

JUAN DIEGO RIOS DÍEZ

**SISTEMA IMUNE DE INSETOS: CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE
PROTEASES DO TIPO SERPIN E ANÁLISE PROTEÔMICA DA
HEMOLINFA DE LAGARTA DA SOJA (*Anticarsia gemmatalis*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

R586s
2018 Rios Díez, Juan Diego, 1979-
Sistema imune de insetos : caracterização de inibidores de
proteases do tipo SERPIN e análise proteômica da hemolinfa de lagarta
da soja (*Anticarsia gemmatalis*) / Juan Diego Rios Díez. - Viçosa, MG,
2018.

xii, 65 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 52-65.

1. *Anticarsia gemmatalis*. 2. Hemolinfa. 3. Proteinase - Inibidores.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia.
Programa de Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

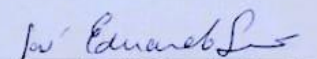
CDD 22. ed. 632.78

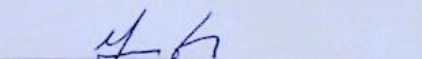
JUAN DIEGO RIOS DIEZ

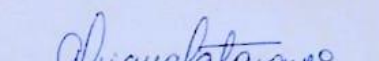
**SISTEMA IMUNE DE INSETOS: CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE
PROTEASES DO TIPO SERPIN E ANÁLISE PROTEÔMICA DA HEMOLINFA
DE LAGARTA DA SOJA (*Anticarsia gemmatalis*)**

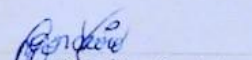
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

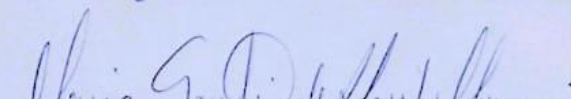
APROVADA: 17 de abril de 2018.


José Eduardo Serrão
(Coorientador)


Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)


Adriana Maria Patarroyo Vargas


Gláucia Cordeiro


Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à terceira edição do Programa de Alianças para a Educação e a Formação (PAEC), da Organização dos Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) e ao Ministério das Relações Exteriores do Brasil por ter tornado possível a realização deste doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade e condições outorgadas ao longo desse processo de formação acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A minha orientadora, Maria Goreti de Almeida Oliveira, por me permitir ser parte da sua equipe de trabalho.

Aos meus coorientadores Humberto Josué de Oliveira Ramos e Jose Eduardo Serrão pelos seus aportes.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, Bioquímica e Biologia Molecular e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada e Agropecuário (BIOAGRO) pela sua disposição para me ajudar com os diferentes equipamentos e técnicas para minha pesquisa. Às pessoas especiais, amigos e colegas que perto ou mesmo estando longe, me acompanharam neste período quien es mi regalo más grande: Roberta, Yaremis, Jenny, Manuel, Andrés, Jose, Wilson, Liliana, Silvia, Kelly, Gláucia, Diana, Daniela, Juliana, Angela, Cristian, Verônica, Samuel, Gabi, à galera da república Pharaoh e ao groooooo que me brinda a força para seguir atrás dos nossos sonhos.

E especialmente agradeço ao Billy por ser meu amigo que só com a sua companhia mesmo sem falar e com as suas doideiras, calmou meus dias de estresse.

“Espero, meu velho, que trabalhando duro vou fazer algo de bom um dia.
Ainda não cheguei, mas não abandono minha posição e nem meu esforço
para alcançar meu objetivo”

Carta para Theo, La Haya, abril de 1882

Vincent Van Gogh

“Espero, viejo, que trabajando mucho haré algún día algo bueno.
No he llegado aún, pero no abandono mi puesto y me esfuerzo por alcanzar
mi objetivo”

Carta a Theo, La Haya, abril de 1882

Vincent Van Gogh

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE EQUAÇÕES	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. <i>Anticarsia gemmatalis</i>	5
3.2. Características gerais do Inseto	6
3.3. Polifenismo de fase dependente da densidade.....	6
3.4. Sistema Imune dos Insetos.....	8
3.5. Enzimas proteolíticas.....	10
3.6. Inibidores de proteases nos insetos.....	12
3.7. Classificação dos Inibidores.....	13
3.7.1. SERPIN.....	14
3.7.2. α 2-Macroglobinas.....	15
3.7.3. Pacifastin	16
3.7.4. Kazal	17
3.7.5. Kunitz	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Criação dos insetos	20
4.2. Grupos de lagartas experimentais.	21
4.2.1. Lagartas estressadas por alta densidade populacional.	21
4.2.2. Lagartas com e sem estresse por dano mecânico.....	22
4.3. Obtenção da hemolinfa livre de hemócitos (HLH) e extração das proteínas.....	22
4.4. Eletroforeses bidimensional de poliacrilamida (2DE).....	23
4.5. Processo de purificação dos inibidores.....	24
4.5.1. Obtenção da hemolinfa livre de hemócitos (HLH).....	24
4.5.2. Quantificação das proteínas.....	24
4.5.3. Cromatografias.....	25
4.5.4. Eletroforeses.....	26
4.6. Cinética.....	27

4.6.1.	Avaliação da atividade inibitória	27
4.6.2.	Constante de inibição	30
4.6.3.	Análise cinética	30
4.7.	Estabilidade dos inibidores	31
4.7.1.	Temperatura.....	31
4.7.2.	pH.....	32
5.	RESULTADOS.....	32
5.1.	Perfil proteico bidimensional das proteínas expressadas na hemolinfa das lagartas de <i>A. gemmatalis</i>	32
5.2.	Processo de purificação.....	36
5.3.	Cinética do inibidor.....	41
5.4.	Estabilidade do inibidor	44
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÕES	51
8.	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Principais cascatas enzimáticas na resposta imune inata **Pag. 25**
- FIGURA 2:** Modelo da ativação do sistema da proPO na hemolinfa de *Manduca sexta* **Pag. 26**
- FIGURA 3:** Interações SERPIN com tripsina **Pag. 29**
- FIGURA 4:** Criação de *Anticarsia gemmatalis* **Pag. 36**
- FIGURA 5:** Reprodutibilidade das imagens dos géis dos tratamentos **Pag. 48**
- FIGURA 6:** Número de *Spots* com abundância diferencial em cada tratamento por cada comparação **Pag. 49**
- FIGURA 7:** Perfis de eluição de proteínas do Plasma de *A. gemmatalis* por Cromatografia **Pag. 52**
- FIGURA 8:** Análise por SDS-PAGE do Processo de Purificação do Inibidor **Pag. 55**
- FIGURA 9:** Análise da curva de inibição da papaína pelos inibidores obtidos da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis* **Pag. 56**
- FIGURA 10:** Análise da curva de inibição da tripsina bovina pelos inibidores obtidos da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis* **Pag. 57**
- FIGURA 11:** Análise da curva de inibição da tripsina-like intestinal de *Anticarsia gemmatalis* pelos inibidores obtidos da hemolinfa do mesmo inseto **Pag. 58**
- FIGURA 12:** Efeito do pH e a Temperatura na Atividade Inibitória da Amostra Enriquecida com Inibidor Isolada da Hemolinfa de *A. gemmatalis* **Pag. 59**

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 Pag. 42

EQUAÇÃO 2 Pag. 43

EQUAÇÃO 3 Pag. 45

EQUAÇÃO 4 Pag. 46

EQUAÇÃO 5 Pag. 46

EQUAÇÃO 6 Pag. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

BApNA: N α -Benzoyl-*DL*-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.

BSA: Albumina sérica bovina.

CaCl₂: Cloreto de cálcio.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

2-DE: Eletroforeses bidimensional

EDTA: Ácido etileno dianimotetracético.

EI: Concentração do complexo enzima ligado ao inibidor.

HCl: Ácido clorídrico.

HLH: Hemolinfa livre de hemócitos.

IEF: Focalização isoeletrica

IPG: Gradiente de pH imobilizado

k_{cat}: Número de moléculas do substrato convertida em produto pelo sítio ativo da enzima por unidade de tempo.

K_{off}: Velocidade de associação do inibidor pelo complexo enzima:substrato.

K_{obs}: Constantes de pseudo-primeira ordem, velocidade para conversão de fase da velocidade inicial para a fase da velocidade de estado estacionário.

K_M: Constante de Michaelis-Menten.

K_i: Constante de inibição.

NaCl: Cloreto de sódio.

NaOH: Hidróxido de sódio.

PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos.

pI: Ponto Isoeletrico

PTU: Feniltiureia (pela sua sigla em ingles, Phenylthiourea).

RCL: Centro reativo da sequência (em ingles, Reactive Center Loop).

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

TCA: Ácido tricloroacético.

UI: Unidades Inibitórias.

SERPIN: Inibidores de serino proteases.

V_{max} : Velocidade máxima da reação, no qual todos os sítios ativos das enzimas da reação estão saturados pelos substratos do meio.

RESUMO

RIOS-DÍEZ, Juan Diego, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Sistema Imune de Insetos: Caracterização de Inibidores de Proteases do Tipo SERPIN e Análise Proteômica da Hemolinfa de Lagarta da Soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josue de Oliveira Ramos, Jose Eduardo Serrao, Tiago Antonio de Oliveira Mendes e Carolina Rocha da Silva.

Anticarsia gemmatalis, Hübner, 1818 (Lepidoptera Noctuidae) em condições de estresse, gera três fenótipos com diferentes níveis de melanização na cutícula acompanhada da diminuição da imunidade. Seu sistema imune inato está composto por diversas proteínas responsáveis por ativar e executar a resposta imunológica. Entre estas proteínas, encontram-se proteases e inibidores de proteases, que coordenam tal resposta. Os inibidores encontram-se livremente na hemolinfa ou associados com o corpo gorduroso. Em *A. gemmatalis* ainda não foi determinado como o estresse afeta as proteínas que circulam na hemolinfa, tampouco sobre a presença ou a função dos inibidores de proteases presentes nela. Por isso o intuito deste trabalho foi perceber o efeito do estresse populacional e do dano mecânico nas proteínas secretadas na hemolinfa das lagartas de *A. gemmatalis* e identificar inibidores de serino e cisteíno proteases presentes. Em lagartas com e sem estresse abiótico, foi obtida as proteínas da hemolinfa e analisadas em géis 2-DE. Foram feitas duas cromatografias (afinidade e troca iônica), caracterizando e determinando a atividade inibitória. Foi observada uma diminuição de proteínas na hemolinfa das lagartas com ou sem estresse por população após do ferimento. Mas não apresentaram diferenças os perfis dos mapas das proteínas. Também foi encontrado pelo menos dois inibidores de proteases de aproximadamente 38±2 kDa e 90±9 kDa, com uma afinidade de 29,4 vezes maior para as proteases intestinais do próprio inseto do que para as proteases de mamíferos. O mecanismo de inibição foi competitivo e incompetitivo para as serino e as cisteíno proteases respectivamente. Estes resultados abrem uma nova alternativa na procura de peptídeos para ser utilizados como ferramentas para o controle deste inseto.

RESUMEN

RIOS-DÍEZ, Juan Diego, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Sistema Inmune de Insectos: Caracterización de Inhibidores de Proteasas de Tipo SERPIN y Análisis Proteómico de la Hemolinfa de la larva de la Soya (*Anticarsia gemmatalis*).** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Jose Eduardo Serrão, Tiago Antonio de Oliveira Mendes y Carolina Rocha da Silva.

Anticarsia gemmatalis, Hübner, 1818 (Lepidóptera Noctuidae) en condiciones de estrés, presenta tres fenotipos con diferentes grados de melanización en su cutícula, acompañada de disminución de la inmunidad. Su sistema inmune innato está compuesto por diversas proteínas responsables por activar e ejecutar la respuesta inmunológica. Entre estas proteínas, se encuentran proteasas e inhibidores de proteasas. Los inhibidores se encuentran libremente en la hemolinfa o asociados al cuerpo graso. En *A. gemmatalis* no fue determinada aún como el estrés afecta las proteínas que circulan en la hemolinfa ni la presencia o la función de los inhibidores de proteasas. Por eso el propósito de este trabajo fue identificar el efecto del estrés poblacional y del daño mecánico en las proteínas secretadas en la hemolinfa de estas larvas, así como, identificar inhibidores de serina y cisteína proteasas. Las proteínas de la hemolinfa de larvas con y sin estrés abiótico, fueron analizadas en geles 2-DE. Se realizaron dos cromatografías (una de afinidad e otra de troca iónica), para caracterizar y determinar la actividad inhibitoria. Se observó una disminución de proteínas en la hemolinfa de las larvas con y sin estrés por súper población después de ser heridas, mas los mapas de los perfiles de las proteínas no tuvieron diferencias. También fue encontrado por lo menos dos inhibidores de proteasas de aproximadamente 38 ± 2 kDa y 90 ± 9 kDa, con una afinidad de 29,4 veces mayor para las proteasas intestinales del propio insecto que para las proteasas de mamíferos. El mecanismo de inhibición fue competitivo e incooperativo para serina y cisteína proteasas respectivamente. Estos resultados abren una alternativa en la búsqueda de péptidos para ser utilizados como herramienta para el control de este insecto.

ABSTRACT

RIOS-DÍEZ, Juan Diego, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018. **Immune System of Insects: Characterization of Proteases Inhibitors Like SERPIN and Proteomic Analyses from Hemolymph of Soybean Caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*)**. Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisors: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Jose Eduardo Serrão and Tiago Antonio de Oliveira Mendes and Carolina Rocha da Silva.

Anticarsia gemmatalis, Hübner, 1818 (Lepidóptera Noctuidae) in stress conditions, they generates three phenotypes with different levels on cuticle melanization follow by loss immunity. Your innate immune system is composed of various proteins responsible for enable and run the immune response. Between these proteins, are proteases and proteases inhibitors that coordinate it response. The inhibitors are free in hemolymph or associate whit fab body. In *A. gemmatalis* has not yet been determined how of stress affect the proteins that circulate in the hemolymph, nor on the presence or the function of protease inhibitors present in it. The aim of this study was understand the effect of population stress and the mechanical damage in the secreted proteins in hemolymph of caterpillars of *A. gemmatalis* and identify present inhibitors of serino and cisteíno proteases. In caterpillars with and without abiotic stress, hemolymph proteins was obtained and analyzed in 2-DE gels. Were made two chromatograms (affinity and ionic changes), characterizing and determining the inhibitory activity. Was see loss of protein in hemolymph from caterpillars with and without population stress after injury. But don't have changes the profiles from proteins maps. It has also been found at least two protease inhibitors of approximately 38 ± 2 kDa e 90 ± 9 , with 29,4 more affinity intestinal proteases self than mammalian proteases. The mechanism inhibition was competitive and incompetitive for serine and cysteine proteases respectively. These results open a new alternative in the search for peptides to be used as tools for this insect control.

1. INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), lagarta-da-soja, é uma praga desfolhadora de ocorrência tropical e subtropical, importante em várias culturas, principalmente na soja. Restrita ao continente americano é considerada praga chave da soja nos EUA, México, Colômbia, Venezuela e Argentina; e no Brasil é uma das principais (UEDA et al., 2016).

A lagarta-da-soja é uma espécie oligófaga, que pode consumir de 85 a 150 cm² da área foliar da soja, até completar a fase larval. Alimentam-se de toda a superfície foliar, inclusive das nervuras, dos pecíolos e hastes mais finas (HOFFMAN-CAMPO et al., 2013; UEDA et al., 2016). Ela apresenta normalmente comportamento solitário, porém podem ocorrer surtos de alta densidade populacional. Quando há esta situação, as lagartas podem apresentar características de polifenismo, devido ao estresse gerado pelo ambiente. Este estresse pode comprometer seu sistema imunológico, tornando-as mais vulneráveis a patógenos (SILVA et al., 2013; WOJDA, 2017).

O estresse refere-se ao estado de um organismo gerado por mudanças nas condições ambientais que de uma ou de outra forma pode afetar o *fitness* em curto ou longo prazo (KOEHN & BAYNE, 1989). Estas mudanças, ou estressores, podem trazer os organismos para a borda de seu nicho ecológico específico, o que descreve a gama de condições ambientais sobre os quais o organismo pode sobreviver e se reproduzir (VAN STRAALLEN, 2003). O estresse usualmente é um período transitório, pelo qual os organismos podem sobreviver pela indução de mecanismos que neutralizam as consequências do estresse, o que é chamado de resposta ao estresse. Por exemplo, quando é gerado pelo número de indivíduos em uma área determinada é denominada "polifenismo de fase dependente da densidade" (WILSON et al., 2002; WHITMAN & AGRAWAL, 2009). As respostas ao estresse geralmente envolvem a plasticidade da fisiologia, bioquímica, comportamento e às vezes, morfologia do organismo (YAMPOLSKY et al., 2014). A resposta ao estresse pode gerar algumas alterações no organismo para voltar ao seu estado ideal, no entanto, uma mudança permanente do nicho ecológico por adaptação genética

também é possível, as variações induzidas pelo estresse, são um fator importante na evolução adaptativa (BADYAEV, 2005).

Assim como os demais insetos, *A. gemmatilis* necessita de um eficiente mecanismo de defesa para desenvolver-se em ambientes repletos de estressores, como os patógenos, escassez de recursos, substâncias tóxicas ou condições climáticas desfavoráveis (HOFFMAN & REICHHART, 2002). Os patógenos atuam como agentes estressores porque os seus ataques têm uma ampla gama de estratégias para colonizar o corpo do inseto, demandando deste um forte sistema imune (GHOSH et al., 2011). Os patógenos são uma importante força seletiva, atuando direta ou indiretamente não só no indivíduo como também na população (RAFALUK et al 2017; WILSON et al., 2002). Os estressores como a falta de recursos alimentares, a exposição a substâncias tóxicas e condições climáticas como altas ou baixas temperaturas, geram no corpo dos insetos uma produção de diferentes substâncias como os radicais livres que atingindo a níveis críticos podem ser letais (Liu et al., 2017).

Como mecanismo para diminuir os efeitos nocivos destes estressores, encontra-se o sistema imune. O sistema imune está constituído por dois tipos de barreiras: as físicas e a resposta fisiológica (WANG TAN et al., 2006; CHAPMAN, 2009). A primeira barreira é formada pela cutícula e pela matriz peritrófica (VINCENT and WEGST, 2004). No momento que a primeira barreira falha, começa a atuar a segunda barreira (a fisiológica), constituída por dois componentes presentes na hemolinfa, a resposta celular e a resposta humoral ou inata (KLOWDEN, 2013). Os hemócitos que constituí a defesa celular estão envolvidos no reconhecimento dos microorganismos e dos corpos estranhos para o organismo. Essas células fazem o seu trabalho por meio da fagocitose, da encapsulação, na indução de peptídeos antibacterianos (AMP) e pela ativação de vias enzimáticas como a da fenoxidase (LITTLE et al., 2005; CHAPMAN. 2009; KLOWDEN. 2013; NAKATSUJI; GALLO, 2012).

