

FRANCINY MARTINS PILON

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE SERINO-PROTEASES DE
Anticarsia gemmatalis E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO-
ENZIMÁTICA DE TRIPSINAS-*LIKE* PURIFICADAS,
PRODUZIDAS POR SUA MICROBIOTA INTESTINAL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P643c
2012

Pilon, Franciny Martins, 1983-
Clonagem e expressão de serino-proteases de
Anticarsia gemmatalis e caracterização cinético-enzimática de
tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota
intestinal / Franciny Martins Pilon. – Viçosa, MG, 2012.
xviii, 112f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Clonagem. 2. Genômica. 3. Inseto - Aparelho digestivo.
4. *Anticarsia gemmatalis*. 5. Bactérias. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.76

FRANCINY MARTINS PILON

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE SERINO-PROTEASES DE
Anticarsia gemmatalis E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO-
ENZIMÁTICA DE TRIPSINAS-*LIKE* PURIFICADAS,
PRODUZIDAS POR SUA MICROBIOTA INTESTINAL.**

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

APROVADA: 30 de julho de 2012.

Liliane Evangelista Visôto
(Coorientadora)

Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)

Camila Rocha da Silva

Wellington Garcia Campos

Maria Goreti Almeida Oliveira
(Orientadora)

A Deus, por guiar e iluminar o meu caminho até aqui.

A meu pai Odemar Pilon e minha mãe Lúcia Martins Pilon, que com todo amor e carinho, sempre me incentivaram a ser melhor e lutar pelos meus ideais, vocês são os alicerces da minha vida e sem vocês eu não seria nada.

A meu irmão Anderson Martins Pilon, por deixar-me espelhar nas suas lutas e conquistas, fazendo com que eu chegasse a mais uma vitória.

Vocês fizeram com que tudo fosse possível!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realização do doutorado;

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa, sem a qual seria impossível continuar meus estudos;

Ao INCT-IPP pelo apoio financeiro durante todo o processo desse trabalho;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, minha orientadora, pelas várias oportunidades, desde a graduação até o doutorado, foram nove anos de incentivo, conselhos, apoio, paciência e confiança;

Ao professor Luciano Gomes Fietto pela coorientação e principalmente no início do trabalho com sugestões na parte de biologia molecular;

Ao professor Joel Antônio de Oliveira pela coorientação;

A professora Liliane Evangelista Visôto pela coorientação, amizade e disponibilidade;

Ao professor Thiago Rennó dos Mares-Guia, pela coorientação e sugestões apresentadas;

Ao secretário Eduardo Pereira Monteiro Montes do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela atenção e amizade;

Aos companheiros do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e Peptídeos: Adriana, Camila, Eduardo, Elias, Fabrício, Francelina, Lídia, Rita, José Fausto e Solange pela amizade e agradável convivência;

Ao Eduardo Gomes de Mendonça, que esteve presente na minha vida desde a iniciação científica, compartilhando conhecimentos científicos que foram de grande ajuda nos experimentos que fizemos. Só você sabe o que passamos para chegar até aqui;

Ao Fabrício Rainha Ribeiro, que desde a época da graduação já contava com seu apoio e conversas longas que pendem até hoje... Agente se entende;

A Camila Rocha, que se tornou uma grande companheira de laboratório e da vida. Obrigada pela oportunidade de te conhecer;

A Adriana Patarroyo Vargas, uma grande parceira que conheci há pouco tempo, mas que só veio acrescentar. Adoro nossas divagações sobre enzimas e nossas conversas inacabáveis;

A Mayra Fonseca Apolinário, ex-estagiária do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de proteínas e Peptídeos, pela colaboração e responsabilidade, cuja contribuição foi indispensável na realização de parte deste trabalho;

Aos antigos colegas de laboratório Liliane, Jeanne, Gilson, Patrícia, Denise entre outros, agradeço por terem feito parte da minha vida acadêmica;

As companheiras da vida, Carolina Rocha e Renata, que me fizeram esquecer muitas preocupações durante este trabalho, trazendo sorrisos e alegrias à minha vida.

As minhas atuais e ex-companheiras de república Alejara, Bethania, Neali, Rosimeire, Vanessa e especialmente Carla Vitor Paim que esta comigo desde o mestrado, pelo apoio, incentivo, risos e ombros amigos para chorar, vocês são inesquecíveis e estarão sempre comigo;

Ao meu noivo Geraldo Majella Drago, pela confiança, pelo incentivo, companheirismo, amor e apoio em todas as minhas decisões durante nossa convivência e em todo o decorrer desse curso;

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

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Franciny Martins Pilon, filha de Odemar Pilon e Lúcia Martins Pilon, nasceu em 12 de setembro de 1983, na cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo.

Em Maio de 2002 iniciou os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em ambos em março de 2007.

Em março de 2007, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo em 10 de Julho de 2008, a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Em março de 2008 iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, defendendo Tese em julho de 2012.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1: *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto..... 6
- Figura 2: Estágio larval de *Anticarsia gemmatalis*. 7
- Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteases (HEDSTROM, 2002) 13

CAPÍTULO I

- Figura1: Análise por eletroforese em gel de agarose 1,0 % do RNA total do intestino de *Anticarsia gemmatalis* de 5º instar. 47
- Figura2: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0 % dos fragmentos de cDNA gerados da amplificação com os pares de primers(Tabela 1): P1 e P2(1); DMTF e DMTR (2); DMTF e SerPR(3). M: Marcador DNA ladder 1kb (Fermentas). A seta indica fragmentos amplificados(~500pb) 48
- Figura 3 : Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida de Agem1, Agem 2 e Agem 3 isoladas de *Anticarsia gemmatalis*. Os aminoácidos representados em vermelho fazem parte da tríade catalítica. 49
- Figura4: Alinhamento múltiplo de seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas de *Anticarsia gemmatalis* (Agem1, Agem 2 e Agem 3), *Choristoneura fumiferana*(AAA84423.1),*Ostrinia nubilalis*(AAX62037.1), *Spodoptera frugiperda*(ACR25157.1), *Galleria mellonella*(AAk81696.1).As regiões conservadas estão mostrado em preto. As regiões em cinza diferem em apenas um aminoácido para as sete sequencias. As regiões da tríade catalítica de serino-proteases apontadas com a seta. 51
- Figura 5:. Árvore filogenética (Bootstrap 1000) construída do alinhamento padrão de ClustalX 2.0.10. das seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas de *Anticarsia gemmatalis* (Agem1, Agem 2 e Agem 3), *Choristoneura fumiferana*(AAA84423.1),*Ostrinia nubilalis*(AAX62037.1), *Spodoptera frugiperda*(ACR25157.1), *Galleria mellonella*(AAk81696.1). A escala indica um processo evolutivo de 0,1 de distancia das substituições de aminoácidos por sitio. 52
- Figura 6. Alinhamento múltiplo de seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas por *Anticarsia gemmatalis* (Agem1, Agem 2 e Agem 3). As regiões

conservadas estão em preto. As regiões em cinza diferem em apenas um aminoácido para as sete sequencias	52
Figura 7: Análise da expressão de genes de tripsina de <i>A. gammatalis</i> , por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (triângulo) e com uma dieta suplementada com inibidor Benzamidina 0.5% (p/v) (quadrado).....	55
Figura 8: Análise da expressão de genes de tripsina de <i>A. gammatalis</i> , por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (triangulo) e com uma dieta suplementada com inibidor Berenil 0,0019%(p/v)(quadrado).	57
Figura 9: Análise da expressão de genes de tripsina de <i>A. gammatalis</i> , por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (triangulo) e com uma dieta suplementada com inibidor SKTI 0,1%(p/v)(quadrado).....	58
Figura10: Análise da expressão de genes de tripsina de <i>A. gammatalis</i> , por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (triangulo) e com uma dieta suplementada com inibidor SBBI 0,1%(p/v)(quadrado).....	59

