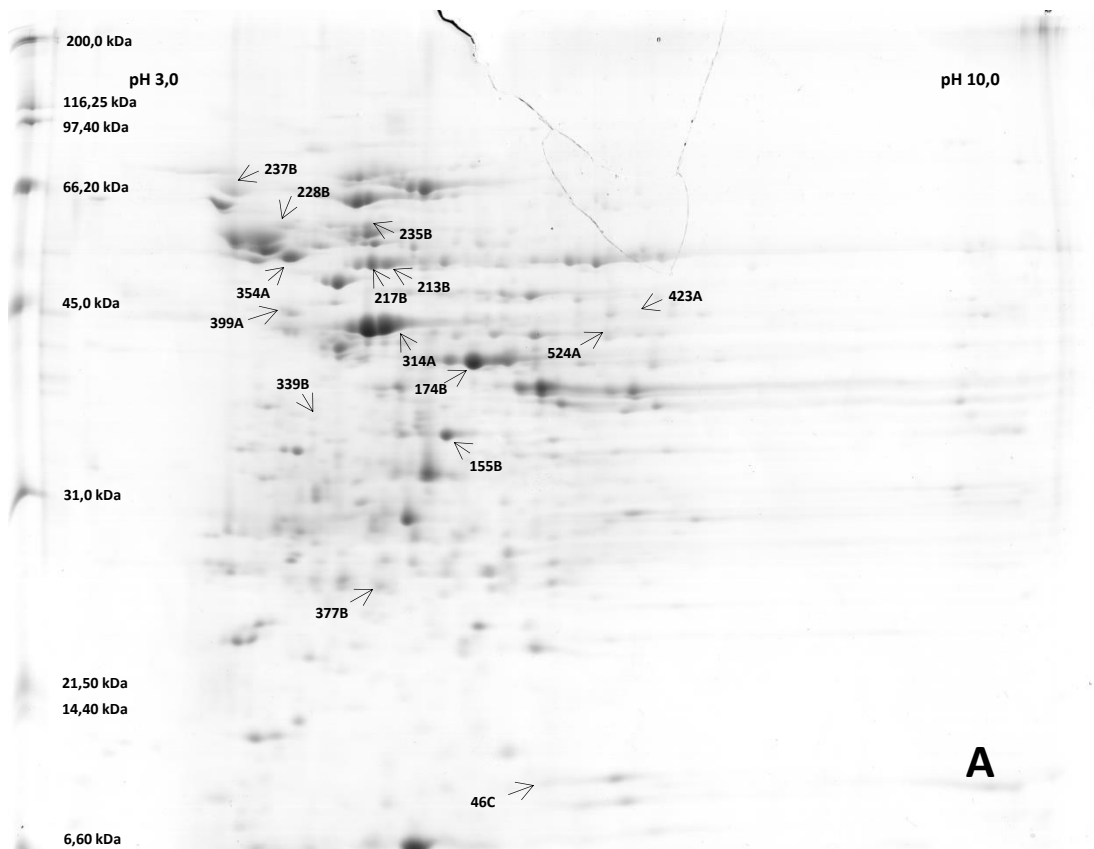


**Anexo 15.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 12 h. As setas indicam os spots diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue* G-250.

**Anexo 16.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 24 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Kunitz em 6h	Kunitz em 24h	Abundance Fold
217B	53,3	5,05	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	8%	3	0,901 ± 0,133	0,535 ± 0,164	<1,68297
213B	53,3	5,16	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	19%	7	0,927 ± 0,175	0,317 ± 0,127	<2,91616
354A	55,8	4,49	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	57477	4,63	3%	1	1,151 ± 0,125	0,628 ± 0,107	<1,8453
237B	68,9	4,08	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	72024	4,58	1%	1	0,495 ± 0,118	0,243 ± 0,008	<2,03117
524A	43,3	6,76	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) (Fragment)	39767	8,89	4%	1	0,096 ± 0,038	0,000 ± 0,000	-
174B	41,4	5,73	A0A1D8RC41	Arginine kinase (Fragment) ArgKin	15256	7,14	12%	1	2,492 ± 0,328	3,818 ± 0,328	>1,53189
155B	35,3	5,57	A0A0N1I833	Regucalcin	50702	5,77	3%	1	0,701 ± 0,118	1,033 ± 0,156	<1,47438
228B	61,6	4,47	A0A194PU18	Myrosinase 1	64966	4,82	2%	1	0,224 ± 0,079	0,073 ± 0,010	<3,05919
423A	44,4	7,03	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	4%	2	0,192 ± 0,062	0,058 ± 0,013	<3,3228
431B	67,6	5,48	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	10%	5	0,000 ± 0,000	0,163 ± 0,037	-
399A	47,3	4,45	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,056 ± 0,006	0,095 ± 0,018	>1,6584