O sistema imune inato dos insetos está constituído por uma série de proteínas que circulam constante e livremente no hemocele e são encarregadas da sinalização e orientação dos hemócitos e ativação dos alarmes da invasão de corpos ou substâncias estranhas para o organismo (CHAPMAN, 2009; GUNDAPPA et al., 2014). Entre as

proteínas da imunidade humoral são encontradas diversas proteases e inibidores de proteases que juntas coordenam o reconhecimento e a eliminação de patógenos (HILLYER, 2016)

Os inibidores de proteases estão presentes em todos os eucariotos e têm uma importante função na regulação de processos biológicos. Dentre essa sua principal função é de limitar a atuação das proteases, podendo ter ampla ação inibitória sobre diferentes enzimas, tais como, as proteases digestivas e as de fatores de virulência a patógenos. Esses inibidores também podem ser de substratos específicos como os componentes de uma cascata enzimática de sinalização (JIANG et al., 2009; GUBB et al., 2010).

Os inibidores podem ser encontrados livremente no plasma como em cadeias polipeptídicas únicas de baixa massa molecular. Entretanto, também podem apresentar alta massa formada por vários domínios de capacidade inibitória múltipla, na mesma cadeia polipeptídica (KANOST, 1999; RAWLINGS et al., 2004). Mas em geral, os domínios encarregados especificamente da inibição são conservados para cada classe, enquanto as sequências de reconhecimento não são, pois frequentemente é encontrado “*splicing*” alternativo nos genes que codificam estas proteínas (ZOU et al., 2009).

Deste modo, é gerada uma especificidade alta para cada tipo de proteases a ser inibida. Algumas exceções têm sido observadas, como por exemplo, para o artrópode *Amblyomma americanum* que possui a proteína AamS6 (pertencente à família das SERPIN). Esta proteína pertence a uma classe cruzada de inibidor de serino e cisteíno proteases. Outro exemplo é o inibidor isolado da seda do casulo da lagarta de *Bombyx mori*, que apresenta uma atividade inibitória de amplo espectro contra a proteinase K, a tripsina, a quimiotripsina, a elastase, a subtilisina e a papaína (MULENGA et al., 2013; PENG-CHAO et al., 2015).

Os insetos apresentam inibidores com mecanismos variáveis, mas em geral podem ser classificados em: irreversível (reação armadilha), ou reversível. Pode ser estabelecido o tipo de inibição reversível, pelo cálculo da proporção K_i'/K_i denominado alfa (α). É um parâmetro bastante útil para determinar o tipo de inibição de um inibidor reversível. Os inibidores reversíveis que apresentando o α estatisticamente igual a 1,0 são considerados não competitivos, enquanto que para os

valores menores de 1,0 são denominados incompetitivos e os que são maiores de 1,0 serão os competitivos (STRELOW et al., 2012).

Sabe-se que os insetos desenvolvem resistência aos inibidores da planta, mas, a estratégia de usar os próprios inibidores contra a lagarta surge pelo fato que estas proteínas não são produzidas no intestino, mas sim em outros diferentes tecidos (RAI et al., 2010). Possivelmente esta estratégia seja mais segura que o uso de inibidores de origem vegetal ou artificial, uma vez que seja pouco provável que o inseto desenvolva resistência contra seus próprios inibidores.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de expressão de proteínas em larvas com estresse abiótico e inibidores de serino e cisteíno proteases isoladas da hemolinfa da hemolinfa de *A. gemmatalis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais.

- Analisar o perfil das proteínas expressadas na hemolinfa em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* sometidas a estresse abiótico
- Caracterizar o inibidor de serino e cisteíno proteases isoladas da hemolinfa de lagartas de *A. gemmatalis* desenvolvidas em condições de estresse

2.2. Objetivos Específicos.

- Caracterizar o perfil das proteínas expressadas na hemolinfa em lagartas com e sem estresse
- Avaliar o efeito do estresse por alta densidade populacional no perfil das proteínas expressadas na hemolinfa de lagartas sometidas a dano mecânico
- Analisar o tipo de inibição dos inibidores isolados da hemolinfa de lagartas de *A. gemmatalis*
- Determinar o K_i para os inibidores de serino e cisteíno proteases
- Avaliar a estabilidade do extrato enriquecido da hemolinfa em diferentes temperaturas e pH's

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Anticarsia gemmatalis*

A soja (*Glycine max*), como qualquer monocultura, está sujeita durante todo o seu ciclo à infestação de diferentes patógenos e herbívoros que podem causar danos consideráveis à plantação (HOFFMAN-CAMPO et al., 2013). Entretanto, em ecossistemas naturais as populações de muitos insetos praga geralmente se encontram em equilíbrio, seja por meio de predação, parasitoides, doenças ou por variáveis fisiológicas das próprias plantas. Desta forma, tornar-se necessário a aplicação de métodos de controle, tais como, a aplicação de agrotóxicos, a introdução de inimigos naturais ou por meio do controle mecânico das populações dos insetos.

Nas regiões brasileiras onde é cultivada a soja, de novembro até abril e em anos mais secos, é abundante a presença do herbívoro conhecido como a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (*A. gemmatalis*) Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Para o controle biológico deste inseto tem sido recomendado o uso de fungos, vírus, bactérias entomopatogênicas, depredadores e parasitoides como: *Noumorea rileyi*, *Baculovirus anticarsia*, *Bacillus thuringiensis*, *Calosoma granulatum* Weber, 1801 (Coleoptera: Carabidae), *Microcharops anticarsiae* Gupta, 1987 (Hymenoptera: Ichneumonidae), respectivamente (HOFFMAN-CAMPO et al., 2013). Também tem sido recomendado o uso de agrotóxicos com triflumuron, cromafenozida, acéfalos, clorpirifos, endossulfam, lamdacialotrina e tiametoxam (HOFFMAN-CAMPO et al., 2013, UEDA et al., 2016). Por outro lado, a eficiência destes métodos pode ser questionada em termos de níveis de controle alcançados, por ser de amplo espectro de atuação e pelos impactos ambientais ocasionados.

3.2. Características gerais do Inseto

Anticarsia gemmatalis é uma espécie oligófaga de leguminosas, em que cada lagarta inicialmente, apenas raspa pequenas áreas na folha da planta deixando somente uma membrana translúcida, assim podendo consumir de 85 a 150 cm² da área foliar de soja, até completar a fase larval. (UEDA et al., 2016). Quando estão maiores, alimentam-se de toda a superfície foliar, inclusive de nervuras, pecíolos e hastes mais finas. O ciclo completo de desenvolvimento do inseto, de ovo até adulto, dura em média de 25 a 30 dias, passando por cinco a sete instares dependendo das condições ambientais (BORTOLI et al., 2005; SILVA 2013).

As mariposas apresentam um hábito noturno e abrigam-se em áreas sombreadas durante o dia, geralmente entre as folhas ou abaixo delas (COSTA & DAMASCENO; 2009). A envergadura das asas é de 30 a 38 cm com uma linha diagonal unindo as pontas do primeiro par de asas (HOFFMAN-CAMPO et al., 2013). Como a maioria dos noctuídeos, possuem frénulo nas asas posteriores, abdômen conóide e na base encontra-se o tímpano, pupa obtecta, antenas filiformes em ambos os sexos, probóscide bem desenvolvida, tíbias com esporões, olhos não ciliados, M2 nas asas posteriores bem desenvolvida e aproximada do ângulo inferior da célula, e no ponto de origem, mais ou menos aproximada de M3 (MELO et al., 2012).

3.3. Polifenismo de fase dependente da densidade

Muitos insetos tem a habilidade de se desenvolver de forma isolada ou em grupos (gregários) modificando assim, a sua aparência. Quando o fenótipo de um indivíduo é alterado em resposta à variação percebida na densidade populacional local, é conhecido como "polifenismo de fase dependente da densidade" (WILSON et al., 2002; WHITMAN & AGRAWAL, 2009). A maioria dos polifenismos são controlados pelo hormônio juvenil e outros neuromônios, provocando diferenças nas formas do corpo, da fisiologia e do desenvolvimento do indivíduo. É importante ressaltar que tal variabilidade da forma e função não é o resultado de diferenças genéticas entre indivíduos, o qual seria classificado com polimorfismo. Sendo assim,

os insetos têm enorme potencial para mudar seus fenótipos em resposta às condições ambientais (RESH & CARDÉ, 2003).

O polifenismo de fase é um fenômeno generalizado em insetos, tendo sido registrado em Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera e Hemiptera (GUO et al 2016; WILSON et al., 2002). No entanto, a *Anticarsia gemmatalis* é um inseto principalmente solitário, mas que passa por surtos de alta densidade populacional ocasionalmente. As lagartas possuem a plasticidade fenotípica relacionada à densidade populacional, mas não é considerada por alguns pesquisadores como polifenismo de fase dependente da densidade propriamente dito como *S. Gregaria*. (SILVA et al., 2013). Entretanto, durante este período de alta densidade, as lagartas podem apresentar características polifenísticas por ser um ambiente estressante para o inseto, comprometendo seu sistema imunológico e tornando-o mais vulnerável a patógenos (SILVA et al., 2013; WOJDA, 2017).

Nos indivíduos que vivem em aglomeração, conhecidos como "gregários", é característico a presença de uma cutícula mais melanizada do que em indivíduos "solitários" (SILVA et al., 2013). Dentre os insetos que apresentam estas características estão: *Spodoptera littoralis*, *S. exempta* e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Porthetria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) e *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). Estes insetos, além da mudança (ou alteração da cor), apresentam diferenças na morfologia, na fisiologia, no seu desenvolvimento e principalmente nos seus sistemas imunes (SIMPSON et al., 1999; ELLIOT et al., 2002; LEE et al., 2004; SILVA et al., 2013)

Os organismos que moram em altas densidades populacionais, sociais e gregários, são mais propensos que os solitários, em geral, à transmissão de patógenos pelo contato (RAFALUK et al., 2017). Há evidências de quatro espécies de lepidópteros que o risco de transmissão de doenças aumenta diretamente com a densidade da população é o caso da lagarta-do-sobreiro ou lagarta cigana *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) (STEINHAUS, 1958; ANDERSON & MAY, 1981; REESON et al., 1998). Como o sistema imune é altamente caro (energeticamente falando), alguns organismos têm desenvolvido estratégias como a plasticidade da imunidade como por exemplo o fenômeno conhecido como a hipótese dependente da densidade (WILSON & REESON, 1998). Este modelo

propõe que na maioria nas relações parasita-hospedeiro, o risco de transmissão é dependente da densidade, ou seja, aumenta linearmente com a densidade de população (Boots. 2000; WILSON & REESON, 1998). Pelo fato que a alta densidade populacional é estressante para o inseto, comprometendo seu sistema imunológico e tornando-o mais vulnerável aos agentes patogénicos (WOJDA, 2017).

3.4. Sistema Imune dos Insetos

Anticarsia gemmatalis como todos os outros insetos, para desenvolver-se em ambientes repletos de agentes potencialmente nocivos, precisam de uma grande eficiência dos seus mecanismos de defesa. Estes podem ser divididos em três categorias: as barreiras passivas ou físicas (tegumento, trato digestivo e glândulas salivais), a resposta celular (mediada pelos hemócitos) e a resposta imune inata (imunidade humoral). Alguns componentes do sistema imune inato dos vertebrados apresentam homologia com as moléculas imunes dos insetos (HOFFMAN & REICHHART 2002; ZHU et al 2005; WANG TAN, et al. 2006).

Segundo Chapman (2009), o exoesqueleto dos insetos, fornece proteção contra a desidratação, à abrasão por fatores químicos ou físicos e, para a movimentação destes com um mínimo de músculos ativos (comparado com os organismos com esqueleto interno). Além disso, este ajuda ainda na percepção do meio ambiente e é a primeira barreira do sistema imune do organismo. Constituído por um polímero de quitina, o exoesqueleto é um tipo de defesa passiva assim como no intestino que delimitam o ingresso de agentes patógenos dentro do hemocele (SNODGRASS, 1993).

As células imunes dos invertebrados são conhecidas como hemócitos, as quais possuem diferentes formas e composição proteica de acordo com a sua função. Os hemócitos que descarregam substâncias químicas produzidas no seu interior sobre a superfície dos corpos estranhos que invadem o hemocele são conhecidos como granulócitos. Já os plasmatócitos são as células responsáveis pela fagocitose de pequenos corpos estranhos e enquanto os lamelócitos podem tanto fagocitar como isolar por encapsulação os corpos estranhos maiores (KLOWDEN, 2013).

A terceira etapa do sistema imune dos insetos (imunidade humoral) é constituída por diferentes cascatas enzimáticas que coordenam e unificam as outras duas etapas mencionadas anteriormente. Essa cascata de sinalização permite reconhecer os patógenos por diferentes vias, como a via Toll, Imd, Jak/Stat, JNK e a via da Insulina (HILLYER, 2016).

A resposta imune está centrada nas vias Toll e Imd, cujas cascatas resultam na translocação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (Nf-kb), para o núcleo da célula, os quais iniciam a ativação da expressão de genes associados com a imunidade (Figura 1) (PALMER & JIGGINS. 2015).

A via Imd é ativada quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMP pela sua sigla no inglês) se ligam a receptores extracelulares PGPR-LC, o que gera uma sinalização intracelular via receptores Imd, Fadd, Dredd e outros, que levam à translocação nuclear de fatores como NF-kb, Relish e Rel2. Consequentemente acontece a transcrição de peptídeos antimicrobianos ativos e outros genes efetores imunes (Figura 1). Esta via é ativada principalmente para combater bactéria Gram negativas, vírus e no caso dos mosquitos, alguns protozoários (PALMER & JIGGINS. 2015).

A via Jak/Stat, está envolvida na imunidade e no desenvolvimento do inseto. A sua ativação inicia quando as citocinas extracelulares são unidas com os receptores celulares, desencadeando uma cascata que culmina na transcrição de genes antimicrobianos e nas sínteses de óxido nítrico (Figura 1) (HILLYER. 2016).

A via JNK é uma via importante para a ativação da imunidade celular e a resposta ao estresse, com os sinais adequados, indicam à célula condições de infecção ou mudanças adversas no ambiente, o que induz a ativação de algumas proteínas associadas ao estresse. Mesmo sem estar completamente esclarecido como é que funcionam todos os componentes desta via, é sabido que as JKN participam no desenvolvimento dos insetos (SILVERMAN *et al.*, 2003; Bordenstein Lab, NSF DEB-1046149).

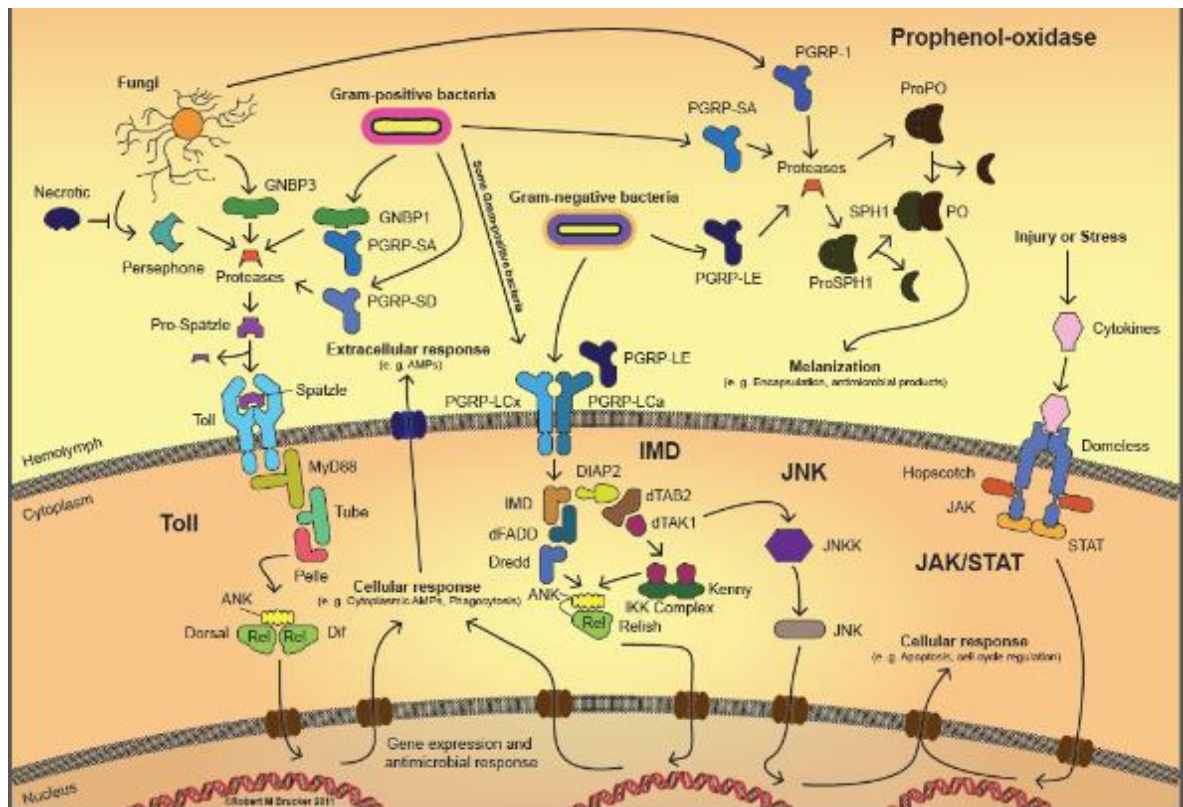


Figura 1. Principais cascatas enzimáticas na resposta imune inata
(Bordenstein Lab, NSF DEB-1046149)

3.5. Enzimas proteolíticas

A lagarta-da soja *A. gemmatilis* tem sido alvo de pesquisas em função dos impactos provocados na produtividade da cultura da soja e também como proposta de modelo para estudos de controle de insetos praga. Um dos alvos para pesquisas são as proteases presentes no tanto seu trato digestivo, como em glândulas salivais, na hemolinfa e entre outros tecidos. Nestas pesquisas têm sido avaliados alguns aspectos como a interação no desenvolvimento do inseto, o efeito no processo digestivo, na fisiologia do inseto e além de qual é a relação com a resistência contra patógenos (OLIVEIRA et al., 2005; ALVAREZ-ALFAGEME et al., 2011; MOREIRA et al., 2011; GOMES et al., 2011; BODE et al., 2013).

As principais enzimas encarregadas da digestão nos intestinos das lagartas de lepidóptera são do tipo serino proteases, tais como tripsinas e quimiotripsina (SWATHI et al., 2016). Os intestinos são ambientes alcalinos com pH entre 8 e 11,5

em que também são encontradas enzimas como as cisteino (thiol) e aspartil (carboxyl) proteases, algumas metaloproteases e amino peptidases, responsáveis pela degradação das proteínas fornecidas pela dieta (SNODGRASS, 1993; JONGSMA & BOLTER, 1997).

As proteases também participam em outros processos da homeostase do organismo relacionadas com o sistema imune. Como já foi dito acima, diferentes enzimas participam na produção de peptídeos antimicrobianos importantes na resposta imune, também ajudam na coagulação da hemolinfa e na sua melanização para encapsular os patógenos (HILLYER, 2016; AN et al., 2011).

A melanina também é importante para manter a saúde e a dureza da cutícula, e é produzida quando o zimogênio inativo da profenoloxidase (PPO) é quebrado na forma ativa, fenoloxidase (PO), pela cascata da serina proteases (Figura 2). A PO oxida fenóis que levam à produção de quinonas, as quais são moléculas tóxicas e muito importantes para defesa contra os patógenos (XU *et al.*, 2015; PALMER e JIGGINS, 2015).