CAPÍTULO II

Figura 1: Crescimento e atividade das proteases secretada por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> , crescidas a 37°C em meio de cultura liquido infusão cérebro coração (BHI) enriquecido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA).....	83
Figura 2: Perfil cromatográfico de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> em p- aminobenzamidina, equilibrada com tampão Tris- HCl pH8,5 0,1M e eluídas com tampão glicina 0,1M pH 3,0.◆Absorvância (280nm) ●Atividade amidásica(μM/s).....	84
Figura 3: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12 %) das serino proteases produzidas pela microbiota isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> .1- marcadores de massa molecular(Fermentas®) ; 2-extrato bruto de <i>B. cereus</i> ; 3- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de <i>B. cereus</i> ; 4-. extrato bruto de <i>E. munditti</i> 5- fração enzimática pós cromatografia de	

afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *E. munditti* 6- extrato bruto de *E. galinarum* 7- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *E. gallinarum*;8- extrato bruto de *S. xylosus*; 9- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *S. xylosus*. 87

Figura 4: Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média. 88

Figura 5: Efeito da temperatura sobre a atividade de serino proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média. 90

Figura 6: Efeito de íons cálcio sobre a atividade serino proteases produzidas pela microbiota isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 91

Figura 7: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade serino proteases das bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, sobre o substrato L- BApNA. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade da amostra purificada sobre L-BApNA. . Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de K_M e V_{max} 93

Figura 8: Efeito de Aprotinina sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 95

Figura 9: Efeito de Berenil sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 97

Figura10: Efeito de TPCK sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 98

Figura11: Efeito de SKTI sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	100
Figura 12: Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.	101
Figura 13: Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	102
Figura14: Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra de mesma cor na coluna não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1-Primers usados neste trabalho.....	44
Tabela 2: Primers específicos de serino proteases de <i>A. gemmatalis</i>	45
Tabela 3-Análise das seqüências de genes de serino-proteases isoladas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	50

CAPÍTULO II

Tabela1: Sistemas-tampão utilizado na avaliação da atividade de proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i>	80
Tabela 2- Etapas de purificação das serino-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	86
Tabela3: Parâmetros cinéticos das serino proteases excretadas por bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i> e das serino proteases produzidas pelo próprio inseto	94

LISTA DE ABREVIATURAS

BApNA- benzoil-arginina-p-nitroanilida

BHI: infusão cérebro coração

BSA :Albumina do soro bovino

DEPC -dietilpirocarbonato

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

E-64- trans-epoxi succinil-L-leucinoamido-(4-guanidino-butano)

K_M - constante de Michaelis

kDa : kilodalto

PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SBBI- inibidor de tripsina da soja tipo Bowman-Birk

SKTI- inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz

SDS- dodecil sulfato de sódio

TPCK- N- α tosil-L-lisina clorometilcetona

Tris- Tris (hidroximetil) amino metano

V_{max} - velocidade máxima

RESUMO

PILON, Franciny Martins, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Clonagem e expressão de serino-proteases de *Anticarsia gemmatalis* e caracterização cinético-enzimática de tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota intestinal** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Joel Antônio de Oliveira, Liliane Evangelista Visôto, Luciano Gomes Fietto e Thiago Rennó dos Mares Guia.

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, é considerada uma das principais pragas da cultura da soja. Os danos causados pelo ataque deste inseto associado à relevância econômica do cultivo da soja para o Brasil e para o mundo fomentam a busca por alternativas no controle deste inseto. Estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases têm sido estudadas e o conhecimento das enzimas digestivas tem se mostrado fundamental. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* e avaliar sua expressão diante de inibidores de serino-proteases bem como purificar e caracterizar serino-proteases produzidas pela microbiota intestinal da lagarta da soja. Foram isolados três genes distintos de serino proteases do genoma da lagarta da soja chamados de Agem 1, Agem 2 e Agem 3, indicando que os genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* estão organizados em família multigênica. Os três genes mostraram alta identidade com tripsinas de outros insetos da ordem Lepidoptera. Foi verificado que a expressão do gene Agem 2 se sobressaiu em relação ao gene Agem 1 e Agem 3. As sequências descritas neste trabalho evidenciaram ser genes de tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino-protease Benzamidina. O inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes de tripsinas isolados neste estudo. Os genes de tripsinas isolados mostraram serem sensíveis aos inibidores proteicos da soja SKTI e SBBI, diminuindo sua expressão durante o tratamento. Esses estudos mostram que o significado da expressão diferencial de proteases digestivas diante de inibidores de proteases nunca pode ser subestimado. O processo de purificação das enzimas produzidas por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, foi realizado em cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina). As massas moleculares estimadas das enzimas foram de aproximadamente 25 kDa (SDS-PAGE). As enzimas apresentaram maior atividade em temperatura a 40°C e em pH 7,5 para *B. cereus*, pH 10,0 para *E.mundtii*, e pH 8,5 para *S.xylosum* e *E.gallinarum*. Os íons cálcio não afetaram a atividade enzimática nas concentrações testadas. Os valores de K_M da serino

protease de *E. gallinarum*, *B. cereus*, *S. xylosus* e *E. mundtii* foram de 0,35mM, 0,18 mM, 0,21 mM e 0,22 mM, respectivamente. As enzimas foram sensíveis à inibição por inibidores típicos de serino- proteases e tripsina, como Aprotinina, Berenil e SKTI. Suas atividades não foram alteradas pelos inibidores TPCK de quimiotripsina, Pepistatina A de aspartil-proteases, E-64 de cisteíno-proteases e EDTA de metalo-proteases. Esses resultados em conjunto demonstram que as bactérias sintetizam e excretam no lúmen intestinal de *A. gemmatalis* enzimas tripsinas-like com características semelhantes às produzidas pelo próprio inseto. Através do conhecimento obtido neste trabalho surgem novas perspectivas para a realização de pesquisas complementares que poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas baseadas na inibição de proteases digestivas, tanto produzidas pelo inseto quanto pela sua microbiota intestinal.

ABSTRACT

PILON, Franciny Martins, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Cloning and expression of serine proteases *Anticarsia gemmatalis* and kinetic characterization of enzyme-purified trypsin-like, produced by their intestinal microbiota.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisores: Joel Antônio de Oliveira, Liliane Evangelista Visôto, Luciano Gomes Fietto and Thiago Rennó dos Mares Guia.

The caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is considered a major pest of soybean. The damage caused by this pest associated with the economic importance of soybean cultivation in Brazil and the world to promote the search for alternatives to control this insect. Strategies to control insect pests based on the use of protease inhibitors have been studied and knowledge of digestive enzymes has proved crucial. In this context, this study aimed to identify genes for serine proteases of *A. gemmatalis* and evaluate your expression face of inhibitors of serine proteases as well as purify and characterize serine proteases produced by the intestinal microbiota of the soybean caterpillar. Genes were isolated three distinct serine proteases of the genome of soybean caterpillar called Agem 1, Agem 2 and Agem 3, indicating that the genes of serine proteases of *A. gemmatalis* are organized into multigene family. The three genes showed high identity with trypsins from other insects of the order Lepidoptera. It was found that gene expression Agem 2 excelled compared to the genes Agem 1 and Agem 3. The sequences described herein have shown to be sensitive genes trypsins and/or insensitive to the serine protease inhibitor benzamidine. The synthetic inhibitor berenil was potentially effective in the suppression of genes trypsins isolated in this study. The genes of isolates showed trypsin to be sensitive to inhibitors of soybean protein SKTI and SBBI decreasing its expression throughout the treatment. These studies show that the significance of differential expression of digestive proteases before protease inhibitors can never be underestimated. The purification process of enzymes produced by *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus gallinarum*, and *Enterococcus mundtii* isolated from the intestinal tract of *A. gemmatalis* was performed on affinity chromatography (p-aminobenzamidine). The molecular weights of the enzymes were estimated to approximately 25 kDa (SDS-PAGE). The enzymes were more active in temperature to 40 ° C and pH 7.5 for *B. cereus*, pH 10.0 for *E.munditti* and pH 8.5 for *S.xylosus* and *E.galinarum*. The calcium ions did not affect the enzyme activity at the concentrations tested. The values of K_M serine protease of *E. gallinarum*,