<b>Spots</b>	<b>MW Experimental</b>	<b>pI</b>	<b>Acess</b>	<b>Protein</b>	<b>MW Predicted</b>	<b>pI</b>	<b>Coverage</b>	<b>Peptide number</b>	<b>Média da % de volume ± DP</b>		<b>Abundance Fold</b>
									<b>Kunitz em 6h</b>	<b>Kunitz em 24h</b>	
<b>235B</b>	61,8	5,15	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	60833	5,60	3%	1	0,248 ± 0,076	0,097 ± 0,017	<2,55286
<b>314A</b>	43,8	5,13	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	7%	2	3,134 ± 0,334	1,280 ± 0,343	<2,46604
<b>46C</b>	8,65	6,31	A0A0N0PA48	Galectin	27546	4,95	4%	1	0,078 ± 0,007	0,033 ± 0,007	<2,40591
<b>377B</b>	26,6	5,08	A0A075X2J6	Glutathione S-transferase delta 1	21592	4,70	6%	1	0,083 ± 0,037	0,174 ± 0,046	>2,08792
<b>339B</b>	37,1	4,64	A0A0N0PFU8	Protein disulfide-isomerase A6	8693	4,44	16%	1	0,031 ± 0,007	0,074 ± 0,013	>2,32682

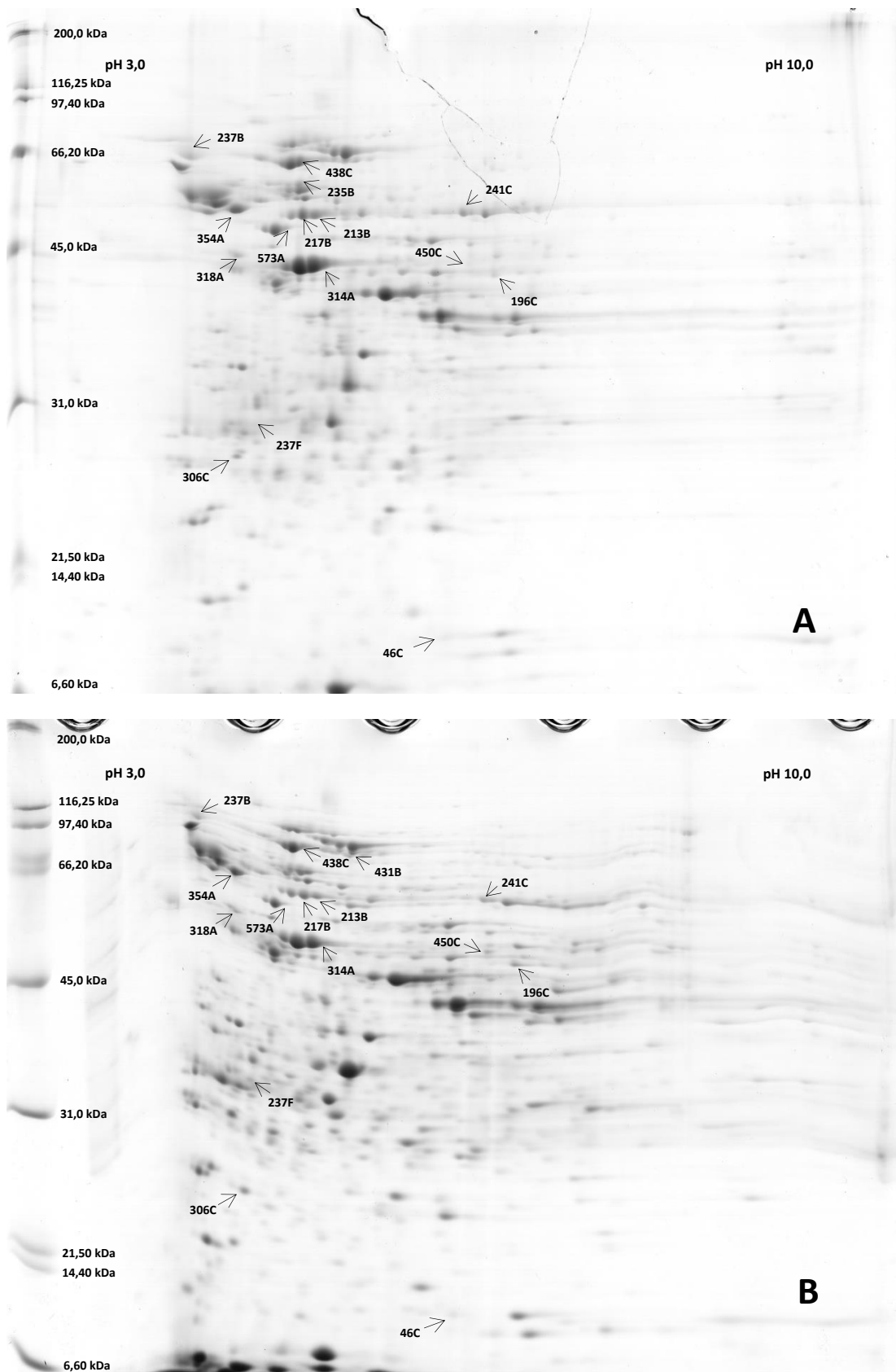


**Anexo 17.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 24 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

**Anexo 18.** Lista das proteínas com abundância diferencial identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS no intestino de *Anticarsia gemmatalis* nos tratamentos com inibidor Kunitz nas 6 e 48 horas.

Spots	MW Experimental	pI	Access	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume Kunitz em 6h	± DP Kunitz em 48h	Abundance Fold
<b>438C</b>	75	4,89	A0A0R6XDG1	V-ATPase subunit A	68453	5,17	7%	3	0,693 ± 0,158	0,317 ± 0,009	<2,18248
<b>217B</b>	56,4	4,88	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	8%	3	0,901 ± 0,133	0,400 ± 0,030	<2,21678
<b>213B</b>	56,8	5	A0A0U1XFD8	Vacuolar V-type H(+)-ATPase B subunit	55414	5,32	19%	7	0,927 ± 0,175	0,268 ± 0,001	<3,40461
<b>573A</b>	55	4,73	A0A023ETB9	ATP synthase subunit beta	53983	4,99	14%	5	0,177 ± 0,022	0,054 ± 0,013	<3,25411
<b>354A</b>	59,8	4,3	A0A0B5EDK8	Putative glycosyl hydrolase	57477	4,63	3%	1	1,151 ± 0,125	0,726 ± 0,062	<1,57302