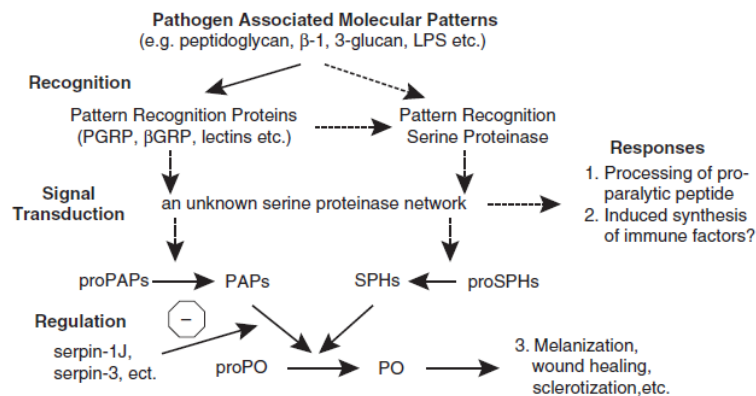


Figura 2. Modelo da ativação do sistema da proPO na hemolinfa de *Manduca sexta*. (KANOST *et al.*, 2004).

Entre as principais enzimas das vias de reconhecimento e neutralização de patógenos encontra-se as serino proteases, assim. Na via Imd participa a tirosina quinase; enquanto nas vias da Insulina, a JNK, Jak/Stat, fagocitosis, formação de nódulos, apoptose, geração de RNAi, lises e a autofagia, as principais enzimas

envolvidas além de algumas serino proteases, também participam caspasas, ribonucleases, lisozimas e quinases (HILLYER. 2016).

3.6. Inibidores de proteases nos insetos.

Os Inibidores de proteases estão relacionados com os diferentes processos fisiológicos, tais como as vias morfogênicas, a espermatogêneses, o transporte aniônico, o transporte de hormônios, a necroses celular, a apoptose, a longevidade e principalmente nos diversos aspectos da imunidade (JIANG *et al.*, 2009). Estes estão também associados a tecidos como o tegumento, as gónadas, as glândulas salivais, o corpo gorduroso e a hemolinfa; assim como também na produção de seda. Estas proteínas são necessárias para impedir a proteólise excessiva sejam as enzimas alvo de origem exógena ou endógena (CHERQUI *et al.*, 2001; RIPHANITCHAYAKIT & TASSANAKAJON, 2010; MEEKINS *et al.*, 2017).

Os inibidores podem ajudar tanto na proteção contra uma ampla faixa de patógenos como no caso de ataque de bactérias entomopatogênicas específicas. Tem sido observado estes inibidores atuando contra diferentes proteinases extracelulares bacterianas. Essas proteases são importantes durante o processo de infecção, e, portanto, a presença de inibidores diminui a capacidade patogênica (bacteriostático). Mas em alguns casos, como em parasitoides, os inibidores têm a função de proteger o indivíduo da digestão enzimática do hospedeiro (RIPHANITCHAYAKIT and TASSANAKAJON, 2010; COLINET *et al.*, 2014).

Em alguns lepidópteros, tais como *Manduca sexta*, *Galleria mellonella* e *Bombyx mori*, têm sido identificados inibidores incorporados nas fibras da seda do casulo, os quais evitam a degradação gerada pelas proteases de bactérias e fungos (GUBB *et al.*, 2010; RIPHANITCHAYAKIT & TASSANAKAJON, 2010; PENG-CHAO *et al.*, 2015).

Outra função atribuída a estes tipos de proteínas é a ação anti-hemostática; nos insetos hematófagos, como culicídeos e em artrópodos, como *Amblyomma americanum*, nos quais evitam a formação de coágulos durante a ingestão do sangue ou em seus estômagos. Estes anticoagulantes são secretados na saliva ou no suco

gástrico (RIPHANITCHAYAKIT and TASSANAKAJON, 2010; MULENGA et al., 2013; GULLEY *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que os inibidores são importantes também para os processos fisiológicos como os neuro-secretórios, a reprodução, o desenvolvimento de ovários, a ativação enzimática das diferentes cascatas enzimáticas envolvidas nos processos imunes e em particular com a via do fenol oxidase (KELLENBERGER & ROUSSEL, 2005; GUBB et al., 2010; CHRISTEN *et al.*, 2012).

Pela grande quantidade de proteases que participam nas vias das respostas imunes (como foi exposto brevemente acima), a regulação destas vias imunes precisa igualmente de uma ampla variedade de inibidores para ativar ou inibir uma determinada via em um determinado momento. É sabido que os inibidores regulam essas cascatas enzimáticas por inibição seletiva de proteases, assim, por exemplo, as serino proteases da via Toll são reguladas por inibidores tipo Kunitz e SERPIN, enquanto que na via da Jak/Stat e do fenol oxidase participam outros inibidores como os Pacifastin ou SERPINs (SHI & PASKEWITZ 2006; AN et al., 2011; CHRISTEN et al., 2012; HAN et al., 2014; HILLYER 2016).

3.7. Classificação dos Inibidores

Os inibidores são classificados em função de algumas características: 1- Uma unidade inibitória pode ser até bem menos do que 7 % do total dos resíduos de aminoácidos (a.a.) da cadeia polipeptídica completa. 2- Os resíduos dos sítios ativos na unidade inibitória (RCL) são geralmente conservados, mas às vezes a sequência muda, por isso é possível ter sequências com ou sem atividade inibitória. 3- O tipo de interação com suas enzimas alvo, mesmo que variem, em geral, pode atuar de duas formas, como irreversível com formação de ligação covalente (reação armadilha) e reversível ou “*tight-binding*” (reação de ligação apertada) (RAWLINGS et al. 2004).

A maior dificuldade na classificação dos peptídeos inibidores são suas sequências de a.a., pelo fato de uma proteína poder conter múltiplos domínios inibidores homólogos na mesma cadeia polipeptídica. Estes domínios podem ter sequências que são variáveis de uma proteína para outra, mas sem perder sua capacidade inibitória. Esta diversidade gera uma grande variedade de inibidores

distribuídos em muitas espécies de insetos, desta forma sendo necessário o agrupamento em diferentes famílias com diferentes mecanismos inibitórios. Os mais estudados nos insetos são as SERPIN, α_2 -Macroglobinas, Pacifastin, Kazal e Kunitz, (RAWLINGS *et al.* 2004; ZHAO *et al.* 2012; GUBB *et al.*, 2010, XU *et al.*, 2015).

3.7.1. SERPIN

Os inibidores I4 ou SERPIN (do inglês SERine Protease INhibitors) são inibidores de distribuição ampla entre os seres vivos. Aproximadamente há 500 Serpins identificados nos 4 reinos (Archae, Bacteria, Eukarya e Virus) (GENT *et al.*, 2003; RAWLINGS, 2004; GULLEY, 2013). Eles podem apresentar, em geral, proteínas de baixa massa molecular (10 kDa média), com uma alta homologia aos inibidores do tipo Kunitz ou também pode ter proteínas de massa molecular maior (média de 45 kDa) sendo estes os mais frequentes (SCHOOF & SALZET, 2002; RAWLINGS, 2010).

Geralmente formam uma cadeia entre 350 a 400 resíduos de a.a., em que os resíduos do RCL são compostos por aproximadamente 20 a.a. perto da região C terminal. O RCL fica exposto em forma de isca interagindo com o sítio ativo da protease alvo, formando enlace covalente com o sítio, sendo também conhecidos como inibidores suicidas (Figura 3) (GUBB *et al.*, 2010).

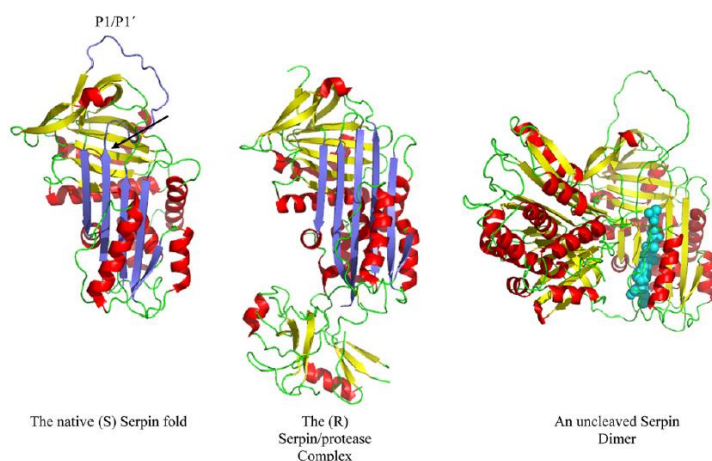


Figura 3. Interações SERPIN com tripsina (GUBB *et al.*, 2010).

A duplicação dos genes SERPIN é muito frequente nos insetos, o que possivelmente permite obter novas funções ou podem apresentar funções redundantes ou sobrepostas (OCHIENG *et al.*, 2013). Além disso, Zou e colaboradores (2009) utilizaram esta característica para organizar esta superfamília em 6 grupos; A, B, C, D, E e F.

3.7.2. α 2-Macroglobinas

As macroglobulinas são proteínas de alta massa molecular (até 600 kDa aproximadamente) nomeadas como I39 pelo sistema MEROPS. Sua origem é ainda incerta, visto que a família I17 (WAB) está filogeneticamente relacionada às α 2-Macroglobinas, isto é devido provavelmente ao resultado de uma evolução estocástica de nascimento-e-morte sem uma divergência funcional relevante. As famílias I51, I87 e I93 (também emparentados evolutivamente com I39), apareceram pelas duplicações de um gene ancestral dando origem a diferentes mecanismos inibidores, conservados na maioria dos clados de artrópodes (RAWLINGS, 2010; ALFONSO & MARTINEZ, 2017).

Cada subunidade de uma α -Macroglobina contém um RCL, que no momento que a enzima cliva um desses sítios gera uma mudança conformacional e a protease torna-se ligada ao inibidor através das lisinas e argininas na superfície. Esse processo permite a captura da proteinase na cavidade formada pelo tetrâmero (em vertebrados) ou pelo dímeros (em invertebrados) das subunidades (FARADY & CRAIK, 2010). Esta mudança conformacional leva a formar uma ligação covalente entre a região tiol-éster da α -macroglobina e a lisina da cadeia polipeptídica da enzima. Como a interação com o centro catalítico da enzima não é persistente, o complexo continua hidrolisando substratos artificiais ou moléculas pequenas que conseguem acessar na região catalítica da enzima, porém os substratos como proteínas não são mais hidrolisados (KANOST, 1999; RAWLINGS *et al.*, 2004; RAWLINGS, 2010)

Estes inibidores participam da defesa nos insetos contra a infecção por patógenos, atuando sobre as proteases. Têm uma faixa ampla de proteases que inibem, mesmo que geralmente a sua atuação ocorra sobre as endopeotidases e oligopeptidases, embora os exemplos sejam poucos (RAWLINGS, 2010).

3.7.3. Pacifastin

Dentro da classe insecta, estes inibidores, identificados como I19, estão presentes em todos os ordens (RAWLINGS, 2010). Análises *in silico* de 3 phyla de Metazoa permitiu a identificação de diferentes membros de pacifastin, assim como nos phyla Artropoda, Onychopora e no “primitivo” Placozoa. Isso indica que possivelmente o gene ancestral de pacifastin surgiu depois da aparição de animais bilaterados, embora não é descartada a possibilidade de uma convergência entre estes genes (BREUGELMANS *et al.*, 2009b).

No inseto *Locusta migratoria* foi isolado inibidores pacifastin do corpo gorduroso, de células neurosecretoras e da hemolinfa. Assim como também foram detectados nos tecidos hematopoiéticos, no músculo, nos testículos, nos ovários e em epidermes (BREUGELMANS *et al.*, 2009b). Estas proteínas são geradas no cérebro e transportadas à hemolinfa e pode ter participação na regulação da proPO, nos processos neurofisiológicos, na muda, na reprodução, no desenvolvimento ovárico e possivelmente na regulação do sistema imune. Também um inibidor desta família foi isolado do veneno da vespa *Pimpla hipochondriaca*, que é conhecida pela sua influência no sistema imune nos organismos (BREUGELMANS *et al.*, 2009a).

Todos os pacifastin estão organizados com uma sequência N terminal sinalizadora seguida de uma enorme variabilidade de domínios inibidores, que são denominados PLDs (Pacifastin Light Chain Domain). Cada um destes domínios é composto pelo RCL que interage com a protease formando três pontes bissulfeto (Cys1-4, Cys 2-6. Cys 3 -5) (KELLENBERGER & ROUSSEL, 2005; RAWLINGS *et al.*, 2004).

Os I19 têm sítios de clivagem difásico, o que indica processamento pós-transcricional e “*splicing*” alternativo dentro de numerosos peptídeos inibidores. Os diferentes processamentos destes peptídeos originam uma alta variabilidades do núcleo interno, onde as interações contribuem para uma ampla diversificação funcional (BREUGELMANS *et al.*, 2009a). Pela estrutura das proteínas, os Pacifastin são organizados em dois grupos (I e II), apesar de apresentarem poucas diferenças entre os inibidores dos grupos, principalmente na volta P6-P10 que tem

duas configurações diferentes discriminatórias (KELLENBERGER and ROUSSEL, 2005). Apresentam uma baixa atividade para tripsina de mamíferos, embora, nos crustáceos e nos insetos seja observado uma alta seletividade para as tripsinas deles. Por outro lado, são fortes inibidores para as enzimas do intestino médio dos invertebrados (KELLENBERGER & ROUSSEL, 2005; DE MARCO *et al.*, 2010).

3.7.4. Kazal

A família II Kazal ou KPIs (inibidores de proteases tipo Kazal) (RAWLINGS, 2010) encontra-se distribuídos em mamíferos, nas aves, nos invertebrados e nos insetos. Estes estão também amplamente presente na maioria das classes dos artrópodes, nos quais possuem diferentes funções como anticoagulante em hematófagos, como defesa contra os predadores e patógenos em diferentes espécies (ALFONSO & MARTINEZ 2017).

GUBB e colaboradores (2010) tem reportado que em *Drosophila* estas sequências foram encontradas na matriz extracelular com função sinalizadora. Além disso, eles relataram sobre a participação de peptídeos em processos como receptores de sinal em proteínas de fluido seminal, na indução da ecdysona, nucleotídeos cíclicos, longevidade, transporte de ânions orgânicos, sinalização Dpp e na morfogênese das veias das asas.

Em invertebrados, como em *Hydra magnipapillata*, estes inibidores evitam a auto degradação excessiva nas células das glândulas e digestivas endodermis, quando envolvidos nos processos de degradação celular e reciclagem dos componentes utilizados nos lisossomos (CHERA *et al.*, 2006 reportado por RIPHANITCHAYAKIT & TASSANAKAJON, 2010)

Todos os domínios Kazal dos invertebrados tem entre 40 a 60 a.a. com estrutura similar, apresentando seis resíduos de cisteína muito conservados, que formam três domínios internos com pontes bissulfeto. As sequências inibitórias características da família podem estar associadas em uma mesma cadeia proteica com várias famílias diferentes como Kunitz (é pouco frequente, mas, estas proteínas são conhecidas como complexos inibidores). Já foram isoladas proteínas com 2 e até com 15 sequências inibidoras (GUBB *et al.* 2010).

Os KPIs dos insetos são inibidores muito fortes, com um mecanismo canônico de inibição e com uma constante de associação de 10^7 - 10^{13} M⁻¹, pelo que os K_i estão na faixa de nanomolar. Eles, atuam como substrato análogo que se une estequiometricamente por união competitiva do RCL e o sítio ativo da proteinase formando um complexo estável proteinase-inibidor. (RIPHANITCHAYAKIT AND TASSANAKAJON, 2010; FARADY & CRAIK, 2010).

3.7.5. Kunitz

Estas proteínas, classificadas na família I2 (RAWLINGS, 2010), têm um domínio simples de aproximadamente 60 a.a. com capacidade de inibir a tripsina e a quimiotripsina (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015). Também em alguns invertebrados bloqueiam os canais de K⁺ sensíveis à voltagem. Podem também ter atividade inibitória para outras enzimas diferentes das serino proteases, como as cisteíno proteases como a papaína, as aspártico proteases (pepsina) e algumas metalo proteases (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015).

Algumas proteínas Kunitz têm sido encontradas na hemolinfa, nas fibras dos casulos e nas secreções das glândulas salivares para a formação da pupa de alguns insetos e são de aproximadamente 10 a 20 kDa (RAI et al., 2010; GUBB et al., 2010). Em *Drosophila*, a maioria destes inibidores encontrados formam peptídeos simples, mas é possível que em uma mesma cadeia polipeptídica esteja contida mais de um sequencia inibitória (domínios) Kunitz, porque já foram identificadas 6 proteínas com até 13 sequências inibitórias (GUBB et al. 2010).

As proteínas desta família incluem inibidores com mecanismo canônico e com estruturas similares ao inibidor de tripsina pancreática bovina BPTI (pelas suas siglas no inglês). Apresentam uma forte interação com as proteases alvo (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015). O mecanismo padrão de inibição, ou canônico, no qual o inibidor acopla seu RCL e os resíduos reativos nas regiões complementares da protease (FARADY & CRAIK, 2010).

Estes inibidores de protease apresentam uma atividade flutuante durante o desenvolvimento do inseto, principalmente durante a etapa de lagarta (estado de maior atividade proteica da metamorfose). A inibição está envolvida na degradação e

reconstrução de tecidos (ARATAKE *et al.*, 1990; LIU. *et al.*, 2018). A partir de análises de cDNA foram identificadas sequências inibitórias em proteína da matriz extracelular. Lacunin, em *M. sexta* com 11 domínios Kunitz e aparentemente tem a função na dobraagem das camadas epiteliais no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento da metamorfose (KANOST, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Criação dos insetos

Os insetos de *A. gemmatalis* foram obtidos do laboratório de criação do departamento de entomologia e do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular de UFV. Mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, $52 \pm 5 \%$ e 12:12 h luz-escurecimento, respectivamente.

As pupas do inseto foram colocadas em placas de petri no interior de gaiolas telada de 50x50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite A4. As fêmeas alimentadas e fertilizadas ovipositaram no papel (Fig. 4). Os ovos foram coletados e armazenados em copos de 500 mL, totalmente fechados até a sua eclosão. As neonatas foram transferidas, no segundo instar, para copos de plásticos limpos e esterilizados contendo dieta artificial, fechados com tampas com um orifício de aproximadamente 2 cm de diâmetro, onde foi acoplada uma tela de filó. Depois de quatro dias, as lagartas foram transferidas em grupos menores para copos plásticos com deita suficiente até a pupação (Fig. 4). Essa quantidade de indivíduos que normalmente foi utilizada na criação massal variou de 15 a 30 larvas por pote.

Os adultos foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (20 g), cerveja (350 mL), sacarose (50 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagim (1,05 g) e água (650 mL). A mistura foi embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola (Fig. 4A) sobre uma placa de Petri (80x15 mm) e trocado todos os dias.