B. cereus, *S. xylosus* and *E. mundtii* were 0.35 mM, 0.18 mM, 0.21 mM and 0.22 mM, respectively. The enzymes were sensitive to inhibition by inhibitors of serine proteases typical and trypsin, as Aprotinin, Berenil and SKTI. His activities were not altered by inhibitors chymotrypsin of TPCK, Pepstatin A of aspartyl proteases, E-64 of cysteine proteases and EDTA of metallo-proteases. These results together demonstrate that the bacteria synthesize and secrete the intestinal lumen *A. gemmatalis* trypsin-like enzymes with similar characteristics to those produced by the insect. Through the knowledge gained in this work are new prospects for conducting additional research that will contribute to the development of pest control strategies based on the inhibition of digestive proteases, both produced by the insect as for their intestinal microbiota.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Soja.....	4
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).....	5
2.3. Interação planta-inseto	8
2.4. Proteases	10
2.4.1. Serino-proteases	11
2.4.1.1. Genes que codificam serino-proteases	14
2.5. Inibidores de proteases	15
2.6. Microbiota bacteriana de insetos	18
2.6.1. Microbiota bacteriana de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	22
CAPÍTULO I.....	36
Isolamento, identificação e expressões de genes de serino-proteases de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em resposta a inibidores de proteases	36
RESUMO	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Insetos.....	42
2.1.1 Criação da lagarta da soja.....	42
2.1.2 Preparo da dieta.....	42
2.1.3 Insetos submetidos a tratamento com e sem inibidores	43
2.2 Extrações de RNA e síntese de cDNA	43
2.3 Amplificações do cDNA	44
2.4 Sequenciamento e análise <i>in silico</i> das sequências obtidas.....	45
2.5 Confeções dos primers para análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real	45
2.6 Transcrições reversa PCR quantitativo (qRT-PCR)	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Isolamentos, sequenciamento e identificação de genes de serino-proteases expressos em <i>A. gemmatalis</i>	47

3.2 Expressões de genes de serino-proteases de <i>A. gemmatalis</i> em resposta a inibidores de proteases	53
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	63
CAPÍTULO II	71
Purificação e Caracterização de Serino Proteases Produzidas pela Microbiota Intestinal de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	71
RESUMO	72
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. Microrganismo e condições da cultura	77
2.2. Obtenção dos extratos enzimáticos de bactérias isoladas do trato intestinal de larvas de <i>A. gemmatalis</i>	77
2.3. Determinação de proteína	78
2.4 Ensaio enzimático	78
2.5. Purificação enzimática	78
2.5.1. Precipitação por sulfato de amônio	78
2.4.2. Cromatografia de afinidade	78
2.5 Eletroforese	79
2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)	79
2.7. Caracterização enzimática	80
2.7.1 Efeito do pH	80
2.7.2 Efeito da temperatura	80
2.7.3 Efeito da concentração de íons cálcio	80
2.7.4 Determinação da K_M e $V_{máx}$	81
2.7.5. Avaliação do efeito de inibidores	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.1 Perfis do crescimento bacteriano e da atividade das proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i>	82
3.2 Purificações das serino-proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de <i>A. gemmatalis</i>	84
3.3. Caracterização Enzimática	88
3.3.1 Efeito do pH	88
3.3.2 Efeito da temperatura	89
3.3.3 Efeito de íons cálcio	90

3.3.4 Constante de Michaelis-Menten (KM) e velocidade máxima (V _{máx})	92
3.3.5 Avaliação do efeito de inibidores na atividade de serino proteases bacterinas	95
3.3.5.1 Efeito de Aprotinina	95
3.3.5.2 Efeito de Berenil	96
3.3.5.3 Efeito de TPCK.....	97
3.3.5.4 Efeito de SKTI	99
3.3.5.5 Efeito de Pepstatina A	100
3.3.5.6 Efeito de E-64	101
3.3.5.7 Efeito de EDTA	102
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	105
CONCLUSÕES GERAIS	111

1. INTRODUÇÃO

No panorama do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que mais vem crescendo nas últimas décadas. Os maiores países produtores de soja são também os maiores exportadores, sendo o principal os Estados Unidos, seguido pelo Brasil e Argentina. No Brasil, a soja é cultivada praticamente em todo território nacional, destacando-se como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou como gerador de divisas, através das exportações (SÁVIO et al., 2008; DALL'AGNOL et al., 2010, CONAB, 2011).

Atualmente o Brasil é considerado o país que tem maior potencial (terra, tecnologia e clima) para expandir consideravelmente a produção de soja e atender uma demanda mundial crescente (CONAB, 2011). De acordo com a CONAB (2011) há perspectivas de redução da oferta global da colheita de soja, em função da possível queda da safra dos Estados Unidos para 2011/12, o que levaria o Brasil a ocupar um papel de destaque e ampliar a sua posição no mercado internacional. Tal fato é corroborado pela maior capitalização dos produtores brasileiros, associada ao aumento gradual na oferta de recursos nas modalidades de Custeio e Comercialização a juros controlados, que na safra 2011/12 foram estimados em R\$ 64,1 bilhões frente aos R\$ 60,7 bilhões do ano safra 2010/11 (CONAB, 2011).

Os cultivos de soja estão sujeitos ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo. Eles afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE et al., 2004).

Entre os insetos que trazem consequências econômicas mais significativas na soja, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja. Este inseto é o principal causador de danos a sojicultura, atuando como desfolhador e geralmente suas maiores incidências ocorrem durante o período vegetativo até o final da floração, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (PRAÇA et al., 2006; SÁVIO et al., 2008; VIANNA et al., 2011).

Atualmente os métodos de controle de pragas se concentram basicamente na utilização de agroquímicos (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002, VIANNA et al., 2011). Sabe-se que estes provocam prejuízos financeiros, desequilibram a cadeia alimentar, elevam pragas secundárias à categoria de pragas-chave, causando o surgimento de

novas pragas e pragas resistentes. Essas consequências têm provocado uma revolução no controle de insetos na agricultura moderna, tornando-se necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle (SÁVIO et al., 2008; MILLS e KEAN, 2010, VIANNA et al., 2011). A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação no manejo integrado de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERRY et al., 2006; SCOTT et al., 2010).

Sabe-se que uma rota de defesa de plantas, conhecida como via das lipoxigenases, culmina com a produção do ácido jasmônico, um hormônio vegetal que ativam genes que expressam inibidores de proteases tidos como agentes antimetabólicos para os insetos. Os inibidores de proteases interferem na digestão proteica dos insetos, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos e prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (FARMER e RYAN, 1992; OLIVEIRA et al., 2005; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; WUNSCHE, et al., 2011; JAMAL et al., 2012). Em contrapartida, como resultado de um processo coevolutivo, estes insetos também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através do aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes enzimáticas, tentando burlar esse efeito inibitório (JONGSMA e BOULTER, 1997; OLIVEIRA et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2006; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010, JAMAL et al., 2012).

Apesar dos mecanismos adaptativos dos insetos, pesquisas sobre a aplicabilidade de inibidores de proteases, em programas de controle de pragas, têm sido desenvolvidas e consideradas promissoras visando à expressão desses inibidores em plantas geneticamente modificadas, tornando-as mais resistentes ao ataque de insetos (HAQ et al., 2004; DUNAEVSKY et al., 2005; ZHANG et al., 2010a; JAMAL et al., 2012). Entretanto, o sucesso dessa estratégia será obtido quando a planta for capaz de expressar uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de proteases intestinais que estão envolvidas no processo de adaptação do inseto a esses (JONGSMA e BOLTER, 1997; VISÔTTO *et al.*, 2009a, b). Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto e as interações deste com o ambiente, levando em consideração à bioquímica da sua digestão, a contribuição da microbiota associada ao seu trato digestivo e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pelo inseto e pela microbiota simbiote (SRINIVASAN et al., 2006; PILON, 2008; VISÔTTO *et al.*, 2009a, b; DOUGLAS, 2009).