<b>237B</b>	84,8	3,92	G6CX99	Glycosyl hydrolase family 31 protein	72024	4,58	1%	1	0,495 ± 0,118	0,107 ± 0,006	<4,54269
<b>196C</b>	44,9	6,67	A0A0L7KY52	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)(Fragment)	39767	8,89	4%	1	0,267 ± 0,028	0,188 ± 0,011	<1,41913
<b>241C</b>	56,1	6,37	A0A0N1ICB7	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	16583	5,70	7%	1	0,601 ± 0,158	0,177 ± 0,019	>3,38688
<b>450C</b>	46,8	6,41	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	8%	4	0,040 ± 0,004	0,094 ± 0,014	>2,3619
<b>237F</b>	32,4	4,31	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	2%	1	0,077 ± 0,019	0,158 ± 0,000	>2,04705
<b>431B</b>	78	5,15	A0A0A7HBC8	Heat shock cognate 70 protein (Fragment)	74115	5,45	10%	5	0,000 ± 0,000	0,123 ± 0,042	-
<b>318A</b>	51,4	4,31	A0A023F9K3	Putative heat shock protein hsp 90-alpha	83528	4,97	2%	1	0,138 ± 0,008	0,095 ± 0,017	<1,43397

Spots	MW Experimental	pI	Acess	Protein	MW Predicted	pI	Coverage	Peptide number	Média da % de volume ± DP Kunitz em 6h	Kunitz em 48h	Abundance Fold
<b>235B</b>	62,5	5	A0A0K0KJ78	Heat shock protein 60	60833	5,60	3%	1	0,248 ± 0,076	0,000 ± 0,000	-
<b>314A</b>	47	4,97	A0A023ES50	Putative actin-related protein (Uncharacterized protein)	42149	5,22	7%	2	3,134 ± 0,334	1,327 ± 0,072	<2,34187
<b>46C</b>	8,65	6,18	A0A0N0PA48	Galectin	27546	4,95	4%	1	0,078 ± 0,007	0,059 ± 0,001	<1,32158
<b>306C</b>	28,7	4,28	A0A194PJH0	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like F40A3.3	20231	5,13	7%	1	0,189 ± 0,032	0,290 ± 0,037	>1,53416



**Anexo 19.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do intestino de *A. gemmatalis*. (A) Representa o perfil proteico das lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo inibidores Kunitz em 6 h de tratamento. (B) com 48 h. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por MALDI MS/MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.