As lagartas foram alimentadas com dieta artificial baseada na metodologia de Hoffman-Campo et al. (1985). Tal dieta foi composta por: feijão mulatinho (250 g) cozido, levedo de cerveja (125 g), germe de trigo (200 g), proteína de soja (100 g), caseína (100 g), ágar (75 g) e água (4 L). O ágar e 1 L de água foram autoclavados por 15 min à pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$. A essa mistura adicionaram-se os outros ingredientes e 2 L de água, com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida, adicionou ácido ascórbico (13,2 g), ácido sórbico (6,6 g), nipagin (metilparabeno) (11 g), formol 40 % (14 mL) e 33 mL de solução vitamínica (composta por niacinamida (1 mg), pantotenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02

mg), inositol (20 mg)) e água (1 L), até formar uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente para um recipiente. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida sob luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

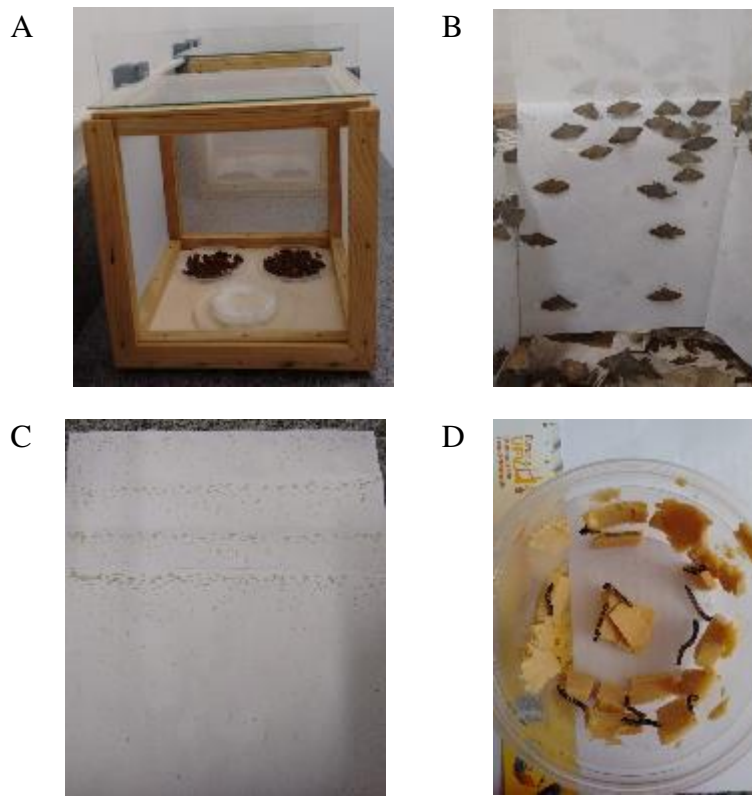


Figura 4. Criação de *Anticarsia gemmatalis*. (A) Gaiola para acasalamento em que as fêmeas adultas foram dispostas para deixar os ovos; (B) Adultos com posturas; (C) Folhas com ovos; (D) Lagartas no quarto instar.

4.2. Grupos de lagartas experimentais.

4.2.1. Lagartas estressadas por alta densidade populacional.

Os imaturos de *A. gemmatalis* expressam diferentes cores na sua cutícula de acordo com a densidade populacional, assim, a maior densidade populacional maior a melanização no corpo do inseto. Baseados nesta característica o fenótipo foi determinado de acordo com a cor da capsula cefálica e do corpo segundo Silva et al (2013). As lagartas que foram mantidas desde o primeiro até o último instar larval em baixa densidade populacional (2 larvas por pote de 500 mL) foi determinada

como a população não estressada de insetos. Seu fenótipo característico é apresentar corpo verde-oliva com proeminentes linhas laterais pretas e a capsula cefálica verde-amarela. As lagartas em que seu desenvolvimento larvar foi em alta densidade de populacional (30 lagartas por pote de 500 mL) foram os indivíduos considerados como insetos estressados. Para estes indivíduos seu fenótipo característico é apresentar corpo preto e com a capsula cefálica entre amarela e laranja.

4.2.2. Lagartas com e sem estresse por dano mecânico.

Das lagartas com e sem estresse por alta densidade populacional foram divididas em dois subgrupos. Assim, grupo um e dois (G1 e G2), população sem estresse; grupos três e quatro (G3 e G4) populações com estresse. As larvas dos G2 e G4 receberam dano mecânico no momento que foi feito um pequeno orifício com alfinete entomológico número 2, no segundo esclerito entre a primeira e a segunda perna torácica. Os grupos G1 e G3 foram os imaturos controles sem estresse por dano mecânico.

4.3. Obtenção da hemolinfa livre de hemócitos (HLH) e extração das proteínas

A HLH foi coletada das lagartas sem estresse por dano mecânico após os insetos atingirem o segundo dia do último instar larval. Para as lagartas que receberam o tratamento do dano mecânico, a HLH foi coletada 24 horas após do ferimento com o alfinete. A HLH foi obtida cortando a falsas pernas anais, e coletada em eppendorfs frios contendo 0.2 % de uma solução de fenil tiourea em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,5. A hemolinfa foi centrifugada a 15000 g por 15 minuto a 4 °C e o sobrenadante, hemolinfa livre de hemócitos (HLH) foi guardada -80 °C até seu uso. Aproximadamente 650 µg de proteínas foram obtidas de cada um dos grupos, precipitadas com 100 % de acetona e incubadas a -20 °C por 60 minutos, logo centrifugada a 12000 g por 15 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetona fria, centrifugando 12000 g por 10 minutos. O objetivo foi tirar os carboidratos, gorduras e outros possíveis interferentes da amostra.

4.4. Eletroforeses bidimensional de poliacrilamida (2DE)

As proteínas das amostras foram levadas a focalização isoeletrica (IEF) em fitas de 24 cm IPG pH 3-10 (GE Healthcare). Inicialmente as fitas foram reidratadas entre 14 – 20 horas em 450 µL de tampão de reidratação (ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %, tampão IPG 1 % e DTT 0.2 %) com 3 µL de 50 % de DeStreak (GE Healthcare). As proteínas da HLH foram separadas na primeira dimensão a 20 °C usando um sistema de IEF IPGphor3 (GE Healthcare), a voltagem da corrida foi 500 V por uma hora; seguida por 1000 V por oito horas; o gradiente linear foi de 8000 V sobre quatro horas e finalmente 8000 V para um total de 80,000 V.h. Após a IEF, as fitas foram transferidas ao tampão de equilíbrio (ureia 6 M, tampão Tris HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30 % e SDS 4 %) contendo inicialmente 1 % (m/v) de DTT e depois com 2,5 % (m/v) iodoacetamida, ambos incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. As fitas de IPG foram colocadas em gel de poliacrilamida 12 % e sobrepostas com 0,5 % de agarosa em SDS-PAGE. A eletroforeses no gel foi corrida a 20 °C no SE 600 Ruby systems (GE Healthcare) a 40 mA/Gel por 5 horas. Os géis foram corados com solução de azul de *Coomassie* G-250 (sulfato de amônio 8 % (v/v), ácido fosfórico 0.8 % (v/v), azul *Coomassie* G-250 0.08 % (v/v) e metanol 20 % (v/v)). Após de tirar o excesso do corante os géis foram digitalizados usando o Scanner Image III (GE Healthcare), calibrado com o software Labscan (GE Healthcare). O perfil das proteínas da HLH dos 4 grupos dos tratamentos (G1, G2, G3 e G4), foram comparados usando o software ImageMaster2D Platinum 7 (GE healthcare). Como o limiar, considerou-se como proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram valores de proporção acima de 1,5 (normalização do rádio), com uma ANOVA com um P-valor igual ou menor de 0,05 presente nos géis das réplicas biológicas. Assim foram identificadas dois possibilidades; *spots* compartilhados nos géis que estavam sendo comparados, mas com um $P \leq 0,05$; *spots* que foram identificados só em um dos dois géis comparados. As duplas das análises foram: análises A, foi a comparação dos géis dos insetos dos G1 e G2; a análise B foi a comparação dos géis dos insetos dos G1 e G3 e a análise C foi a comparação dos géis dos insetos dos G3 e G4.

4.5. Processo de purificação dos inibidores

4.5.1. Obtenção da hemolinfa livre de hemócitos (HLH)

A partir da criação massal foram selecionados os indivíduos no segundo dia do último instar larval, com o intuito de obter indivíduos com estresse por superpopulação, estes foram os insetos mantidos nas condições descritas no item 4.2.1. Suas características mais predominantes foram apresentar a cutícula do corpo escuro e uma cápsula cefálica amarelo-laranja (SILVA et al., 2013). Estas foram anestesiadas por refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos. Em seguida, foram rapidamente desinfetadas com álcool 70 %. Com o auxílio de uma tesoura para dissecação de insetos, foram cortados os últimos pares de pernas falsas, para permitir a coleta do fluido (hemolinfa). Com o auxílio de uma micropipeta com ponteira de $200\text{ }\mu\text{L}$, foi sugada a hemolinfa do inseto e adicionada em tubos de centrifuga previamente tratados com $20\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução saturada de feniltiureia (PTU) em tampão Tris HCl, 50 mM pH 8,5, para prevenir a melanização da amostra. A hemolinfa foi levada a centrifugação a 9500 g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi descartado, para a retirada de qualquer contaminante macroscópico da hemolinfa, tais como restos de tecidos e células do animal. O sobrenadante, denominado de hemolinfa livre de hemócitos (HLH), foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores (CHERQUI et al., 2011; CHRISTENA et al., 2012).

4.5.2. Quantificação das proteínas

Os teores proteicos das amostras foram determinados pelo método de Bradford (1976) utilizando o corante *Comassie Blue G-250* e a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Com as amostras que tiveram os valores de densidade óptica baixos, foi utilizado o método de linearização para quantificação das concentrações de proteínas (ERNEST & ZOR, 2010).

As leituras foram realizadas por triplicata em microplacas de polietileno de 96 poços após 10 minutos de reação, a temperatura ambiente, e leituras de absorvância no comprimento de onda de 595 nm e na linearização a 590 e 450 nm.

4.5.3. Cromatografias

Para cada cromatografia foi aplicada 5 mL HLH na coluna *HiTrapTM benzamidine Fast Flow (high sub)* (1x5 mL) para remoção das tripsinas *like*, acoplada ao sistema de FPLC *Amersham* modelo UPC-900. A coluna foi equilibrada com 25 mL de tampão Tris HCl 50 mM, NaCl 0,5 M pH 8,2 em cada cromatografia foram aplicados 65 mg de proteínas totais, previamente filtrada em membrana de 0,45 µm (*Chromafil[®]* 0,45 µm/15 mm). As proteínas foram eluídas com fluxo isocrático de 1,0 mL/min do tampão Glicina-HCl 50 mM, pH 3,0 e monitoradas por leituras de absorvância a 214 nm. As frações foram coletadas a cada 1,0 mL no modo automático, utilizando um coletor de frações *Amersham FRAC-920*.

As frações obtidas foram agrupadas em *pools* de acordo com a concentração das proteínas (µg/µL), o perfil proteico e sua atividade inibitória. O *pool* (A) compreendia as frações com conteúdo proteico até 1,5 µg/µL e uma inibição menor de 20 %. Os *pools* (B), (C), (D) e (E) corresponderam às frações com uma inibição igual ou maior de 30 %, mas a concentração de proteínas foram de aproximadamente entre 2,0 e 3,0 µg/µL para (B) e (C), entanto que (D) e (E) tiveram uma concentração aproximada de 1,0 µg/µL. Volumes de aproximadamente 45 mL de cada *pool* foram liofilizado. Em seguida 500 mg do liofilizado foram ressuspensos em 4 mL de água ultrapura (Milli Q) e filtrado com membrana de 0,45 µm (*Chromafil[®]* 0,45 µm/15 mm). Uma coluna *HiTrap[®] Desalting* foi utilizada para dessalinização. Alíquotas de 2,5 mL foram aplicadas de modo automático em uma coluna de troca aniônica BIO-RAD MT-20 de 15 x 113 mm, previamente equilibrada com 10 volumes do tampão Tris HCl 50 mM pH 8,2.

Para eluição foram utilizados os tampões A (Tris HCl 50 mM pH 8,2) e B (Tris HCl 50 mM + NaCl 1,0 M pH 8,2) com o seguinte gradiente: 0-30 % B em 20 minutos; 30-80 % B em 10 minutos; 80-0 % B em seis minutos (SHRIVASTAVA & GHOSH, 2003). As proteínas eluídas foram monitoradas por 214 nm e foram coletadas em frações de 1 mL.

Finalmente, as frações com atividade inibitória igual ou maior de 30% foram fracionadas utilizando um filtro Amicon Ultra de 50 kDa para garantir a exclusão das proteínas de alta abundância apresentando massa superiores de 50 kDa.

Para cada etapa além da concentração das proteínas, foram calculadas as unidades inibitórias (UI), a atividade específica (A.E) e a recuperação da inibição.

4.5.4. Eletroforeses.

A análise das proteínas foi realizada por SDS-PAGE baseado na metodologia de Cherqui et al. (2001), Oliveira et al. (2005) e Mehrkhou et al. (2012). Todas as amostras foram desnaturadas por calor durante um minuto a 100 °C, em uma solução tris HCl 0,06 M pH 6,8 contendo azul de bromofenol 0,005 %, SDS 10 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 0,5 %. Aliquotas de 20 μ L (contendo aproximadamente 30 μ g de proteína) foram aplicadas em cada canaleta e foi utilizado o padrão de massa molecular da BIO-RAD (200; 116,25; 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4 e 6,5 kDa). Os géis foram submetidos a uma voltagem constante de 20 mA/gel durante 45 a 60 minutos até que a frente do corante atingir 1,0 cm do final do gel.

Após a corrida eletroforética os géis foram fixados em metanol 50 %, ácido acético 12 % por 90 minutos, seguido por três lavagens por 20 minutos de uma mistura de etanol 10 % e ácido acético 5 %, e depois por duas vezes por 10 minutos com água destilada esterilizada.

Depois de fixado e lavado, os géis foram submersos numa solução de Comassie blue 0,1 %, sulfato de amônio 10 %, ácido fosfórico 2 % e metanol 20 % tudo em água ultrapura. Os géis foram deixados corando por 16 horas. Finalmente foram descorados e digitalizados utilizando o *ImageScanner* III (GE Healthcare) e as imagens calibradas com o *Labsan software* (GE Healthcare).

4.6. Cinética

4.6.1. Avaliação da atividade inibitória

Para avaliar a atividade enzimática na presença e ausência dos inibidores foram utilizados três modelos. Um modelo com cisteíno proteases, purificado de papaína comercial do mamão (EC3.4.22.2), *Carica papaya* (SIGMA-ALDRICH de 11,4 U/mg) e os outros dois modelos de serino proteases, tripsina comercial purificada de pâncreas bovino (EC3.4.21.4) (SIGMA-ALDRICH 9949 U/mg) e serino proteases semipurificada do intestino de *A. gemmatalis* (tripsina-like).

Para avaliar o efeito de inibidores purificados na atividade de cisteíno protease foi utilizada a papaína, de acordo com GUO et al., (2015) com algumas modificações: uma solução estoque de papaína 0,1 mg/mL foi preparada em tampão fosfato 250 mM pH 6,0. Foram combinados 50 µL desta solução com 20 µL do tampão de ativação (fosfato de sódio 250 mM, DTT 3 mM, EDTA 2 mM pH 6,0). Os tubos foram incubados por cinco minutos a 37 °C e, imediatamente foi acrescentado 130 µL de uma mistura da amostra purificada e tampão fosfato de sódio 250 mM para um volume final de reação igual a 200 µL. Os tubos foram incubados por mais 10 minutos a 37°C. Foi adicionado 100 µL de uma solução de azocaseína 10 %. Finalmente a mistura foi incubada por mais 20 minutos a 37 °C. A reação foi parada acrescentado 500 µL de TCA 10 % (p/v), em seguida foi centrifugado a 13000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e misturado com 200 µL de NaOH 2 M. Alíquotas foram utilizadas para análises espectrométricas a 440 nm, e posterior quantificação utilizando o coeficiente de extinção molar de 98 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto.

O percentual de inibição foi determinado a partir das leituras do produto da reação enzimática do controle e da reação das enzimas com as amostras, baseado na equação 1.

$$%i = 100 - \frac{AE_i 100}{AEC} \quad (1)$$

Onde AE_i é a atividade enzimática da mistura enzima, tampão ativador e substrato com o inibidor; AEC é a atividade enzimática controle ou a atividade

enzimática da mistura enzima, substrato, tampão de ativação sem o inibidor. A atividade enzimática foi calculada em $\mu\text{mol}/\text{sg}$ baseada na seguinte equação:

$$AE = \frac{\Delta abs}{\epsilon * T * L} \quad (2)$$

Onde Δabs é a diferença da absorvência final e inicial do produto gerado na hidrólise do substrato; ϵ é o coeficiente de extinção molar; T o tempo total da reação; e L caminho ótico (caminho recorrido pela luz dentro da mistura de reação = 1cm).

Como substrato sintético para os dois modelos de serino proteases utilizou-se o *L*-BAPNA (SIGMA-ALDRICH) numa concentração de 1,2 mM. A concentração do produto ρ -nitroanilina, liberado na hidrólise enzimática do BAPNA, foi avaliado em espectrofotômetro (Hitachi U-5100) a 410 nm ao longo do tempo (150 segundos). Para os cálculos, usou-se $88000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como o coeficiente de extinção molar específico para ρ -nitroanilina. No branco foi utilizado o substrato com o tampão de ativação sem proteases (PAIXÃO et al., 2013). A mistura da reação está descrita na Tabela 1, baseada nas metodologias descritas por Cherqui et al. (2001), Rai et al. (2010), Aspan & Söderhäll (1987) e Sugumaran et al. (1985) o teste consistiu em: alíquotas da tripsina pré-incubadas com as amostras purificadas e o tampão de ativação por cinco minutos. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se o substrato enzimático (BAPNA). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 2,5 minutos, a liberação do produto foi monitorada a cada 30 segundos no espectrofotômetro a 410 nm.

As tripsinas-*like* foram obtidas a partir do intestino de *A. gemmatalis*. Para avaliar a atividade destas proteases foram extraídos 20 intestinos de indivíduos no último instar larval, homogeneizados com HCl 10^{-3} M pH 3,0 a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (cinco intestinos para 1 mL de HCl). O extrato enzimático foi obtido por rompimento celular dos intestinos por maceração em cadinho com nitrogênio líquido e em seguida foi centrifugado a 15.000 g por 10 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (OLIVEIRA et al., 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel foi filtrado com Millex® GV de $0,22 \mu\text{m}$ e subsequentemente aplicados em coluna de afinidade sefarose-benzamidina de acordo com as condições descritas no subtítulo 4.5.3, exceto as alíquotas coletadas foram

aquelas que saíram logo depois de aplicar o tampão de eluição (Glicina HCl pH 3,0) no FPLC (PATARROYO et al., 2017). As frações com atividade enzimática foram as utilizadas como as enzimas no teste descrito acima.

O tampão de ativação consistiu em HCl 0,1 mol.L⁻¹, CaCl₂ 20 mmol.L⁻¹ pH 8,2. Foi realizado o controle de pro-fenol oxidase (PPO), para garantir que a mostra avaliada não tivesse enzimas com capacidade de degradar o substrato e assim mascarar a atividade das tripsinas testadas ou sua inibição.

Tabela 1. Teste de atividade enzimática para serino proteases.