As enzimas primárias da digestão em lepidópteras são as serino-proteinases, particularmente tripsinas (TERRA e FERREIRA, 1994; TERRA et al., 1996, OLIVEIRA, et al., 2005). Estudos utilizando extrato bruto e purificado do trato intestinal de *A. gemmatalis* mostraram a predominância de serino-proteases do tipo tripsina no seu processo digestivo (OLIVEIRA et al., 2005, XAVIER et al., 2005, REIS, 2009). Recentes estudos sobre a existência e a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis* foram realizados, onde foi verificado que, além das proteases produzidas pelas próprias células de *A. gemmatalis*, há também proteases que são sintetizadas por microrganismos presentes no seu trato intestinal e que influenciam o seu desenvolvimento (MENDONÇA et al. 2009, VISÔTTO et al., 2009 a, b).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* e avaliar a expressão desses genes diante de inibidores de serino-proteases, bem como purificar e caracterizar serino-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal da lagarta da soja, a fim de esclarecer cientificamente os processos de interação planta-inseto e inseto-microbiota ligados ao mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis* a inibidores de proteases, para posterior desenvolvimento tecnológico de potentes inibidores ou ainda servir de base para a construção de plantas geneticamente modificadas no controle de insetos-pragas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

Atualmente, a cultura da soja (*Glycine max*) assume importante papel no cenário econômico mundial, integrando uma porção significativa nas balanças comerciais. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo da soja; consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, especialmente para atender demandas crescentes dos setores ligados à produção de produtos de origem animal e maior desenvolvimento e oferta de tecnologias, que viabilizaram a expansão da exploração sojícola para diversas regiões do mundo (DALL'AGNOL et al., 2010).

Dos principais países produtores de soja (Estados Unidos, Brasil e Argentina), o Brasil (segundo produtor mundial) é o que tem maior potencial (terra, tecnologia e clima) para expandir consideravelmente a produção de soja para atender uma demanda mundial crescente, o que vem se concretizando, haja vista o desempenho da Produção Nacional, nas últimas safras que saltou de 53,0 milhões de toneladas, na safra 2005/06 para 75,3 milhões de toneladas, na safra 2010/11 (CONAB, 2011).

Diante das perspectivas de redução da oferta global, em função da possível queda da safra dos Estados Unidos, principal produtor mundial, o Brasil pode ocupar um papel de destaque e ampliar a sua posição no mercado internacional. Tal fato é corroborado pela maior capitalização dos produtores brasileiros, associado ao aumento gradual na oferta de recursos nas modalidades de Custeio e Comercialização a juros controlados, que na safra 2011/12 estão estimados em R\$ 64,1 bilhões frente aos R\$ 60,7 bilhões do ano safra 2010/11 e R\$ 37,9 bilhões da safra 2008/09 (CONAB, 2011).

Dada à importância econômica da soja, os problemas ocasionados pelo ataque de pragas são consideráveis face aos prejuízos à produção e à qualidade dos grãos ou sementes (MAGRINI et al., 1999). A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos. Logo após a emergência, insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae), os córos e a broca-do-colo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Walker) (Lepidoptera:

Noctuidae) e a broca-das-axilas *Epinotia aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae) atacam as plantas durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até durante a floração. No início da fase reprodutiva é comum o ataque de percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Lepidoptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). Além destas, a soja pode ser atacada por outras espécies de insetos, em geral menos importantes do que as referidas anteriormente. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas, capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura, necessitam ser controlados (EMBRAPA, 2011).

Apesar dos danos causados na cultura da soja ser, em alguns casos, alarmantes, não se indica a aplicação preventiva de produtos químicos, pois, além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos da lavoura e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos (EMBRAPA, 2011).

2.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) é o principal desfolhador da cultura da soja na América do Norte e do Sul (VIANNA et al., 2011). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (PRAÇA et al., 2006; SÁVIO et al., 2008; VIANNA et al., 2011).

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. Uma única lagarta pode consumir cerca de 110 cm² de folhas de soja (VIANNA et al., 2011). O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos (SILVA et al., 2002). Os maiores danos ocorrem na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% do desfolhamento até atingir seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (ANDRADE et al., 2004). Embora a preferência alimentar desta lagarta seja a soja, a fase imatura do inseto é generalista e

pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período de floração (BATISTA et al., 2005).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (ANDRADE et al., 2004). Seu ciclo biológico é de aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais, com a fase adulta durando cerca de 15 dias, com a mariposa medindo cerca de 30 a 38 mm e apresentando coloração variando de cinza a marrom avermelhada ou amarelada, sem dimorfismo sexual. Uma linha transversal escura unindo as pontas das asas é observada quando estas estão completamente estendidas (Figura 1) (PRAÇA et al, 2006).



Figura 1: *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto.

Fonte: [http:// www.discoverlife.org/](http://www.discoverlife.org/)

A oviposição ocorre na face inferior das folhas, embora em casos de infestações mais sérias os ovos possam ser encontrados na superfície superior das folhas, pecíolos e até mesmo hastes. O período de incubação geralmente dura de três a cinco dias (BÁRBARA, 2000).

As lagartas recém-eclodidas alimentam-se das folhas e dependendo das condições ambientais podem apresentar de cinco a seis instares larvais, chegando a medir de 40 a 50 mm de comprimento. São de coloração variável de verde, pardo-avermelhada e em condições de alta população podem ser pretas, com cinco listras brancas longitudinais no corpo (Figura 2).



Figura 2: Estágio larval de *Anticarsia gemmatalis*.

Fonte: <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartasoja.htm>

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

Assim, no controle desta praga segue-se uma tendência geral de se experimentar métodos alternativos de controle que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável (BATISTA et al., 2005). No Brasil, destaca-se o programa de controle da lagarta da soja desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que utiliza o Vírus da Poliedrose Nuclear Multicapsídeo Baculovírus anticarsia (AgMNPV). Este vírus é altamente específico e atua driblando, de maneira eficiente os mecanismos de defesa da lagarta (SÁVIO et al., 2008).

As enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas. Foi demonstrado que a inibição de enzimas digestiva de *A. gemmatalis*, na presença de inibidores de proteases causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; MOREIRA et al., 2011). Portanto, o conhecimento das enzimas presentes no trato intestinal da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de novos programas de controle desta praga.

2.3. Interação planta-inseto

Nos ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos que estão continuamente interagindo de uma forma complexa (KANT & BALDWIN, 2007). As várias atividades benéficas desempenhadas pelos insetos em relação às plantas, como a polinização e a defesa e pelas plantas em relação aos insetos como prover abrigo, local para oviposição e alimento, mostram a estreita associação entre estes dois organismos (FLEMING et al, 2007). Por outro lado, os insetos podem atacar as plantas e, dependendo do nível da herbivoria, este pode ser extremamente prejudicial e levando-as até mesmo a morte.

Em resposta ao ataque dos insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização. Dentre elas estão a indução de proteínas de defesa, a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros, a síntese de metabólitos secundários e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules. Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e sequestro de compostos tóxicos, mecanismos de fuga e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA et al., 2001; JAMAL et al., 2012).

Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; WUNSCHE, et al., 2011; JAMAL et al., 2012). Os inibidores de proteases (IPs) são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência proteica nos insetos. Sua atividade antimetabólica é atribuída à interferência na digestão proteica, que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010; MOREIRA et al., 2011, JAMAL et al., 2012).

Pesquisas sobre a aplicabilidade de IPs em programas de controle têm sido desenvolvidas visando, principalmente, à expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (HAQ et al., 2004; DUNAEVSKY et al., 2005; ZHANG et al., 2010a; JAMAL et al., 2012). Estudos sobre os mecanismos de resistência de insetos em resposta a defesa de plantas levaram a uma valorização da notável diversidade e plasticidade das proteases digestivas de insetos. Além do papel de digerir proteínas dos

alimentos essas proteases também desempenham um papel na defesa contra inibidores de proteases de plantas (JAMAL et al., 2012).

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

Vários estudos também foram realizados no sentido de avaliar o efeito de inibidores de proteases do ponto de vista genômico. Os resultados desses estudos mostram que os perfis da expressão de genes das proteases de insetos apresentam diferentes respostas. Uma delas seria que a presença de IP leva à redução da expressão das proteases constitutivamente expressas no inseto, ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas e que são insensíveis aos inibidores. Outros resultados mostram uma hiperprodução de proteases sensíveis ao inibidor, no intuito de suprir o efeito deletério dos IPs. E por último, os IPs ativam a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas no inseto, mas que podem se ligar e degradar o IP, deixando as principais proteases digestivas do inseto livres para atuarem na hidrólise de proteases (BROADWAY, 1997; AHN et al. 2009; CHI et al., 2009; OPPERT et al, 2010; JAMAL et al., 2012). De acordo com esses autores os diferentes genes de proteases são ativados para atuar de forma coordenada para suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento do inseto contra os efeitos antinutricionais dos IPs.

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

2.4. Proteases

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo em ligações peptídicas. As proteases são classificadas de acordo com Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB dentro do grupo três (hidrolases), subgrupo quatro. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARETT, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais, os das exopeptidases e os das endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas dentro de quatro grupos, serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases. As serino-proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspartil-proteases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO et al., 1998).

Proteases digestivas de insetos são caracterizadas em serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases (TERRA E FERREIRA, 1994). Uma espécie de inseto, muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (LIU et al., 2004; ZHU-SALZMAN et al., 2008; AHAN et al., 2009; OPPERT et al., 2010; PETEK et al., 2012). Postula-se que possuir várias enzimas digestivas poderia ser uma sobreposição funcional para assegurar a degradação nutricional de proteínas (AHAN et al., 2009). O intestino médio de larvas de lepidópteros, por exemplo, hospeda um ambiente proteolítico complexo de diferentes

proteases como, tripsina, quimiotripsinas, elastases, cathepsina B-like, aminopeptidases e carboxipeptidases, que são todas responsáveis pela digestão de proteínas. Sob essa complexidade de múltiplas proteases específicas, geralmente existe uma matriz de diversas isoformas de protease (SRINIVASAN et al., 2006; ZHANG et al., 2010a; OPPERT et al., 2010; PETEK et al., 2012). Muitos insetos exibem uma surpreendente flexibilidade na adaptação a diferentes plantas hospedeiras por alterar as proteases específicas do seu intestino em resposta a mudanças qualitativas no teor de proteína na dieta e quando as proteases existentes são ineficazes e ou ineficientes para a digestão (BOWN et al., 2004, SRINIVASAN et al., 2006; OPPERT et al., 2010; PETEK et al., 2012; JAMAL et al., 2012).

Serino-proteases são as principais classes de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteros (APPLEBAUM, 1985; TERRA E FERREIRA, 1994).

2.4.1. Serino-proteases

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Essas enzimas pertencem a uma das maiores famílias gênicas do reino animal, são amplamente distribuídas na natureza e encontradas em todos os reinos de vida celular, bem como em vários genomas virais, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos (PAGE & DI CERA, 2008; LOUATI, et al., 2011). No genoma humano, por exemplo, cerca de 500 genes que codificam proteases foram identificados, dos quais 30% são serino-proteases ou homólogos de serino-proteases (HERRERO et al., 2005). Entre os insetos, um estudo com *Helicoverpa armigera* demonstrou a existência de pelo menos 28 genes diferentes pertencentes à família das serino-proteases cujos produtos são expressos no intestino (BOWN et al., 1997). Seus representantes mais conhecidos são as tripsinas e quimiotripsinas e participa de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos, no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (PERONA & CRAIK, 1995; GILL et al., 1996; HERRERO et al., 2005; PAGE & DI CERA, 2008; ZHANG et al., 2010a, ZHAN et al., 2011).

As serino-proteases são encontradas nos grupos de exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase e ômega peptidase. Com base em suas similaridades estruturais elas são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns. Clãs são divididos em famílias baseados na identidade de seqüência e similaridades

(BARRETT & RAWLINGS, 2001). O clã A (AS) agrupa famílias que possuam origens comuns com a quimotripsina; o clã B (SB) com a subtilisina; o clã C (SC) com a carboxipeptidase C; o clã E (SE) com a peptidase A D-Ala-D-Ala de *Escherichia* sp; o clã F (SF) com o repressor do Lex A; e o clã G (SG) que agrupa as serino-proteases ATP dependentes (RAWLINGS e BARRET, 1994; RAO et al., 1998; RAWLINGS et al., 2006). Essas enzimas são reconhecidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), e tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Algumas das serino proteases são também inibidas por reagente tiol tal qual *p*-cloromercuribenzoato (PCMB), devido à presença de um resíduo de cisteína na região do centro ativo (RAO et al., 1998).

RAO et al. (1998), em um trabalho de revisão, descreve que as serino- proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásica e esterásica. A massa molecular das serino-proteases em geral está na faixa de 18 a 35 kDa, entretanto, vários organismos possuem serino-proteases com massas moleculares maiores, como é o caso de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidae), cuja massa molecular, para duas enzimas tripsina-like, é de 56 e 63 kDa (WAGNER et al., 2002). O ponto isoelétrico das serino-proteases está geralmente na faixa entre pH 4,0 e 6,0. Serino-proteases alcalinas, que são ativas em pH altamente alcalino, representam um grande subgrupo das serino-proteases.

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

As serino-proteases geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupo hidroxila da serina do sítio ativo sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base leva a

formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acil-enzima, uma base imidazólica e uma amina. Este mecanismo implica num estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK et al., 1987). Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações (Figura 3). Este mecanismo é capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ligação peptídica mais de 10^9 vezes em relação à reação não catalisada (PERONA & CRAIK, 1995; HEDSTROM, 2002; PAGE & Di CERA, 2008).

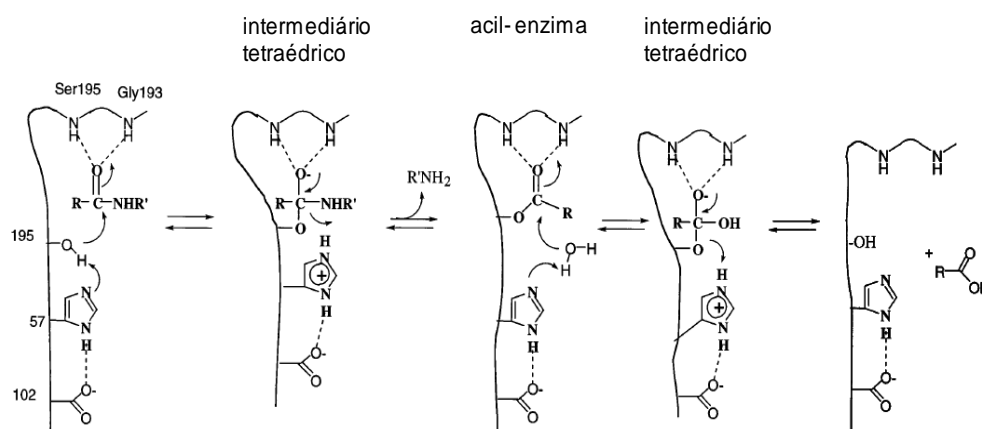


Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteases (HEDSTROM, 2002).

O mecanismo catalítico envolvendo a transferência de grupo acil ocorre de maneira idêntica para hidrólise de ligações éster ou amida, porém a relação entre a velocidade de acilação e de deacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a de deacilação e, para um substrato éster, esta velocidade pode ser 1 a 3 vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa de acilação é lenta e a de deacilação rápida, enquanto na atividade esterásica ocorre o inverso, a etapa de acilação é rápida e de deacilação lenta, sendo, portanto a etapa lenta o passo limitante da hidrólise (INAGAMI, 1972; FASTREZ & FERSHT, 1973).