Reagentes	Branco	Controle Positivo	Controle de PPO	Teste
Tampão de ativação	700µL	640µL	700µL – (X µL)	640µL – (XµL)
Enzima	-	60µL	-	60µL
Substrato	300µL	300µL	300µL	300µL
Amostra	-	-	XµL	XµL
Volume Final	1000µL	1000µL	1000µL	1000µL

O percentual de inibição foi determinado a partir das leituras do produto da reação enzimática controle e da reação das enzimas com as amostras, baseado nas equações 1 e 2.

4.6.2. Constante de inibição

Para a determinação da constante de inibição foi calculada a velocidade inicial da hidrólise do substrato a fim de estimar o valor do K_i . Foram realizados ensaios de acordo com cada modelo. Para o modelo de cisteíno proteases, os ensaios foram conduzidos com concentrações finais de azocaseína de 0,08; 0,17; 0,42; 0,7 e 1,4 mM e utilizou-se 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 μg do inibidor.

Para o modelo de serino proteases, tanto para a tripsina bovina como para a tripsina-like do intestino de *A. gemmatalis*, foram baseados na metodologia de Erlanger et al. (1961). A mudança da atividade amidásica foi determinada utilizando-se o substrato cromogênico *L*-BAPNA (N- α -12 Benzoil-*L*-arginine-4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com CaCl_2 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 640 μL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (menos o volume da amostra testada); 300 μL de substrato e 60 μL da tripsina bovina, para uma quantidade final de 72 μg enzimas na reação. Para as tripsinas-like foram utilizados aproximadamente 7 μl para uma quantidade final de 60 μg de enzimas.

As concentrações do substrato para a cinética foram de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mM. As quantidades testadas dos inibidores foram de 1,12; 2,25; 4,5; 6,0 e 9,0 μg para os ensaios com a tripsina bovina; 3,32; 13,29 e 16,6 e 24,92 μg para o ensaio com as tripsinas-like. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilina. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e de acordo com a descrição do subtítulo 3.6.

4.6.3. Análise cinética

Os parâmetros cinéticos foram calculados pelas medidas da absorbância do produto gerado nas reações substrato-enzima na ausência e na presença de diferentes concentrações do inibidor. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* para a regressão linear e não-linear. O método linear usado foi o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, a equação geral da velocidade para esse modelo é:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

A equação 3 dá como resultado um gráfico não linear e baseado no rearranjo desta equação pode se obter a equação 4 que representa esta linearização dos dados:

$$\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Para verificar o modelo de inibição foram utilizados o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk e o gráfico das inclinações obtido a partir dos dados dos gráficos dos recíprocos versus a concentração do inibidor. As equações 5 e 6 representam respectivamente os modelos gráficos do duplo recíproco e o gráfico das inclinações.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

$$\text{Inclinação}_{\frac{1}{S}} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

A utilização de mais de um tipo de gráfico se deve ao fato que podemos ter modelos cinéticos diferentes apresentando o mesmo perfil de um dado gráfico.

4.7. Estabilidade dos inibidores

4.7.1. Temperatura

A metodologia para determinar a estabilidade térmica dos inibidores foi baseada em Sugumaram et al. (1985), com algumas modificações. Um volume da mistura inibidor-tampão (Tris HCl 50 mM pH 8,2), contendo as quantidades em μg do equivalente ao K_i , foi incubada a 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 9500 g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, alíquotas do sobrenadante foram utilizadas nos ensaios de atividade

inibitória sobre a tripsina. Os ensaios foram realizados com triplicata e os testes em branco foram também realizados. Para determinar a significância das diferenças das médias foi determinada a ANOVA das médias das velocidades enzimáticas das enzimas com as temperaturas.

4.7.2. pH

Para avaliar a estabilidade dos inibidores em variação do pH seguiu-se a metodologia de Gomes et al. (2005a), com algumas modificações. Uma quantidade em μg equivalente ao K_i do inibidor foram misturados com 100 μL do tampão com o pH desejado, os quais foram glicina HCl pH 6,3; 7,2; 7,8 e Tris HCl pH 8,2; 8,7 e 9,2. Após 60 minutos de incubação em temperatura ambiente foi utilizada a metade do volume para o teste de inibição, os testes em branco foram também realizados. Para determinar a significância das diferenças das médias utilizou-se a ANOVA das médias das velocidades enzimáticas das enzimas com os diferentes pH.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil proteico bidimensional das proteínas expressadas na hemolinfa das lagartas de *A. gemmatalis*.

Depois da extração das proteínas da HLH foram feitos os géis bidimensionais com as fitas de IPG de pH 3,0 a 11,0 e a massa molecular variou desde 14 a 200 kDa. Os mapas da distribuição das proteínas foram obtidos de três repetições independentes, digitalizadas e comparadas com o software *ImageMaster Platinum* dando como resultado uma alta reprodutibilidade (Fig. 5).

As imagens obtidas dos géis foram analisadas pelo software *ImageMaster* (GE Healthcrade), os *spots* com uma boa resolução foram os escolhidos para as análises. Cada tratamento foi analisado por triplicata e os géis amostraram uma correlação maior de 0,9 (Fig. 5). As análises dos géis 2D dos grupos de insetos do

tratamento G1 apresentaram 357 *spots*; do tratamento G2, 244 *spots*; do tratamento G3, 326 *spots* e do tratamento G4 foram 268 *spots* distribuídos pelo gel (Fig. 6).

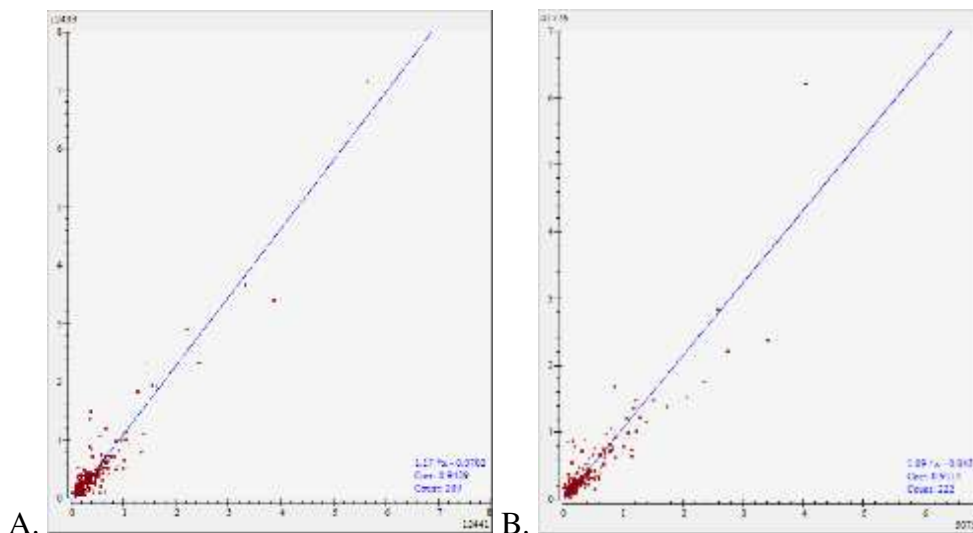


Figura 5. Reprodutibilidade das imagens dos géis dos tratamentos. (A) Gráfico da correlação dos tratamentos do grupo 1. (B) Gráfico da correlação dos tratamentos do grupo 4.

Comparando os *spots*, e seus pIs e as massas moleculares foi identificado que obtinham uma distribuição diferente dependendo do tratamento como é mostrado na Fig. 6, e na tabela 2.

Na análise A, comparação feita entre os indivíduos com e sem dano mecânico que tiveram seu desenvolvimento em baixa densidade populacional. Deu como resultado 85 proteínas com abundancia diferencial entre ambos grupos (G1 e G2) (Fig. 6). Foi observada uma tendência dos *spots* ficar concentrados em duas faixas, uma entre os pI's 4,4 até 6,2 com 63,5 % das proteínas. Outra faixa de pI em que ficaram o 25,9 % das proteínas foi entre o 6,3 e 7,7 de pI. Analisando a massa, obteve uma concentração de 82 % dos *spots* entre 11,7 e 80 kDa. Foram identificados 148 *spots* exclusivamente no G1, estes ficaram distribuídos em duas faixas de pI; O 67 % ficaram entre 4,3 até 6,4 e o 23 % ficaram entre 6,8 até 9,6. Para a massa molecular foram identificadas 96,6 % das proteínas entre 7,0 e 65 kDa. No G2 foram identificados 52 *spots* exclusivos dele, as proteínas ficaram distribuídas

homogeneamente entre o pH 4,2 até 7,5, com uma massa molecular de entre 15 e 83 kDa (Tabela 2).

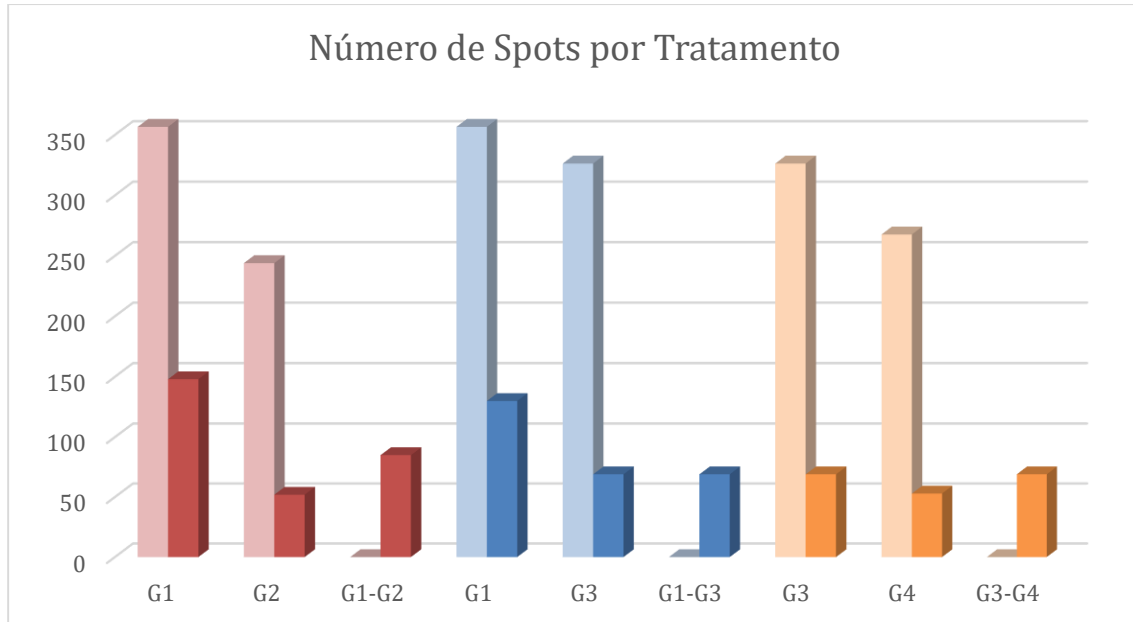


Figura 6. Número de *Spots* com abundância diferencial em cada tratamento por cada comparação. As barras claras representam a media dos números de *spots* por gel, as barras mais escuras representam os *spots* diferencialmente abundantes com um ANOVA ≤ 5.0 . As cores vermelha, azul e laranja são as análises A (comparação feita entre os tratamentos G1 e G2), B (comparação feita entre os tratamentos G1 e G3) e C (comparação feita entre os tratamentos G3 e G4) respectivamente.

Na análise B, comparação feita entre os indivíduos que tiveram seu desenvolvimento em baixa densidade populacional e os que tiveram seu desenvolvimento em alta densidade populacional, mas, as duas populações não receberam dano mecânico. Foram observados 69 *spots* com uma abundancia diferencial entre ambos os grupos do que, 87 % deles ficaram distribuídas na faixa de pH de 4,2 até 6,9 (Fig. 6 e na tabela 2). O 98,6 % dos 69 *spots* exclusivos do G3 ficaram na faixa de 9,5 até 66 kDa e no pH de 3,6 até 7,3. Entretanto que para os 130 *spots* com abundância diferencial exclusivos do grupo G1, o 90 % ficaram na faixa de 4,2 até 7,6 de pH e entre 7,3 e 39,7 kDa (Fig. 6 e na Tabela 2).

Tabela 2. Faixas de Massas moleculares e pI's

Análise	Experimento	Faixa Massa Molecular	%	Faixa pI	%
(A)	SFx2-Fx2	11,7 - 80	82,4	4.4 - 6.2	63.5
				6.3 - 7.7	25.9
				4.2 - 4.7	25.0
	Fx2	15 - 83	100	5.0 - 6.1	38.5
				6.2 - 7.5	30.8
	SFx2	7,0 – 65,0	96,6	4.3 -6.4	67.6
6.8 - 9.6				23.0	
(B)	SFx2-SFx30	9,5 – 66,3	98,6	4.8 - 6.9	87.0
	SFx2	7,3 – 39,7	90	4.2 - 7.6	89.2
	SFx30	19,3 – 64,7	95,7	3.6 - 7.3	98.6
(C)	SFx30-Fx30	56,2 – 66	97,1	4.0 - 7.9	98.6
	SFx30	20 – 64,7	95,7	3.6 - 7.0	97.1
	Fx30	13,7 – 92,7	90,6	5.5 - 8.0	88.7

Na análise C, foram 69 *spots* com uma abundancia diferencial entre ambos grupos (G3 e G4), ficou o 98 % deles na faixa 4,0 até 7,9 de pH e o 97 % destes *spots* ficaram entre 56 e 66 kDa. Nesta mesma comparação as 69 proteínas exclusivas do grupo G3, 97 % ficaram na faixa de 3,6 até 7,0 de pH com uma massa molecular entre 20 e 64,7 kDa, e finalmente das 53 proteínas exclusivas do grupo G4, 88,7 % ficaram entre 5,5 e 8,0 de pH com 90 % delas entre 13,7 e 92,7 kDa (Tabela 2).

5.2. Processo de purificação

Nesta etapa foram considerados dois parâmetros para a organização das amostras, o primeiro deles foi a concentração das proteínas e o segundo foi a atividade inibitória contra tripsina bovina pancreática. Esta protease foi selecionada para este fim para a padronização no processo de purificação e por ser uma enzima comercial (Sigma-Aldrich) com uma purificação de 90 %.

A partir da cromatografia de afinidade (coluna de benzamidina) foi obtido um total de 60 frações, sendo as primeiras 25 sem proteases e com uma concentração de proteínas entre 0,1 a 19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, estas frações foram agrupadas em *pools* (A, B, C, D e E). Das frações 26 até 42 igualmente sem proteases, porém contendo concentração entre 0,1 a 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas. Já nas frações 43 a 56 foram obtidas as serino proteases da HLH, com uma concentração entre 1,6 a 18,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 7A).

A fração 6 com uma concentração de 14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi a maior em relação à concentração de proteínas entre as primeiras frações. Porém esta e as outras 5 frações previas, apresentaram inibição abaixo de 20 % e oxidaram após 10 - 20 minutos, mesmo quando mantidas -4°C . Estas frações foram reunidas no *pool* A, mas, foram descartadas.

As maiores atividades inibitórias foram observadas nas frações 7, 9 e 13 com 52, 51 e 44 %, respectivamente (Fig. 7A). As frações 7 até a 13 obtiveram uma inibição meia igual ou maior a 30 % e uma concentração de proteínas variável (10-18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Já as frações 14 a 23 obtiveram uma inibição meia próxima de 30 %, mas a concentração de proteínas foi baixa, entre 1,9 e 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fig. 7A). As frações acima de 25 por não ter uma atividade inibitória significativa (por volta de 20 %) foram descartadas. Assim, pelas anteriores características (% de inibição e concentração de proteínas) e pelos perfis dos géis de SDS-PAGE, o *pool* B foi composta das frações 7 a 11, para o *pool* C com as frações 12 a 15, o *pool* D das frações 16 a 19 e o *pool* E com das frações 20 a 23.

As amostras pertencentes ao *pool* D e E não mantiveram a atividade inibitória após o processo de liofilização.

O perfil cromatográfico da eluição do *pool* B e C na coluna de troca iônica foram similares entre si, diferenciando-se na concentração de proteínas. O *pool* B

apresentou uma concentração levemente maior de proteínas do que no *pool C*. A cromatografia de troca iônica revelou somente um pico majoritário das sub frações com atividade inibitória, encontrando-se antes de iniciar o gradiente (frações 9 - 14). Para a concentração de proteínas foram detectados três picos: o primeiro das frações 11 - 13, segundo 24 - 28 e o terceiro de 36 - 40 (Fig. 7B).

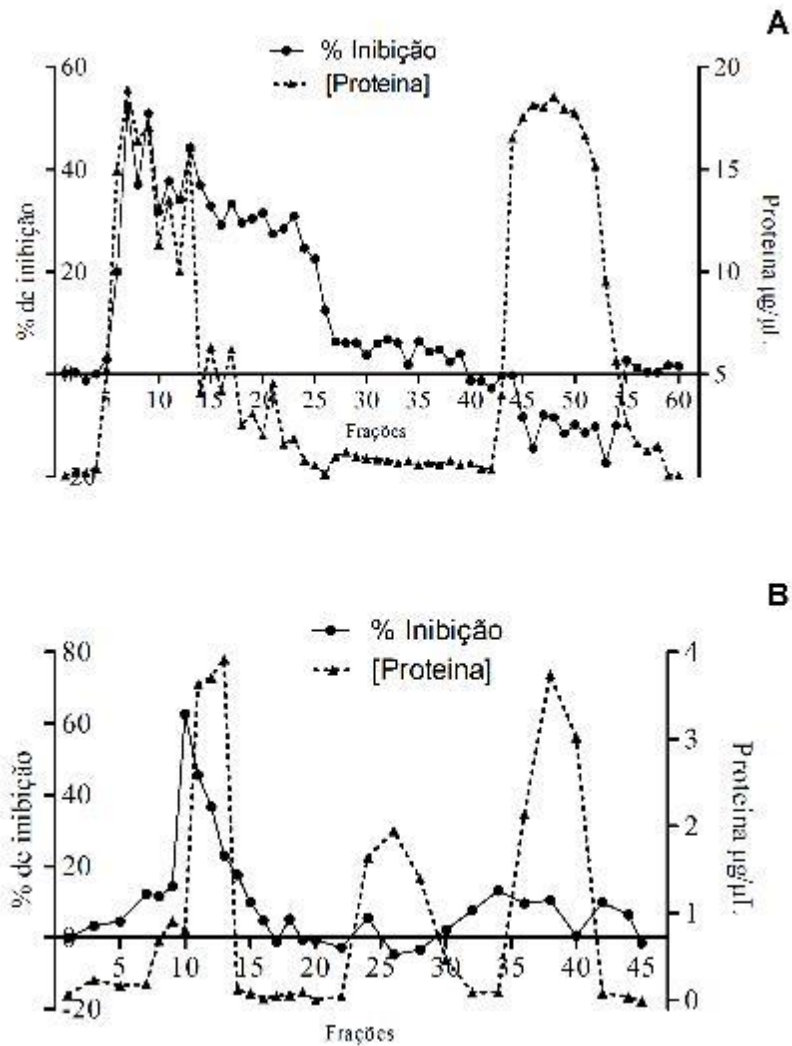


Figura 7. Perfis de eluição de proteínas do Plasma de *A. gemmatalis* por Cromatografia. As proteínas eluídas foram monitoradas pela absorbância a 280 nm. (A) Fracionamento do HLH pela coluna de Benzamidina; (B) Fracionamento pela coluna DEAE-Sepharose de troca aniônica das frações eluídas da cromatografia de afinidade com atividade inibitória.