2.4.1.1. Genes que codificam serino-proteases

A diversidade de genes de serino-proteases, principalmente as tripsina-*like*, para várias espécies, está bem relatada na literatura. Entretanto, a implicação das proteínas codificadas na digestão nem sempre é demonstrada (DÍAZ-MENDOZA et al., 2005). Alguns casos, tripsinas ativas são purificadas de extratos intestinais em lepidópteros, tendo mais de uma isoforma de tripsina descrita (MARCHETTI et al., 1998; NOVILLO et al., 1999; VOLPICELLA et al., 2003; ZHANG et al., 2010b; SILVA et al., 2010). Apesar desta diversidade encontrada, apenas recentemente foi desenvolvida uma análise filogenética de todos os genes tripsina-*like* de Lepidoptera expressas no intestino médio e que supostamente participam da digestão (LOPES et al., 2006).

Nos últimos anos, são vários os exemplos de identificação de genes de serino-proteases em insetos. Sequências de DNA ou cDNA de tripsina ou quimiotripsinas que são expressas em intestinos médios larvais, já foi descrita, em várias espécies: *Plodia interpunctella* (ZHU et al., 2000a, b), *Helicoverpa armigera* (MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000), *Scirpophaga incertulas* (MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000), *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001), *Sesamia nonagrioides* (DÍAS-MENDOZA et al., 2005), *Ostrinia nubilalis* (LI et al., 2005), *Spodoptera frugiperda* (BRIOSCHI et al., 2007), *Plutella xylostella* (L.) (SHI et al., 2009) *Mayetiola destructor* (ZHANG et al., 2010b) *Spodoptera litura* (ZHAN et al., 2011) entre outras.

A amplificação de cDNAs de precursores de tripsina-*like* de insetos se baseia na utilização de primers degenerados de duas grandes regiões conservadas de protease do tipo tripsina, “forward” QRIVGG e “reverse” CQGDSGGP (ZHU et al. 2000 a, b; MAZUMDAR-BROADWAY & LEIGHTON, 2001; LI et al., 2005). A sequência N-terminal QRIVGG é um motivo conservado que frequentemente ocorre nas formas ativas (não em zimógenos) das serino proteases (LAM et al., 2000). A sequência consenso CQGDSGGP ao redor da serina reativa 195, também é usualmente utilizada na identificação das serino-proteases. Já a sequência C-terminal é responsável pela especificidade do substrato e controle da atividade catalítica. Esta porção normalmente é codificada por um único éxon e contém a maioria dos resíduos que fazem contato com os resíduos P1 a P3 do substrato, bem como domínios responsáveis pela modulação da atividade catalítica (KREM et al., 1999).

Primers degenerados baseado nos domínios conservados His₅₇ (5'-ACTGCTGCHCAYTG-3') e Ser₁₉₅ (5'-GGRCCACCAGAGTCRCC-3') de serino proteases também foram utilizados para amplificar o genoma de *Anthonomus grandis*

(OLIVEIRA-NETO et al., 2004). A amplificação dos fragmentos de cDNA de serino-proteases sugerido para *Drosophila melanogaster* utilizou primers degenerados chamados de “forward” DmTF (5’GGTAGATCTCACGGCTGGACAYT3’) que codifica para His₅₇, “reverse” DmTR (5’TCGAATTCATTGTGACCGCCGCTCAYTG3’) e “reverse” SerPR (5’TATCTAGATGGGCCACCGGARTCNCCYTG3’) que codificam para a Ser₁₉₅. Além disso, de acordo com os autores, o primer DmTR também codifica Asp₁₈₉ que é encontrado no sitio de especificidade de tripsina (MAZUMDAR-BROADWAY & LEIGHTON, 2001).

Similarmente a vários outros artrópodes, tem se notado a organização de famílias multigênicas que codificam atividades serino-proteásicas em várias espécies de insetos, com várias famílias já identificadas. Já foram realizados trabalhos em, *Anthonomus grandis* (OLIVEIRA-NETO et al., 2004), *H. armigera* (BOWN et al., 2004; CHOUGULE et al., 2005), *Spodoptera frugiperda* (BRIOSCHI et al., 2007) entre outras. A ocorrência de famílias multigênicas parece ser comum, e os insetos parecem se assemelhar aos vertebrados, onde a diversidade de sequência de genes de serino-proteases corresponde à evolução da especificidade e função da enzima. Famílias multigênicas podem prover um mecanismo mais eficiente para a digestão de proteínas tanto quanto promover uma vantagem adaptativa para espécies que se alimentam de plantas. A indução transcricional e a complexa regulação dos múltiplos genes codificando enzimas estruturalmente diversas em resposta à ingestão de inibidores de proteases, provavelmente reflete uma adaptação dos insetos à utilização de dietas contendo esses inibidores. Conhecimentos gerados a partir da identificação do produto da tradução de cada mRNA dessas tripsinas, através da produção de enzimas recombinantes ou a purificação bioquímica das enzimas a partir de tecidos do intestino médio, poderiam ajudar nas estratégias de controle de insetos, permitindo o desenvolvimento de inibidores potentes e específicos e a produção de plantas transgênicas expressando múltiplos inibidores, levando em consideração a diversidade das enzimas digestivas do inseto (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001, JAMAL et al., 2012).

2.5. Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases podem estar presentes de maneira constitutiva em várias partes das plantas, podendo representar 5-15% da proteína total de sementes e órgãos de armazenamento, ou podem ser induzidos, local e sistemicamente, em resposta

ao ataque de insetos herbívoros (JONGSMA & BOULTER, 1997). Os inibidores têm como características o fato de serem extremamente resistentes à proteólise e permanecerem ativos em condições diversas de pH intestinal. Além disso, já foram identificados inibidores contra praticamente todas as classes de proteases descritas (JONGSMA & BOULTER, 1997).

Os inibidores das serino proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002, GATEHOUSE & GATEHOUSE, 2012; JAMAL et al., 2012). São proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em pelo menos 16 famílias diferentes, baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. Seu mecanismo de ação ocorre por inibição competitiva. Atuam bloqueando a ligação do substrato à enzima através da ligação de um segmento peptídico diretamente no sítio catalítico, de maneira semelhante ao substrato ou ao produto. A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa (10^{-7} a 10^{-14} M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002, GATEHOUSE & GATEHOUSE, 2012; JAMAL et al., 2012).

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

As duas mais bem caracterizadas famílias de inibidores de serino-proteases são os inibidores de tripsina da soja, dos tipos Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (BRANDON & FRIEDMAN, 2002), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade triptica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (BRANDON et al., 1989).

Os inibidores da família Bowman-Birk são proteínas globulares solúveis, caracterizadas por suas pequenas massas moleculares que variam de 8 a 10kDa, com alto conteúdo de cisteína, podendo apresentar sete pontes dissulfeto que confere grande estabilidade a sua estrutura, distribuídas em cerca de 70 a 90 resíduos de aminoácidos

(RICHARDSON, 1991). O primeiro inibidor pertencente à família Bowman-Birk, que deu origem a essa família, foi purificado de sementes de soja, constituído de uma cadeia polipeptídica com dois sítios reativos, um para tripsina e outro para quimotripsina e formado de 71 resíduos de aminoácidos (ODANI & IKENAKA, 1973, JAMAL et al., 2012). No caso da tripsina há presença de Lys ou Arg na posição P₁ e para a quimotripsina há presença de um grupo aromático ou um grupo hidrofóbico de cadeia longa. (LIN et al., 1993).

Os inibidores da família Kunitz são proteínas que apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas, em geral, com apenas um sítio reativo e massa molecular entre 18 e 24kDa, correspondendo a aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos, geralmente com quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto proporcionando estabilidade à estrutura proteica (RICHARDSON, 1991). A estrutura tridimensional desses inibidores é conhecida como família β -folhas sendo composta por 12 conformações betas antiparalelas conectadas por longas alças. O inibidor pode ser dividido em três subdomínios, cada um contendo cerca de 60 resíduos de aminoácidos. Cada subdomínio consiste de quatro folhas beta conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como A- β 1-A- β 2-A- β 3-A- β 4, em que “A” referem-se as alças que conectam as folhas beta.