As frações com maiores atividades inibitórias e concentrações de proteínas foram submetidas a filtração por tamanho. Foi utilizado o filtro de *cut-off* de 50 kDa para eliminação de proteínas de alta massas. Foi avaliada a capacidade inibitória das proteínas retidas no filtro e daquelas proteínas eluídas (MW menor que 50 kDa). Maiores atividades de inibição foram observadas para proteínas de MW menor que 50 kDa.

Tabela 3. Processo de purificação do inibidor da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis*: Modelo serino proteases

Etapa purificação	Proteína total (µg)	UI	A.E. (UI/µg)	Recuperação (%)	Purificação
HLH	965,00	808,64*	4,11*	100,00	*
Benzamida	142,76	152,69	1,07	25,98	1,95
Pool Benz.	139,41	135,16	0,97	23,55	4,22
Troca Iônica	44,62	38,25	0,86	20,82	4,32
Filtro 50 kDa	6,75	4,24	0,63	15,25	4,42

Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados com tripsina bovina e as amostras processadas do HLH. UI = Unidades Inibitórias, equivalente quantidade do inibidor para inibir 50 % a atividade proteolítica. AE = Atividade Específica. * = Valores aproximados.

Tabela 4. Processo de Purificação do inibidor da hemolinfa de *A. gemmatalis*: Modelo cisteíno proteases

Etapa purificação	Proteína total (µg)	UI	A.E. (UI/µg)	Recuperação (%)	Purificação
HLH	957,2	914,	2,00	100,00	*
	1	42*	*		
Benzamida	518,9	489,	0,94	47,14	1,00
	2	19			
Pool Benz.	234,8	193,	0,83	43,73	1,33
	3	88			
Troca Iônica	147,2	112,	0,76	41,28	1,10
	4	03			
Filtro 50 kDa	11,72	10,2	0,87	38,04	2,14
		5			

Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes feitos com Papaína comercial e as amostras processadas do HLH. UI = Unidades Inibitórias, equivalente quantidade do inibidor para inibir 50 % a atividade proteolítica. AE = Atividade Específica. * = Valores aproximados.

Nas Tabelas 3 e 4 pode se observar que tanto para os ensaios com tripsina como com a papaína, a concentração das proteínas foi decrescendo de 965 para 6,75 µg/µL e de 957 para 11,7 µg/µL, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para as UI (152 - 4,2 para tripsina e 489 - 10 para papaína), a A.E (1,07 - 0,63 para tripsina e 0,94 - 0,87 para papaína) e a recuperação (de 100 % no final é recuperado 15 % e 38 % para tripsina e papaína respectivamente).

Em cada etapa da purificação houve um aumento da unidade inibitória. Para os ensaios com a tripsina foi observado um aumento de 2,5 unidades (aumentou de 1,95 até 4,42) e com a papaína 1,14 (aumentou de 1,00 até 2,14) (Tabela 2).

A Figura 8 representa a análise da eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras provenientes de cada etapa de purificação da hemolinfa de *A. gemmatalis*. A massa molecular aparente das bandas de proteínas, responsáveis pela inibição da tripsina e da papaína, estão em torno de 38 ± 2 kDa e 90 ± 9 kDa (Figura 8A). A outra banda (presente na canaleta referente a amostra depois da filtração) de tamanho aproximado 181 ± 10 kDa pode ser desconsiderado como possível inibidor, porque em um teste adicional, ela foi degradada pela tripsina (Figura 8B).

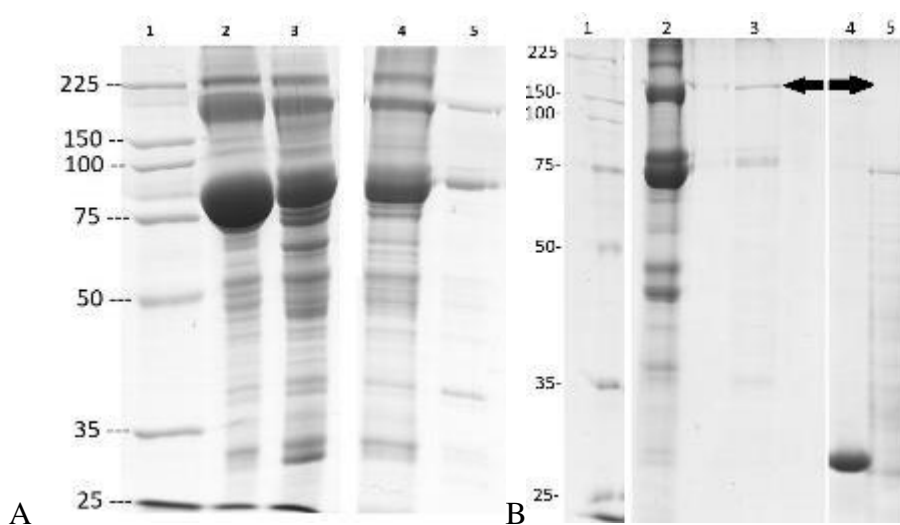


Figura 8. Análise por SDS-PAGE do Processo de Purificação do Inibidor. (A) Gel de poliacrilamida 10 % de 7 cm corado com azul de Comassie. 1- Marcador de peso molecular em kDa na esquerda. 2- Proteínas da HLH. 3- Proteínas das frações da cromatografia de afinidade que obtiveram atividade inibitória (*pool B*). 4- Proteínas das frações da cromatografia de troca iônica. 5- Proteínas eluídas no filtro de 50 kDa; (B) Gel de poliacrilamida 10 % de 13cm. 1- MW. 2- Proteínas eluídas na cromatografia de troca iônica. 3- Proteínas filtradas (50 kDa). 4- Tripsina Bovina. 5- Mistura inibidor com a tripsina bovina.

Durante o processo de purificação diferentes bandas de proteínas foram selecionadas ou excluídas em cada etapa com referente á etapa anterior. Assim, após a HLH passar pela coluna de benzamidina, nas frações selecionadas, as bandas da eletroforese na altura de 77-65, 45-40, 35-30 kDa diminuíram de intensidade em relação à HLH bruta. Na segunda cromatografia foi evidenciada uma diminuição das bandas de 137, 85 e 32 kDa e finalmente as amostras que passaram pelo filtro de 50 kDa não foram verificadas as presenças das bandas entre 103 e 44 kDa (Figura 8A).

Na última etapa de purificação, foram observadas três bandas de 38 kDa, 90 kDa e de 181 kDa. Foi feito um ensaio adicional misturando as amostras eluídas pelo filtro de 50 kDa com tripsina bovina em proporção 4:1, assim foi possível determinar que a banda de 181 kDa é degradada pela serino protease como indica a seta na figura 8B.

5.3. Cinética do inibidor

Após os ensaios utilizando concentrações variáveis do inibidor e do substrato cromogênico, foram construídos os gráficos do duplo recíproco de Lineweaver-Burk com o objetivo de determinar o modelo de inibição (Figuras 9, 10 e 11). Os dados indicam que o mecanismo de inibição da amostra para a cisteíno protease foi de forma reversível incompetitiva (Figura 9), entanto que para a serino protease foi do tipo competitivo reversível (Figura 10 e 11).

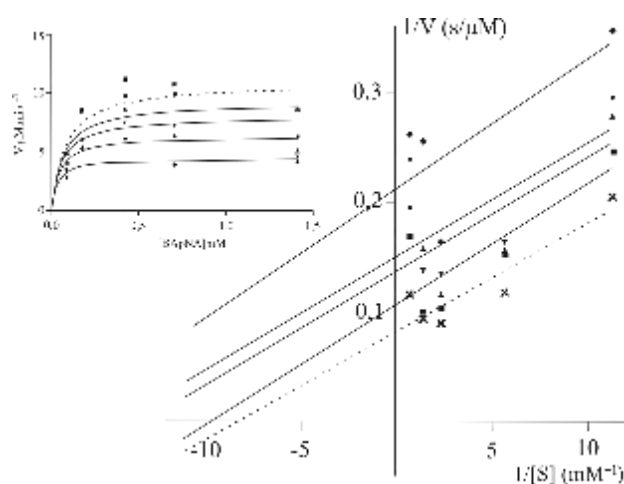


Figura 9. Análise da curva de inibição da papaína pelos inibidores obtidos da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis*. Gráfico de Lineweaver-Burk. Inserção: Gráfico de Michaelis-Menten. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações do substrato [S] Azocaseína (0,71; 1,42; 2,36; 5,68 e 11,33 mM), e do inibidor (x 0 μg/μL; ■ 1,56 μg; ▲ 3,125 μg; ▼ 6,25 μg; ◆ 12,5 μg). Os pontos são leituras experimentais das atividades catalíticas residuais das proteases misturadas com o inibidor, utilizou-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de K_i app e V_{max} app.

Nos resultados da inibição da papaína com o extrato enriquecido do inibidor, a variação do K_M foi refletida no intercepto do eixo X, que variou de -8,398 até -18,05. A diminuição da V_{max} foi evidenciada pelos diferentes interceptos do eixo Y. As concentrações do inibidor e a igualdade do coeficiente angular foram demonstradas nos valores semelhantes do K_M/V_{max} . Para I[1,56]; I[3,125]; I[6,25] e I[12,5] e I[0], K_M/V_{max} foi de $0,009782 \pm 0,003$; $0,01105 \pm 0,005$; $0,01038 \pm 0,005$; $0,01035 \pm 0,007$ e $0,01178 \pm 0,007$, respectivamente. Com base nestes valores, a inibição foi determinada como incompetitiva.

Para o gráfico com a tripsina bovina (Figura 10), observou-se que o intercepto no eixo Y ficou em $1,513 \pm 0,4587$; o coeficiente angular variou desde $1,464 \pm 0,8887$ até $157,7 \pm 58,53$ e o intercepto no eixo X variou desde -1,033 até 0,02232.

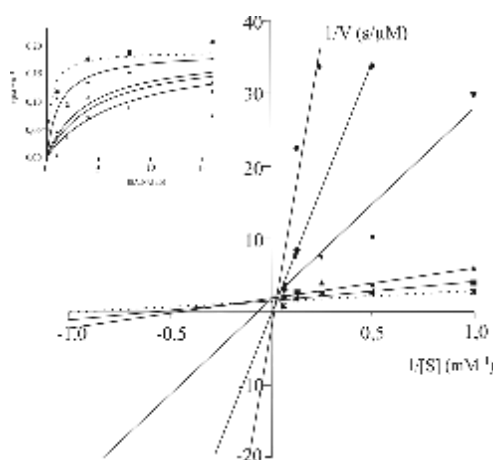


Figura 10. Análise da curva de inibição da tripsina bovina pelos inibidores obtidos da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis*. Gráfico de Lineweaver-Burk. Inserção: Gráfico de Michaelis-Menten. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações do substrato [S] L-BApNA [S] (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0mM), e do inibidor (x 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; ■ 1,12 μg ; ▲ 2,25 μg ; ▼ 4,5 μg ; ◆ 6 μg ; ● 9 μg). Os pontos são leituras experimentais das atividades catalíticas residuais das proteases misturadas com o inibidor, utilizou-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de K_i e V_{max} .

Com os dados analisados no gráfico de Michaelis-Menten (Figuras 9, 10 e 11), foi possível determinar a afinidade do inibidor pelas proteases; sendo, o K_i de 2,65 e 0,09 $\mu\text{g/s}$ para a tripsina bovina e a tripsina *like* do inseto, respectivamente. No caso da papaína, o αK_i foi de 8,79 $\mu\text{g/s}$.

Na primeira concentração do inibidor (I[1,12]) o aumento da inclinação da reta em relação à reta controle foi pouco significativo (coeficiente angular de $1,464 \pm 0,89$ para o controle e $2,658 \pm 1,16$ para I), pelo que devido a isso não é considerado uma variação na inclinação significativa, sendo que em alguns casos as retas se coincidem. Entretanto, nas retas I[2,25]; I[4,5]; I[6] e I[9] a inclinação aumentou significativamente com relação ao controle e entre si.

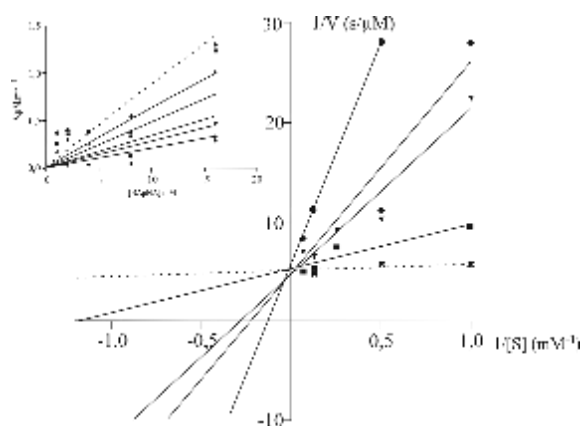


Figura 11. Análise da curva de inibição da tripsina-like intestinal de *Anticarsia gemmatalis* pelos inibidores obtidos da hemolinfa do mesmo inseto. Gráfico de Lineaweaver-Burk. Inserção: Gráfico de Michaelis-Menten. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações do substrato [S] L-BApNA (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0mM), e do inibidor (x 0 μg , ■3,32 μg ; ▼13,29 μg ; ◆16,61 μg ; ●29,91 μg). Os pontos são leituras experimentais das atividades catalíticas residuais das proteases misturadas com o inibidor, utilizou-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de K_i e V_{max} .

5.4. Estabilidade do inibidor

Foi avaliada a estabilidade dos inibidores somente com a tripsina bovina, a papaína não foi testada. Na faixa de temperatura analisada foi observado que o inibidor apresenta alta estabilidade entre 25 e 70 °C, ou seja, mantém uma porcentagem de inibição de 50 % (Fig. 12A). Com base no resultado da ANOVA foi verificado que a partir dos 80°C a inibição diminui ($p \leq 0,05$). Igualmente foi testada a estabilidade das proteínas em diferentes pH e observou-se que entre 7,2 e 9,2 a amostra conservou sua atividade inibitória entre 35,45 a 62,6 %. A diferença da inibição gerada pelas amostras no pH de 6,3 que ficou em torno de 7 % de inibição (Fig. 12B).

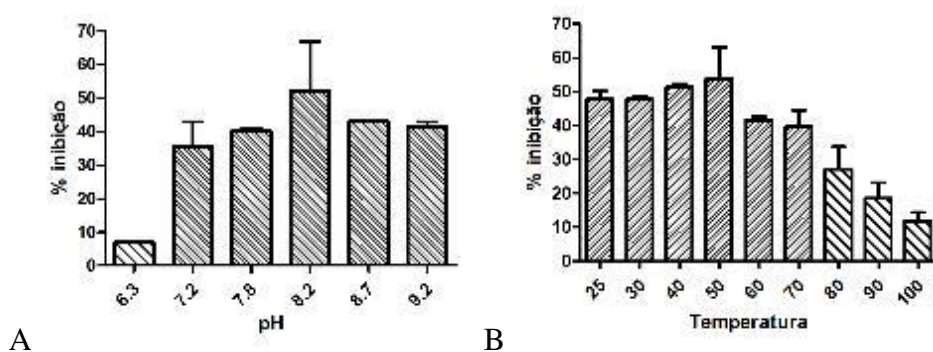


Figura 12. Efeito do pH e a temperatura na atividade inibitória contra tripsina bovina, dos inibidores isolados da hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis*, sobre a tripsina bovina. (A) Variação da atividade do (s) inibidor (es) no tampão glicina HCl (pH 6,3; 7,2 e 7,8) e tampão Tris HCl (pH 8,2; 8,7 e 9,2); (B) Efeito da temperatura na atividade inibitória em 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, e 100 °C.

6. DISCUSSÃO

No mapa do perfil das proteínas secretadas na heolinfa das lagartas dos quatro grupos analisados no 2-DE de *Anticarsia gemmatalis*. Foram encontrados que mais do 90 %, ficaram na mesma posição entre um gel e outro, indicando que a reprodutibilidade entre as replicas e os tratamentos foi alta. Além disso, este resultado está indicando que as proteínas das amostras foram corretamente extraídas. Depois de obter os mapas 2-DE das proteínas expressadas na hemolinfa pelas lagartas no último instar, foi possível identificar que há diferenças entre os insetos, no qual o seu desenvolvimento foi em baixa densidade populacional sem e com o estresse por ferimento (G1 e G2, respectivamente). Assim também, nos insetos no qual o seu desenvolvimento foi em alta densidade populacional sem e com estresse por ferimento (G3 e G4, respectivamente) houve diferenças na abundância proteica. Nas comparações de número de *spots*, sempre foi identificada uma abundância maior de proteínas nos tratamentos G1 e G3 comparado com os tratamentos G2 e G4, o que significa que foi menor o número de proteínas diferencialmente abundante nas lagartas que foram submetidas ao estresse por ferimento independentemente das condições da população (Tabela 2). Além das diferenças pelo número de *spots* (Fig. 6), também variou as características dos mesmos, referentes às faixas de pI e massa molecular em que ficaram concentrados o maior número de proteínas (Tabela 2). Estes resultados são importantes porque a diminuição ou o aumento de alguns tipos de proteínas podem indicar uma mudança significativa em diferentes processos fisiológicos como o sistema imune. Um exemplo destas alterações é o reportado pelo Adamo et al (2013) que os predadores com estressores, o gafanhoto *Gryllus texensis* muda sua fisiologia, seu comportamento e inclusive seu *fitness* pela mudança nos receptores de octopamina e conseqüentemente aumentando a sua concentração na hemolinfa deste neurotransmissor do estresse.

Adicionalmente, na análise A, os *spots* com abundancia diferencial entre os tratamentos G1 e G2 foram interessantes, porque nas faixas em que ficaram concentrados os *spots* (4,2 a 7,7 de pI e entre 12 e 80 kDa de massa molecular), segundo a literatura, encontrassem frequentemente proteínas associadas com a armazenagem de energia como Arilforinas e pericentrina 2 (FURUSAWA et al., 2008); metabolismo e desenvolvimento como a esterasa A4 - proteína da diapausa (CHEN et al., 2010); do sistema de reconhecimento de odores e feromônios

como proteína quimio sensorial 11 (CHEN et al., 2018) e do sistema imune como proteínas de reconhecimento de β -1,3-glucanos, lectinas tipo C, inibidores de proteases entre 43 e 45 kDa e a serino protease tipo 1 (ZHANG et al., 2013; GHOSH et al., 2011). Adicionalmente os *spots* exclusivos do tratamento G2 ficaram em uma faixa de pI's mais ácido que o do tratamento G1, deste último 67,6 % das proteínas ficaram em uma faixa ácida, no entanto, que aproximadamente 23 % das proteínas ficaram num pH entre neutro e básico (Tabela 2). Esta diferença entre os pI das proteínas possivelmente pode estar associado á resposta que o inseto tem frente a uma ameaça, porque no tratamento G1 os *spots* encontram-se com pI básicos, fato que foi reportado pela literatura que frequente proteínas são encontradas nesta faixa de pH como a AGAP010319-PA, fator de crescimento do disco imaginal, lisozimas e glycerol-3-phosphate dehydrogenase (peptídeos importantes para os processos metabólicos e de desenvolvimento) (ZHU et al., 2008). Entre os *spots* com pI ácido encontrados exclusivos no tratamento G2, na literatura tem sido reportada a associação desta faixa de pH com proteínas envolvidas na imunidade como: o alaserpin, os precursores de antitripsina, a ferritina, os inibidores de serino proteases, as proteínas de reconhecimento de β -1,3-glucanos e a sub unidade 2 da pro fenol oxidase (proPO-p2) (ZHANG et al., 2013; LI et al., 2014; SNART et al., 2015).

As análises A e C, indicam que o número de *spots* exclusivos dos tratamentos G2 e G4 foram muito próximos, 52 e 53, respectivamente (Fig. 6). O que pode ser um indicativo de que as vias que o inseto ativa para a cicatrização de uma ferida, possivelmente, não tem alteração nenhuma pela densidade populacional, em que ocorreu o desenvolvimento do individuo.

Na análise B, também foi encontrado uma diminuição do número de *spots* no tratamento G3 comparado com o tratamento G2, similar como foi encontrado na análise A. Na análise C, pode se observar resultados como no grupo G4, pois há um aumento das proteínas entre a faixa neutra e a básica (Fig. 6). Este efeito pode ser explicado pelo fato de que o inseto no momento da ferida perde proteínas de armazenagem acumuladas durante o desenvolvimento como arilforina (CHEN et al., 2010; GILL et al., 2017)

Referente ao peso molecular, pode se observar que as proteínas encontradas nos tratamentos G2 e G4, obtiveram um maior peso molecular que em G1 e G3

(Tabela 2). Assim possivelmente este resultado junto com a mudança de pI, pode ser um indicativo indireto do processamento post-transcricional que pode ter sofrido as proteínas pelas condições de estresse, tipo cortes das cadeias polipeptídicas e ou a fosforilação de a.a., que são parte de um sistema para controlar o comportamento proteico (por exemplo, ativando ou inativando uma enzima). Muitas proteínas depois de ser sintetizadas são processadas gerando mudanças no seu tamanho e na carga elétrica, dependendo dos sinais que recebe a célula (GUO et al., 2016; GILL et al., 2017). Como na análise A em que foi evidenciada a mudança da carga elétrica das proteínas do tratamento G2 comparada com o tratamento G1, em que 30 % das primeiras foram mais básicas que as segundas. Os resultados deste trabalho concordaram com Chen et al., (2010) no qual conseguiu determinar que as proteínas associadas ao sistema proPO são altamente expressadas na hemolinfa de insetos em condições de estresse e, neste trabalho, os *spots* com maiores variações encontram-se nas regiões dos géis onde geralmente estão as proteínas associadas com o sistema proPO.

Manter a imunidade, para os organismos conseguir se defender, é um aspecto da fisiologia que é altamente custoso, o que leva a encontrar uma relação de uma boa concentração de proteínas associadas com o metabolismo e um sistema imune forte (WOJDA, 2017). Por exemplo, a sobrevivência de larvas de *Spodoptera exempta*, infectadas com um vírus, aumenta com uma dieta rica em proteínas, o que indica uma associação da nutrição do inseto com a sua resistência (POVEY et al., 2009). Obviamente, neste trabalho os indivíduos em alta densidade populacional vão ter uma disponibilidade limitada de recursos comparada com aqueles que ficaram em baixa densidade, por isso pode explicar o porquê em *A. Gemmatalis* ocorreu o mesmo efeito (SILVA et al., 2013).

A etapa polifenística é um fenômeno amplamente distribuído entre os insetos, reportado em Lepidópteros, Ortopteros, Coleópteros e Hemipteros (WHITMAN, 2009; WILSON et al., 2002). A etapa na qual o indivíduo vive em condições não favoráveis pela densidade populacional, conhecida como agregação, é caracterizada pelo fato que os insetos tendem a ser mais escuros, com as cutículas mais melanizadas que nos indivíduos solitários (WHITMAN, 2009). Na etapa polifenística é característica as mudanças como a cor, a morfologia, a ontologia, o desenvolvimento e a resistência às doenças (BOOTS, 2000; WOJDA 2017). Espécies

que apresentam etapas polifeníticas como *Spodóptera exempta* e *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae); *Schistocera gregaria*, *Locusta migratória* e *Nomadacris septemfasciata* (Orthoptera: Acrididae), são as pragas mais conhecidas pelo homem. Na etapa polifenística estas espécies tem uma importância crítica, porque, o estímulo da população leva a mudanças morfológicas e comportamentais que aumentam seu efeito nocivo nas cultivares (WHITMAN, 2009, SILVA et al., 2013; SNODGRASS, 1993).

Baseado nos resultados das cromatografias, verificamos que os inibidores para tripsina obtiveram um bom rendimento relativo ao processo de purificação, pois na última etapa foram recuperados 38 % de sua atividade inibitória, enquanto que para papaína foram apenas 15 % (Tabela 3 e 4). Esta porcentagem de recuperação pode ser um indicativo que a metodologia utilizada não gerou muitas perdas das proteínas de interesse, com a exceção da primeira etapa em que foi observada uma perda de 53 %. De acordo com Inga et al., (2010) e Castillo-Yáñez et al., (2005), quando existe esta diferença entre o rendimento no processo de purificação, pode-se definir como uma alta eficiência a metodologia de purificação.

Na análise dos perfis dos géis SDS-PAGE obteve-se massas moleculares cujos valores foram de 38 e 90 kDa (Fig. 8), e este peso molecular coincide com alguns inibidores na literatura. É o caso do serpin 1, que apresentam variabilidade no tamanho, com isoformas com peso de aproximadamente 35 kDa e tem sido reportado em lepidópteros (RAGAN et al., 2010; ARUNPRASANNA et al., 2017). Este inibidor foi detectado numa concentração de 0,4 mg/mL em *M. sexta*, indicativo que este inibidor apresenta alta expressão nestes organismos, comparando com outros inibidores presentes em lagartas (ZHAO et al. 2012; CHERQUI et al., 2001). Outro exemplo é o que Christen e colaboradores (2012) observaram em *M. sexta*, por meio de *splicing* alternativo, a serpin 3 que apresenta diferentes tamanhos, mas que geralmente a proteína é de 40 kDa aproximadamente. Xu et al. (2015) registrou no lepidóptero *Autographa californica* serpin 2 de 44 kDa. Duarte Toubarro e colaboradores (2013) reportou a presença de serpin 6 em diversas lagartas, apresentando em sua forma nativa uma massa de 35 kDa. A serpin 6 forma um complexo com apolipoprotein (uma proteína do plasma dos insetos) de 108 kDa. Inclusive as proteínas incluídas dentro da família dos serpin podem ter uma variação

de tamanho tão grande que entre as características para hierarquizar os membros é utilizado a massa molecular como padrão (ZOU et al., 2009).

Portanto, inibidores do tipo serpin podem apresentar uma grande variação de massa e tamanho da cadeia polipeptídica de aproximadamente 35 a 60 kDa (CHERQUI et al. 2001; RAI et al 2010; AN et al., 2011; XU et al., 2015), o que está de acordo com o que foi observado para *A. gemmatalis*.

Além do serpin na hemolinfa dos invertebrados, pode se encontrar outros tipos de inibidores, como o pacifastin, em que seu monômero encontra-se entre 35 a 38 kDa. Também é frequente encontrar estes inibidores formando um heterodímero de 105 kDa (KELLENBERGER & ROUSSEL, 2005), estes valores estão muito próximos das bandas observadas nos géis (Fig. 8).

A afinidade dos inibidores aparentemente foi maior para a serino protease do que para a cisteíno protease. Esta diferença pode ser devido à baixa afinidade do inibidor com a papaína (Fig. 9, 10 e 11). Sabe-se que inibidores apresentam atividade para as diversas proteases com os graus de inibição distintos ou não (Nelson & Cox, 2014; MULENGA et al., 2013; MIYAJI et al., 2007). Têm sido observadas em alguns insetos, proteínas apresentando atividade inibitória diferencial para as cisteíno e as serino proteases (MIYAJI et al., 2007; ZHAO et al., 2012; MULENGA et al., 2013; PENG-CHAO et al., 2015). A maior afinidade para serino proteases pode ser explicada, também, devido a abundância desta protease que participam nas diferentes cascatas enzimáticas no plasma dos insetos (SNODGRASS, 1993).

O inibidor apresentou uma maior afinidade para a tripsina-*like* do inseto do que para a tripsina bovina. Isto foi evidenciado na cinética, em que a tripsina-*like* do inseto teve o intercepto no eixo Y maior, além da variação da inclinação e o K_M menores que a tripsina bovina (Figuras 10 e 11). Kellenberger & Roussel (2005) identificaram dois inibidores de pacifastin (LMP-1 e LMP-3) no gafanhoto *Locusta migratoria* e verificaram que eles apresentaram baixa atividade para tripsina de mamíferos, mas foram fortes inibidores para as enzimas do intestino médio deste inseto. Nove inibidores de serino proteases foram purificados de lagartas de *Antheraea mylitta*, tendo uma atividade inibitória para tripsina e quimiotripsina bovina menor do que para o intestino do inseto (RAI et al., 2010). Estes trabalhos corroboram com o resultado encontrado na presente pesquisa e reforça a hipótese que

a utilização de inibidores do próprio inseto pode ser utilizada visando um manejo ecologicamente viável.

No caso dos pacifastin, é conhecido que possuem seis resíduos de cisteína formando três pontes dissulfeto (Cys-1-4, Cys 2-6. Cys 3-5), indicando uma notável estabilidade sem interferir com o domínio inibitório, localizado próximo ao extremo C-terminal da proteína (BREUGELMANS et al., 2009a). Tem sido observado para os inibidores purificados de insetos estabilidade para pH entre 4,5 e 9; e em temperatura entre 4 a 65°C (RAI et al., 2010). Estes valores estão inseridos no intervalo obtidos no presente estudo. Assim, essas características podem também estar presente nos inibidores purificados de *A. gemmatalis*.

7. CONCLUSÕES

Pelos resultados nas análises 2-DE é evidente que há uma alteração (diminuição) na expressão de proteínas das lagartas no qual seu desenvolvimento ocorreu em condições de estresse por alta densidade populacional ou em outras palavras, na etapa polifenística.

O estresse por superpopulação provavelmente não afeta a via da coagulação da hemolinfa em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, porque o número de *spots* o tamanho deles e o pI tem aproximadamente os mesmos perfis.

A hemolinfa de *Anticarsia gemmatalis* tem pelo menos dois inibidores de serino e cisteíno proteases com o tipo de inibição competitiva e incompetitiva, respectivamente. Além de possuir uma afinidade cerca de 100 vezes maior para as serino proteases do inseto do que para as cisteíno proteases e 30 vezes maior que para serino proteases de mamíferos.

Novas pesquisas são incentivadas para comprovar se os inibidores pacifastins realmente estão presentes na hemolinfa da lagarta-da-soja. Além disso, verificar qual é a importância deste inibidor na fisiologia desta lagarta e realizar estudos sobre a sua utilização no manejo integrado de pragas.

8. REFERÊNCIAS

ADAMO, SHALLEY. KOVALKO, ILYA and MOSHER, BRIANNA. The behavioural effects of predator-induced stress responses in the cricket (*Gryllus texensis*): the upside of the stress response. **The Journal of Experimental Biology Ltd.** 216, 4608-4614, doi:10.1242/jeb.094482. 2013.

ALFONSO, JOAQUIN AND MARTINEZ, MANUEL. Insights into the molecular evolution of peptidase inhibitors in arthropods. **PLoS ONE** 12(11): e0187643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187643> 2017.

ALVAREZ-ALFAGEME F, MAHARRAMOV J, CARRILLO L, VANDENABEELE S, VERCAMMEN D, VAN BREUSEGEM F. Potential Use of a Serpin from Arabidopsis for Pest Control. **PLoS ONE** 6(5): e20278. doi:10.1371/journal.pone.0020278. 2011.

AN, CHUNJU. RAGAN, EMILY J. AND KANOST, MICHAEL R. Serpin-1 *Splicing* isoform J inhibits the proSpätzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta*. **Dv. Comp. Immunol** January; 35(1): 135–141. doi:10.1016/j.dci.2010.09.004 2011.

ANDERSON, R. M. & MAY, R. M. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 291, n. 1054, p. 451–524, 1981.

ARATAKE, HISASHI; DENG, LI RONG; FUJI, HIROSHI; KAWAGUCHI, YUTAKA AND KOGA, KATSUMI. Chymotrypsin inhibitors in haemolymph and eggs of the Silkworm, Bombyx Mori: Developmental changes in inhibitory activity. **Comp. Biochem. Physiol.** 97A (2): pag. 205-209. 1990.

ARUNPRASANNA, VIMALANATHAN. KANNAN, MANI. ANBALAGAN, SANKARAPPAN AND KRISHNAN, MUTHUKALINGAN. Comparative Proteomic Analysis of Larva and Adult Heads of Silkworm, Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of Entomology*.14(1): 1-12. DOI: 10.3923/je.2017.1.12 2017

- ASPAN, A.; HERGENHAHN, H-G.; SÖDERHÄLL, K. Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma. **Biochemical Journal**. 248(1):223, 1987
- BADYAEV, A. V. Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. Proceedings. **Biological sciences / The Royal Society**, v. 272, n.1566, p.877–886, 2005.
- BODE ROBERTA F., HALITSCHKE RAYKO and KESSLER ANDRÉ Herbivore damage-induced production and specific anti-digestive function of serine and cysteine protease inhibitors in tal goldenrod, *Solidago altissima* L. (Asteraceae). **Planta** 237: 1287-1296. 2013
- BOOTS, MICHAEL. Density-independent resource limitation and the transmission of an insect pathogen. **Oecologia**. 124:172–175. 2000
- BORDENSTEIN LAB , N. D.-1. Insect Innate Immunity Database. **Insect Innate Immunity Database**, 2011-2012. Disponível em: <<http://bordensteinlab.vanderbilt.edu/IIID/test/pathway.php>>. Acesso em: 20 dez. 2017
- BORTOLI. S. A., DÓRIA. H. O. S., ALBERGARIA. N. M. M. S., MURATA. A. T., VESCOVE. H. V. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. **Boletim de Sanidad Vegetal. Plagas**, V. 31, p.171-178, 2005.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248– 254, 1976
- BREUGELMANS B, SIMONET G, VAN HOEF V, VAN SOEST S, VANDEN BROECK J. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**. 30(3):622-32; 2009a.
- BREUGELMANS, BERT. SIMONET, GERT. HOEF, VICENT V. SOEST, SIFIE VAN AND BROECK, JOZEF VANDEN. Identification, distribution and molecular evolution of the pacifastin gene family in Metazoa. **BMC Evolutionari Bilogy**. 9:97 doi:10.1186/1471-2148-9-97. 2009b.

CASTILLO-YÁÑEZ, FRANCISCO JAVIER, PACHECO-AGUILAR, RAMÓN. GARCÍA-CARREÑO, FERNANDO LUIS. NAVARRETE-DEL TORO, MARÍA DE LOS ÁNGELES. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 140 91–98. doi:10.1016/j.cbpc.2004.09.031 2005

CHAPMAN, R. F. **The Insects Structure and Function**, 4th edition. Cambridge University Press, 1998.

CHEN, HONGXIA. LIU, YUEQIN. WANG, WENBING. OLATUNJI, OPEYEMI J. PAN, GANG AND OUYANG, ZHEN. Proteomic-Based Approach to the Proteins Involved in 1-Deoxynojirimycin Accumulation in Silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Insect Science**. 18(2): 42; 1–8, doi: 10.1093/jisesa/iey007 2018.

CHEN, HUIQING. LI, YIJIA. CHEN, KEPING. YAO, QIN. LI, GUOHUI AND WANG, LIN. Comparative proteomic analysis of *Bombyx mori* hemolymph and fat body after calorie restriction. **Acta Biochimica Polonica**. 57(4), pp. 505-511. 2010.

CHERA S, DE ROSA R, MILJKOVIC-LICINA M, DOBRETZ K, GHILA L, KALOULIS K, et al. Silencing of the hydra serine protease inhibitor Kazal1 gene mimics the human SPINK1 pancreatic phenotype. **J Cell Sci**;119(Pt 5):846–57. 2006.

CHERQUI ANAS; CRUZ NORBERTO AND SIMÕES NELSON. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 31, p. 761 – 769, 2001.

CHRISTENA JAYNE M., HIROMASAA YASUAKI, ANB CHUNJU, AND KANOST MICHAEL R. Identification of plasma proteinase complexes with serpin-3 in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 42 946-955. 2012.

COLINET, DOMINIQUE. KREMMER, LAURENT. LEMAUF, SÉVERINE. REBUF, CHRISTIAN. JEAN-LUC GATTI, MARYLÈNE POIRIÉ. Development of RNAi in *Drosophila* endoparasitoid was and demonstration of its efficiency in

impairing venom protein production. **Journal of Insect Physiology** 63 p. 56-61. 2014.

COPELAND, ROBERT ALLEN. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. 2nd ed. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Cap. 3, 6 e 9. 2013.

COSTA MOREIRA HENRIQUE JOSÉ & DAMASCENO ARAGÃO FLÁVIO. Manual de Pragas da Soja. Campinas SP. 2009.

De MARCO, RENATO. LOVATO, DIOGO V. TORQUATO, RICARDO J.S. CLARA, RENAN O. BUARQUE, DIEGO S. TANAKA, APARECIDA. S. The first pacifastin elastase inhibitor characterized from a blood sucking animal. **Peptides**. 31 1280-12286. 2010.

DUARTE TOUBARRO, MÓNICA M. AVILA, YOUJIN HAO, NATESAN BALASUBRAMANIAN, YINGJUN JING, RAFAEL MONTIEL, TIAGO Q. FARIA, RUI M. BRITO, NELSON SIMÕES. A serpin released by an entomopathogen imparisd clot formation in insect defense system. **PLoS ONE** 8(7): e69161. doi:10.1371/journal.pone.0069161 2013

ELLIOT, S. L., BLANFORD, S. AND B., T. M. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and *fitness*. **Proc. R. Soc. B** 269, 1599-1607. 2002.

ERNEST ORNA. & ZOR, TSAFFRIR. Linearization of the Bradford Protein Assay. **JoVE**. 38. <http://www.jove.com/details.php?id=1918>, doi: 10.3791/1918. 2010.

FARADY, A. CHRISTOPHER, J. AND CRAIKA, CHARLES S. Mechanisms Of Macromolecular Protease Inhibitors. **Chembiochem**. November 22; 11(17): 2341–2346. doi:10.1002/cbic.201000442. 2010.

FURUSAWA, TAKAKO. RAKWAL, RANDEEP. NAM, HYUNG WOOK. HIRANO, MISATO. SHIBATO, JUNKO. KIM, YU SAM. OGAWA, YOKO. YOSHIDA, YASUKAZU. KRAMER, KARL J. KOUZUMA, YOSHIKI. AGRAWAL, GANESH KUMAR AND YONEKURA, MASAMI. Systematic Investigation of the Hemolymph Proteome of *Manduca sexta* at the Fifth Instar

Larvae Stage Using One- and Two-Dimensional Proteomics Platforms. **Journal of Proteome Research**. 7:3, 938–959 2008

GARCÍA-FERNÁNDEZ, ROSSANA. Mey Ling Reytor, Maday Alonso del Rivero y María de los Angeles Chávez. Relación estructura-función de inhibidores de proteasas tipo BPTI-Kunitz. **REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**. RNPS: 2362. ISSN: 2307-695X. 4(2). Pp 2-19. 2015.

GENT, DIANA VAN. SHARP, PAUL. MORGAN, KEVIN. KALSHEKER, NOOR. Serpins: Structure, function and molecular evolution. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 35 1536-1547. 2003.

GHOSH, J.; LUN, C. M.; MAJESKE, A. J.; SACCHI, S.; SCHRANKEL, C. S.; SMITH, L. C. Invertebrate immune diversity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 9, p. 959–974, 2011.

GILL, T. A. CHU, C. PELZ-STELINSKI, K. S. Comparative proteomic analysis of hemolymph from uninfected and *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected *Diaphorina citri*. **Amino Acids**. 49: 389. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2373-2>, 2017

GOMES DE MENDOÇA, EDUARDO. EVANGELISTA VISÓTTO, LILIANE. SANTOS COSTA, NATÁLIA CRISTINA. RAINHA RIBEIRO, FABRÍCIO. DE OLIVEIRA, JOEL ANTÔNIO. DE ALMEIDA OLIVEIRA, MARIA GORETI. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). **Ciência e Agrotecnologia**. 35(3), 446-454. 2011

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, E. A. D.; MACEDO, L. L. P.; PITANGA, J. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. S.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria padilla* seeds on *Collosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**. 45, 1095-1102. 2005a.

GUBB, DAVID. SANZ-PARRA, ARANTZA. BARCENA, LAURA. TROXLER, LAURENT. FULLAONDO, ANE. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. **Biochimie** V.92 pp 1749-1759. 2010.

GULLEY, MELISSA M. ZHANG, XIN and MICHEL, KRISTIN. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. **Journal of Insect Physiology**. 59. 138 – 147. 2013.

GUNDAPPA, P. R. SHASHAKY AND HARITHA BOLLINENI. Insect proteomics: present and future prospective. **Current Biotica**. 7(4): 336-342, 2014.

GUO, SIYUAN. JIANG, F., YANG, P., LIU, Q., WANG, X., & KANG, L. Characteristics and expression patterns of histone-modifying enzyme systems in the migratory locust. **Insect biochemistry and molecular biology**, vol. 76, p. 18-28. 2016.

HAN, PENGFEI. FAN, JIQIAO. LIU, YU. CUTHBERTSON, ANDREW G. S. YAN, SHAOQIAO. QIU, BAO-LI. REN, SHUNXIANG. RNAi-Mediated Knockdown of Serine Protease Inhibitor Genes Increases the Mortality of *Plutella xylostella* Challenged by Destruxin A. **PLoS ONE** 9(5): e97863. doi:10.1371/journal.pone.0097863. 2014.

HILLYER F., JULIAN. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology** 58: 102-118. DOI: 10.1016/j.dci.2015.12.006. 2016.

HILLYER F., JULIAN. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology** 58, p. 102-118. DOI: 10.1016/j.dci.2015.12.006. 2016.

HOFFMAN JA, REICHHART J-M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. **Nat. Immunol.** 3, p.121–126. 2002

HOFFMAN-CAMPO, C.B; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Lodrina, **EMPBRAPA-CNPSO**, 10, Documentos, 23p. 1985.

HOFFMAN-CAMPO. CLARA BEATRIZ, CORRÊA-FERREIRA. BEATRIZ SPALDING E MOSCARDI. FLAVIO. Soja – Manejo Integrado de Insetos e Outros Artrópodos-Praga. 2013. Disponível em. <<http://www.cnpso.embrapa.br/artropodes/>> Acesso em: 23 Junh. 2016.

INGA, ROSALINA. VIVAS, DAN. PALERMO, PEDRO. MENDOZA, JULIO. LAZO, FANNY y YARLEQUÉ, ARMANDO. Caracterización biológica y acción de

inhibidores de una fosfolipasa A2 del veneno de *Lachesis muta*. **Revista Peruana de Biología**. 17(1): 123 – 128. 2010

JIANG RUI, KIM EUN-HYE, GONG JI-HEE, HYUN-MI KWON, CHAN-HEE KIM, KYOUNG-HWA RYU, JI-WON PARK, KENJI KUROKAWA, JINGHAI ZHANG, DAVID GUBB, AND BOK-LUEL LEE. Three pairs of protease; Serino complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. **The Journal of Biological Chemistry**. 284(51), p. 35652–35658. 2009.

JONGSMA, MAARTEN A. and BOLTER, CAROLINE. The adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. **Journal Insect Physiology**. 43(10). Pp 885-895 1997.

KANOST MICHAEL R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**. 23:291-301. 1999

KANOST, MICHAEL R. JIANG, HAOBO and YU, XIAO-QIANG. Innate immune responses of a Lepidopteran Insects, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews** Vol. 198: 97-105. 2004.

KELLENBERGER, CHRISTINE and ROUSSEL, ALAIN. Structure-Activity Relationship Within the Serine Protease Inhibitors of the Pacifastin Family. **Protein and Peptide Letter**. V.12, n. 5, 409-414. 2005

KLOWDEN, MARK J. **Physiological Systems in Insects**. 3th edition. 2013.

KOEHN, R. K. & BAYNE, B. L. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 37 n 1-2, p. 157–171, 1989.

LEE, K. P., SIMPSON, S. J. AND RAUBENHEIMER, D. A comparison of nutrient regulation between solitary and gregarious phases of the specialist caterpillar, *Spodoptera exempta* (Walker). **J. Insect Physiol**. 50, 1171-1180. 2004.

LI, QIURONG. WANG, DUN. LV, SHUMIN. ZHANG, YALIN. Comparative Proteomics and Expression Analysis of Five Genes in *Epicauta chinensis* Larvae from the First to Fifth Instar. **PLoS ONE** 9(2): e89607. doi:10.1371/journal.pone.0089607. 2014

- LITTLE, T. J., HULTMARK, D. AND READ, A. F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat. Immunol.* 6, 651-654. 2005
- LIU, HUA-WEI. WANG, LUO-LING. TANG, XIN. DONG, ZHAO-MING. GUO, PENG-CHAO. ZHAO, DONG-CHAO. XIA, QING-YOU. ZHAO, PING. Proteomic analysis of *Bombyx mori* molting fluid: Insights into the molting process. *Journal of Proteomics* 173 pp. 115–125. 2018
- LIU, YUNCAI. SU, HANG. LI, RONGQIAO. LI, XIAOTONG. XU, YUSONG. DAI, XIANGPING. ZHOU, YANYAN and WANG, HUABING. Comparative transcriptome analysis of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reveals novel insights into heat stress tolerance in insects. **BMC Genomics.** 18:974 DOI 10.1186/s12864-017-4355-5. 2017.
- MEEKINS, DAVID A. KANOST, MICHAEL R. MICHEL, KRISTIN. Serpins in arthropod biology. **Semin. Cell Dev. Biol.** 62:105-119. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.09.001 2017.
- MEHRKHOUS, FARIBA; TALEBI, ALI ASGHAR; KOCHAMESHGI, MAHMOUD GHASEMI; HOSSEININAVEH; VAHID, CÂNDIDO DE SOUZA, ELIZABETE; PETRIZ, BERNARDO; CAMPOS DIAS SIMONI; BATISTA CASTRO, MARIA ELITA; ANGELA MEHTA and OCTAVIO LUIZ FRANCO. Comparative proteomic analyses of *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* guts. **African Journal of Agricultural Research.** 7(22): 3342-3348, 2012.
- MELO RODRIGUES GABRIEL AUGUSTO, BARROS DE CARVALHO CLAUDIO JOSÉ, APARECIDA CASARI SÔNIA, Constantino Reginaldo. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.** Ribeirão Preto: Halos, Editora, p. 677-679, 2012.
- MOREIRA, L.F. CAMPOS, W.G. RIBEIRO, F.R. GUEDES, R.N.C. OLIVEIRA, M.G.A. Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). **Crop Protection.** 30. 1285-1290. 2011

MULENGA, A.; KIM, T. and IBELLI, A. M. G. *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. **Insect Molecular Biology**. 22 (3) 306-319. 2013.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 887–895, 2012.

OCHIENG, ROSE. ZHUANG, SHUFEI. KANOST. MICHAEL R. *Manduca sexta* serpin-7, a putative regulator of hemolymph prophenoloxidase activation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43 pp.555 – 561. 2013.

OLIVEIRA, M. G. A. et al. Partial purification and characterization of trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2005.

OLIVEIRA, M. G. A., DE SIMONE, S.G., XAVIER, L. P., GUEDES, RNC. Partial purification and characterization of trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 140(3): 369-380, 2005.

PAIXÃO GILSON P., LOURENÇÃO ANDRÉ L., SILVA CAMILA R., MENDOÇA EDUARDO G., SILVA PAULO L., OLIVEIRA JOEL A., ZANUNCIO JOSÉ C. E OLIVEIRA GORETI A. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) in Soybean cultivar sprayed with the protease inhibitor Berenil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61, 8034-8038. dx.doi.org/10.1021/jf4027603. 2013.

PALMER, W. J.; JIGGINS, F. M. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. **Molecular Biology Evolution** (MBE), v. 32, n. 8, p. 2111-2129, 2015

PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M., MERIÑO-CABRERA, YAREMIS B., ZANUNCIO JOSÉ C., ROCHA, FRANCELINA, CAMPOS WELLINGTON G. & OLIVEIRA de ALMEIDA, MARIA GORETI. Kinetic characterization of *Anticarsia gemmatilis* Digestive Serine-Proteases and the inhibitory effect of Synthetic

Peptides. **Protein & Peptide Letter.** 24(10).
DOI:10.2174/0929866524666170918103146. 2017.

PENG-CHAO, G.; ZHOMING, D.; LI, X.; TAO, L.; YAN, Z.; HUAWEI, H.; QINGYOU, X.; PING, Z. Silk gland-specific proteinase inhibitor serpin 16 from the *Bombyx mori* shows cysteine proteinase inhibitor activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 457: 31–36. 2015.

PENG-CHAO, G.; ZHOMING, D.; LI, X.; TAO, L.; YAN, Z.; HUAWEI, H.; QINGYOU, X.; PING, Z. Silk gland-specific proteinase inhibitor serpin 16 from the *Bombyx mori* shows cysteine proteinase inhibitor activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 457, pp. 31 – 36. 2015.

POVEY, S., COTTER, S. C., SIMPSON, S. J., LEE, K. P. AND WILSON, K. Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? **J. Anim. Ecol.** 78, 437-446. 2009

RAFALUK, CHARLOTTE. YANG, WENTAO. MITSCHKE, ANDREAS. ROSENSTIEL, PHILIP. SCHULENBURG, HINRICH AND GERRIT JOOP. Highly potent host external immunity acts as a strong selective force enhancing rapid parasite virulence evolution. **Environ Microbiol.** 19(5):2090-2100. doi: 10.1111/1462-2920.13736 2017

RAGAN, EMILY J. AN, CHUNJU. YANG, CELESTE T. & KANOST, MICHAEL R. Analysis of Mutually Exclusive Alternatively Spliced Serpin-1 Isoforms and Identification of Serpin-1 Proteinase Complexes in *Manduca sexta* Hemolymph. **The Journal of Biological Chemistry.** 285(38): 29642- 29650. 2010

RAI, S.; AGGARWAL, K. K.; MITRA, B.; DAS, T. K.; BABU, C. R. Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Peptides**, v. 31, n. 3, p. 474-481, 2010.

RAWLINGS, NEIL D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1463-1483, 2010.

- RAWLINGS, NEIL D. TOLLE, DOMINIC P. AND BARRETT, ALAN J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemistry Journal**. 378 705-716. 2004.
- REESON, A. F.; WILSON, K.; GUNN, A.; HAILS, R. S.; GOULSON, D. Baculovirus resistance in the noctuid **Spodoptera exempta** is phenotypically plastic and responds to population density. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1407, p. 1787–1791, 1998.
- RESH, VINCENT H. and CARDÉ, RING T. **Encyclopedia of Insects**. Elsevier Science (USA). ISBN: 0-12-586990-8. 2003.
- RIPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Structure and function of invertebrate Kazal-tupe serine proteinase inhibitors. **Development and Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p. 377-386, 2010.
- SCHOOFS, L.; SALZET, M. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors in Insects and Gut Leeches. **Current Pharmaceutical Desing**, v. 8, n. 7, p. 483-491, 2002.
- SHI, L.; PASKEWITZ, S. M. Proteomics and insect immunity. **Invertebrate Survival Journal (ISJ)**, v. 3, p. 4-17, 2006.
- SHRIVASTAVA, BINITA and GHOSH, ANANTA KUMAR. Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Insects Biochemistry and Molecular Biology**. 33. 1025-1033. 2003
- SILVA FARLEY W. S. VIOL, DANIEL L. FARIA, SIRLENE V. LIMA, ERAALDO VALICENTE, FERNANDO H. ELLIOT, SIMON L. Two's a Crowd: Phenotypic Adjustments and Prophylaxis in *Anticarsia gemmatalis* Larvae Are Triggered by the Presence of Conspecifics. **PLos ONE**. V. 8, n. 4, e61582. doi:10.1371, 2013.
- SILVERMAN, N.; ZHOU, R.; ERLICH, R. L.; HUNTER, M.; BERNSTEIN, E.; SCHNEIDER, D.; MANIATIS, T. Immune Activation of NF- κ B and JNK Requires Drosophila TAK1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48928-48934, 2003.

SIMPSON, S. J.; MCCAFFERY, A. R.; HÄGELE, B. F. A behavioural analysis of phase change in the desert locust. **Biological Reviews**, v. 74, n. 4, p. 461–480, 1999.

SNART, CHARLES J.P. HARDY, IAN & BARRETT, DAVID A. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155: 1–17, 2015. DOI: 10.1111/eea.12281. 2015.

SNODGRASS, ROBERT EVANS. **Principles of insect morphology**. Ellen burden and Ruth Roach Edit. 1993.

STEINHAUS, E. A. Crowding as a possible stress factor in insect disease. **Ecology**, v. 39, n. 3, p. 503–514, 1958.

STRELOW, J.; DEWE, W.; IVERSEN, P. W.; HAROLD, B.; JEFFREY, A. R.; MCGEE, JAMES.; WEIDNER, J. Mechanism of Action Assays for Enzymes. Edited by James McGee and Jeffrey Weidner. 2012

SUGUMARAN, MANICKAM; SAUL, STEVEN J.; RAMESH, NARAYANASWAMY. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenolase in insect hemolymph. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 132(3), 1985.

SWATHI, MARRI. MISHRA, PRASHANT K. LOKYA, VADTHYA. SWAROOP, VANKA. MALLIKARJUNA, NALINI. DUTTA-GUPTA, APARNA and PADMASREE, KOLLIPARA. Purification and Characterization Partial of Trypsin-Specific Proteinase inhibitors from Pigeonpea Wild Relative *Cajanus platycarpus* L. (Fabaceae) Active against gut proteases of lepidopteran pest *Helicoverpa armigera*. **Frontiers of physiology**. V. 7 articulo 388. 2016.

UEDA, T. E. GRAÇA, J. P. SALVADOR, M. C. GOIS, M. S. LUSKI, P. G. DIAS, B. F. VENTURA, M. U. OLIVEIRA, M. C. N. de HOFFMAN-CAMPO, C. B.. **Jornada Acadêmica da EMBRAPA Soja**. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) e indução dos compostos fenólicos da soja. Londrina: [s.n.]. 2016. p. 222-230.

VAN STRAALLEN, N. M. Ecotoxicology becomes stress ecology. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 17, p. 324A–330A, 2003.

VARGAS-ALBORES, FRANCISCO y ORTEGA-RUBIO, MEDO. El sistema inmune humoral de los insectos. **Tópicos de Investigación y Postgrado IV**. (1): 21-28. 1994.

VINCENT, J. F. V. AND WEGST, U. G. K. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arth. Struct. & Dev.* 33, 187-199. 2004

WANG, X. W.; TAN, N. S.; HO, B.; DING, J. L. Evidence for the ancient origin of the NF- κ B/I κ B cascade: its archaic role in pathogen infection and immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 103, n. 11, p. 4204-4209, 2006

WHISSTOCK, JAMES C. And BIRD, PHILLIP I. Methods in Enzymology. Serpin Structure and Evolution. Vol. 501. ISBN: 978-0-12-385950-1. ISSN: 007-6879 Elsevier. 2011.

WHITMAN DW, AGRAWAL TN, editors. Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences. **Science Publishers Inc**. pp. 137–176. 2009.

WILSON K, THOMAS MB, BLANFORD S, DOGGETT M, SIMPSON SJ. Coping with crowds: Density-dependent disease resistance in desert locusts. **Proceedings of the National Academy of Science** 99: 5471–5475. 2002

WILSON, K. and REESON, A. Density - dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera–baculovirus interactions? **Ecological Entomology**, p. 100–101, 1998.

WOJDA, Iwona. Temperature stress and insect immunity. **Journal of thermal biology**, 2017, vol. 68, p. 96-103

XU, J.; ZHANG, P.; KUSAKABE, T.; MON, H.; LI, Z.; LI, Z.; IYAMA, K.; BANNO, Y.; MOROKUMA, D.; JAEN, M. L. Comparative proteomic analysis of hemolymph proteins from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) – sensitive or – resistant silkworm strains during infections. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. 16: 36-47. 2015.

XU, J.; ZHANG, P.; KUSAKABE, T.; MON, H.; LI, Z.; LI, Z.; IYAMA, K.; BANNO, Y.; MOROKUMA, D.; JAEN, M. L. Comparative proteomic analysis of hemolymph proteins from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus

(AcMNPV) –sensitive or- resistant silkworm strains during infections. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. 16 p. 36-47. 2015.

YAMPOLSKY, L. Y., ZENG, E., LOPEZ, J., WILLIAMS, P. J., DICK, K. B., COLBOURNE, J. K., and PFRENDER, M. E. Functional genomics of acclimation and adaptation in response to thermal stress in *Daphnia*. **BMC genomics**, v. 15, n. 859, 2014.

ZHANG, QI. LU, YU-XUAN AND XU, WEI-HUA. Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BioMed Central Genomics**. 14:751.

ZHAO, P.; DONG, Z.; DUAN, J.; WANG, G.; WANG, L.; LI, Y.; XIANG, Z.; XIA, Q. Genome-wide Identification and Immune Response Analysis of Serine Protease Inhibitor Genes in the Silkworm, *Bombyx mori*. **PLoS ONE** v. 7, n. 2, p. e31168, 2012.

ZHOU, ZHONG-HUA. YANG, HUI-JUAN. CHEN, MING. LOU, CHENG-FU. ZHANG, YAO-ZHOU. CHEN, KE-PING. WANG, YONG. YU, MEI-LAN. YU, FANG. LI, JIAN-YING AND ZHONG, BO-XIONG. Comparative Proteomic Analysis between the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*) Reared on Fresh Mulberry Leaves and on Artificial Diet. **Journal of Proteome Research**. 7, 5103–5111 5103 10.1021/pr800383r 2008.

ZHU, Y.; THANGAMANI, S.; HO, B.; DING, J. L. The ancient origin of the complement system. **EMBO J**. v. 24, n. 2, p. 382-394, 2005.

ZOU, ZHEN. PICHENG, ZHAN. WENG, HUA. MITA, KAZUEI & JIANG, HAobo. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. **Genomics**. 93: 367-375. 2009.