A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família tipo Kunitz é dada pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfeto presentes na estrutura do inibidor (SONG & SUH, 1998). Os IPs da família tipo Kunitz apresentam uma alça de ligação exposta, que é conservada em todos os representantes, essa estrutura é denominada de conformação canônica (BODE & HUBER, 1992). Esses inibidores que apresentam a conformação canônica formam complexos estáveis com a proteinase alvo, a qual se dissocia lentamente (RITONJA, et al., 1990). A alça de ligação, embora frequentemente hidrofóbica, é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que flanqueiam o local do sítio reativo e o núcleo do inibidor (GRÜTTER, et al., 1988).

A benzamidina é uma amida aromática, inibidor sintético competitivo da tripsina. Esta, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S₁ da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico localizado no fundo do bolso do sítio S₁, apresentando K_i de 16,6 μ M (MARES-GUIA & SHAW, 1965; MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993). A benzamidina é uma molécula

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

O berenil é uma molécula formada por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição quatro de cada anel. A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (RAETHER et al. 1974). O berenil comporta-se como um inibidor parcialmente competitivo parabólico da tripsina (JUNQUEIRA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1993) apresentando K_i de 1,79 μM .

2.6. Microbiota bacteriana de insetos

Para melhor compreensão sobre a bioquímica e fisiologia de insetos, é necessário que eles sejam estudados dentro de um contexto ecológico e fisiológico juntamente com os microrganismos, sendo estes importantes componentes do sistema (DOUGLAS, 2009). A microbiota intestinal representa aspectos da relação microbiana, tanto de patógenos como de mutualismo obrigatório. Os primeiros estudos realizados sobre simbiose inseto-bactéria consideraram apenas a relação entre inseto e microrganismo patogênico e a consequente produção de inseticidas microbianos. Recentes pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a relação benéfica de como os microrganismos interagem com os insetos (DOUGLAS, 2009; SHINDE et al., 2012).

Os insetos apresentam uma grande variação em espécies, habitat, dieta e características estruturais de seus sistemas digestivos, fatores que afetarão a composição de suas microbiotas gastrintestinais. Microrganismos desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de insetos. Simbiontes contribuem para reprodução, digestão, nutrição e produção de feromônio (LUNDGREN & LEHMAN 2010; PRIYA et al., 2012, SHINDE et al., 2012).

Relações simbióticas entre insetos e suas bactérias intestinais têm sido estudadas extensivamente em muitos sistemas, particularmente em termites e afídeos, os quais se

alimentam da madeira e do floema, respectivamente. Em cupins, os microorganismos secretam celulases e lignases que fornecem glicose e ácidos graxos ao seu hospedeiro como fonte de energia (BREZNAK & BRUNE 1994).

O papel da flora bacteriana intestinal relacionada com a digestão de insetos da ordem Lepdoptera, os quais incluem algumas das pragras agrícolas e florestais mais prejudiciais do mundo, está ganhando atenção dos pesquisadores, pois se verifica que as enzimas digestivas podem ser derivadas da microbiota intestinal, as quais auxiliariam na digestão proteica do inseto e também na desintoxicação de metabólitos secundários de plantas(TERRA et al, 1996; DOUGLAS, 2009).

Estudos sobre a existência e a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis*, foram realizados. Verificou-se que além das proteases produzidas pelas próprias células de *A. gemmatalis*, há também proteases que são sintetizadas por microrganismos presentes no trato intestinal desses insetos e que estas influenciam o seu desenvolvimento(MENDONÇA et al. 2009, VISÔTTO et al., 2009 a, b). YIN et al., 2010 em estudos com larvas de *Hepialus gonggaensis* verificaram que na presença de probióticos vivos na dieta do inseto, esses aumentaram significativamente crescimento do inseto e diminuiu significativamente sua mortalidade. Além disso, as atividades proteásica, amilásica e trealásica totais aumentaram significativamente no fluido intestinal do grupo de insetos alimentados com probióticos vivos quando comparados ao grupo alimentado na ausência de probióticos, demonstrando assim que as bactérias intestinais são um fator importante no desenvolvimento bioquímico e fisiológico de *H.gonggaensis*. Recentemente, uma diversidade de bactérias foi isolada do intestino de *Helicoverpa armigera* frente a diferentes plantas hospedeiras (PRIYA et al., 2012). Dessa microbiota foi isolada uma bactéria, *Bacillus subtilis*, denominada RTSBA6 6.00, que foi capaz de produzir 12 isoformas de proteases o que levou os autores a relatar que a ocorrência das proteases produzidas pela bactéria *B. Subtillis* presente no trato intestinal de *H. Armigera* provavelmente atuam auxiliando na digestão de alimentos proteicos e também na adaptação dos insetos aos inibidores da protease de plantas hospedeiras (PRIYA et al., 2012).

De acordo com alguns autores, muitos microrganismos simbiotes contribuem com as complexas vias bioquímicas, ajudando no metabolismo do seu hospedeiro. Essas relações simbióticas ajudam a definir o perfil metabólico do inseto, contribuindo para uma eficiente transformação de macromoléculas a nutrientes essenciais (BRENNAN et al., 2004). As bactérias intestinais aumentam a sobrevivência do inseto hospedeiro,

melhorando a eficiência da digestão e fornecendo enzimas digestivas ou vitaminas (DILLON & DILLON, 2004; DOUGLAS 2009). Outro fator importante seria o fato de, os microrganismos possuírem propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos, auxiliando assim no seu desenvolvimento e agindo como “microrganismos corretores”, capacitando insetos fitófagos a superar barreiras bioquímicas como, por exemplo, a adaptação a inibidores de proteases produzidos pelas plantas (DOUGLAS, 2009).

A contribuição de microrganismos no desenvolvimento ecológico e nutricional de insetos só podem ser entendidas no contexto da totalidade da fisiologia do inseto e das interações deste com o ambiente ao qual ele está inserido (DOUGLAS, 2009).

2.6.1. Microbiota bacteriana de *Anticarsia gemmatalis*

Foram isoladas doze bactérias proteolíticas de larvas de *A. gemmatalis* de quinto instar em meio agar caseinato de cálcio, em condições aeróbias e anaeróbias. A análise por PCR-RFLP reuniu os doze isolados em cinco grupos. Um isolado de cada grupo foi selecionado e caracterizado. As sequências do gene 16S rRNA e testes bioquímicos identificaram as bactérias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*. Todas as bactérias foram capazes de produzir quantidades significativas de proteases quando cultivadas em meio de cultura adequado para produção dessas enzimas (VISÔTTO et al., 2009 b). Também foi demonstrado que a diminuição da microbiota bacteriana, através de administração de doses crescentes de tetraciclina a lagarta-da-soja, reduziu significativamente a atividade amidásica de proteases presentes no intestino desse inseto (VISÔTTO et al., 2009 a). MENDONÇA et al.(2009), observaram que a dieta alimentar exerce influência, mesmo que em poucas populações, no número de bactérias associadas ao trato intestinal de *A. gemmatalis*.

PILON (2008) realizou caracterizações bioquímica e cinética enzimática das serino e cisteína proteases dos extratos brutos das proteases produzidas por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, onde foi observado que as características das proteases bacterianas se assemelharam com as serino e cisteína proteases presentes na fração solúvel (produzida pelo próprio inseto) e na fração insolúvel (proteases ligadas à membrana) extraídas do intestino *A. gemmatalis* (OLIVEIRA et al., 2005, XAVIER et al., 2005; MENDONÇA et al, 2012). Esses resultados sugeriram que essas enzimas se produzidas por essas bactérias no intestino do inseto, provavelmente contribuem com a digestibilidade proteica de *A. gemmatalis*, desempenhando um papel

importante no processo de interação planta-inseto. Possivelmente, após bloqueio das proteases produzidas pelo inseto causado por ingestão contínua de inibidores de proteases no processo de defesa de plantas, essas bactérias passem a produzir grandes quantidades dessas proteases, como um mecanismo alternativo de defesa do inseto (PILON, 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AHN, J.E., ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology* 55 :678–685. 2009.

APPLEBAUM, S.W.; Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comparative Physiology, Biochemistry and Pharmacology of Insects*, Pergamon Press, Oxford, p.279–311, 1985.

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). *Arq. Inst. Biol.*,v.71, p.391-398, 2004.

BARRETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, v. 244, p. 1-15, 1994.

BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Journal of Biological Chemistry* 382, 727–733. 2001.

BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; DEMO, C.; MARTINI, E.S.; PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; BROD, C.S.; MONNERAT, R.G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n.82, EMBRAPA, 2005. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp082.pdf>, acessado em 3de julho de 2009.

BARBARA, K.A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) 2000. Disponível em: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm> >, acessado em 15 de maio de 2011.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein inhibitors and their interactions with proteinases. Eur. J. Biochem., .204: 433-451, 1992

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

BOWN, D.P., WILKINSON, H.S., GATEHOUSE, J.A., Regulation of expression of genes encoding digestive proteinase in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary proteinase inhibitors. *Physiol. Entomol.* 29, 278–290. 2004.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybean. *J. Agr. Food Chem.*, 37: 1192-1196, 1989.

BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 6635-6642, 2002.

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v.43, p.855-874, 1997.

BRENNAN, Y.; CALLEN, W. N.; CHRISTOFFERSEN, L.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; HEALEY, S.; HERNÁNDEZ, M.; KELLER, M.; LI, K.; PALACKAL, N.; SITTENFELD, A.; TAMAYO, G.; WELLS, S.; HAZLEWOOD, G. P.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; ROBERTSON, D. E. & STEER, B. A. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3609-3617, 2004

BREZNAK, J. A. & BRUNE, A. Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*, 39: 453-487, 1994.

BRIOSCHI, D., NADALINI, L.D., BENGTON, M.H., SOGAYAR, M. C., MOURAA, D. S., SILVA-FILHOA, M. C. General up regulation of *Spodoptera*

frugiperda trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 :1283–1290. 2007

CARTER, P. & WELLS, J.A. Dissecting the catalytic triad of serine protease. *Nature*. 332: 564-568, 1988.

CHI, Y.H., SALZMAN, R.A., BALFE, S., AHN, J.E., SUN, W., MOON, J., YUN, D.J., LEE, S.Y., HIGGINS, T.J., PITTENDRIGH, B., MURDOCK, L.L., ZHU-SALZMAN, K., Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin—costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology* 18, 97–110. 2009.

CHOUGULE, N.P., GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S. Gene Expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 355–367. 2005.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Estudos de Prospecção de mercado. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_22_14_05_58_prospecao_safra_2011-2012..pdf>. Acesso em : 12 maio 2012.

DALL'AGNOL, A. ; LAZAROTTO, J. J. ; HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira, Circular Técnica 74 Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Abril 2010.

DÍAS-MENDOZA, M., ORTEGO, F., GARCÍA de LACOBÁ, M., MAGAÑA, C., DE LA POZA, M., FARINÓS, G.P., CASTAÑERA, P., HERNÁNDEZ-CRESPO, P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1005-1020, 2005.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* v. 49, p. 71-92, 2004.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23, 38–47-2009

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

EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.15. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2012 e 2013. 261p, 2011.

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

FASTREZ, J. & FERSHT, A.R. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*. 12: 2025-2034, 1973.

FLEMING, PA., HOFMYER, S.D., NICOLSON, S.D.. Role of insects in the pollination of *Acacia nigrescens* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 73(1): 49-55. 2007

GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Genetic engineering of plants for insect resistance. http://silverserver.dur.ac.uk/Teaching/Rehcigl_Chapter/GM_InsectResistant_Plants, acessado em 31 de janeiro de 2012.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E.N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 162-183, 1996.

GRÜTTER, M. G.; FENDRICH, G.; HUBER, R.; BODE, W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *EMBO J.*, 7: 345-351, 1988.

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

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, v.102, p.4501-4523, 2002.

HERRERO, S.; COMBES, E.; VAN OERS, M.M.; VLAK, J.M.; MAAGD, R.A.; BEEKWILDER, J. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.35, p.1073-1082, 2005.

INAGAMI, T. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K.; MURACHI, T.; NARITA, K. *Proteins structure and function*. Tokyo, Kodansha, p.1-83, 1972.

JAMAL, F. ; PANDEY, P.K., SINGH, D.; • KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Ver. Publicação online*: 4 maio 2012.

JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 43: 885-895, 1997.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25: 873-887, 1992.

KANT, M. R., BALDWIN, I. T. The ecogenetics and ecogenomics of plant-herbivore interactions: rapid progress on a slippery road. *Current Opinion in Genetics & Development*. 17:519-524. 2007

KREM, M.M.; ROSE, T.; DI CERA, E. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.28063-28066, 1999

LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.30, p.85-94, 2000.

LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5: 93-109, 2002.

LI, H., OPPERT, B., HIGGINS, R.A., HUANG, F., BUSCHMAN L.L., GAO, J-R., ZHU, K.Y. Characterization of cDNAs encoding three trypsin-like proteinases and Mrna quantitative analysis in Bt-resistant and –susceptible strains of *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 847-860, 2005.

LIN, G.; BODE, W.; HUBER, R.; CHI, C.; ENGH, R. A. The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *Eur. J. Biochem.*, 212: 549-555, 1993.

LIU, Y.L., SALZMAN, R.A., PANKIW, T., ZHU-SALZMAN, K., Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1069–1077. 2004.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., MARANA, S.R., JULIANO, L., TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *InsectBiochemistry and Molecular Biology* 36, 130-140, 2006.

LOUATI, H.; ZOUARI, N.; MILED, N.; GARGOURI, Y. A new chymotrypsin-like serine protease involved in dietary protein digestion in a primitive animal, *Scorpio maurus*: purification and biochemical characterization. *Lipids in Health and Disease*, 10:121 2011

LUNDGREN, J.G.; LEHMAN, R.M. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle *PLoS ONE*, 5 (5) p. e10831, 2010.

MAGRINI, E.A.; BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO. S. Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. *Scientia agricola* 56(3): 547-555, 1999.

MARCHETTI, S.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PITOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.28, p.449-458, 1998.

MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate said chain. *J. Biol. Chem.*, 240: 1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hydrid model for the trypsin activation by modifiers. *J. Biol. Chem.*, 256: 1661-1668, 1981

MAZUMDAR-LEIGHTON, S., BABU, C.R., BENNETT, J. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insects pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 57-68, 2000.

MAZUNDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.31, p.645-657, 2001.

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.

MARCHETTI, S.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PITOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of

Spodoptera littoralis (Boisduval). Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.28, p.449–458, 1998.

MENDONÇA, E.G., OLIVEIRA, M.G.A., VISÔTTO, L. V., GUEDES, R.N., RIBEIRO, F.R. OLIVEIRA, J. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas. *revista Ceres*, 56(1): 018-024, 2009

MENDONCA, E. G.; OLIVEIRA • M. G. A, VISOTTO, L. E., GUEDES, • R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hubner)) *J Pest Sci* 85:117–123, 2012

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. (VII)-Dissulfide bridges in Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor. *J. Biochem.*, 74: 697-715, 1973.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.*, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.140B, p.369-380, 2005.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J. A. N.; RIGDEN, D.J.; FRAGOSO, R.R.; SILVA, R.O.; GOMES, E.A; FRANCO, O.L. DIAS, S.O; CORDEIRO, C.M.T.; MONNERAT, G.; GROSSI-DE-SA', M.F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton bollweevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pestresistant transgenic cotton plants *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 : 903–918, 2004.

OPPERT, B.; ELPIDINA, N., TOUTGES, M.; MAZUMDAR- LEIGHTON, S. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for

cysteine and serine protease inhibitors *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 5 280–287, 2010.

PAGE, M.J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.65, p.1220-1236, 2008.

PEREIRA, M. T. Avaliação termodinâmica completa da interação entre a β -tripsina e os inibidores benzamidina e berenil. Tese de Doutorado em Bioquímica e Imunologia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

PERONA, J.J.; CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, v.4, p.337-360, 1995.

PETEK, M. ; TURNSEK, N.; GASPARIC, M. B.; NOVAK, M.P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N., POPOVIC, T. , STRUKELJ, B. JONGSMA, M.A. Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. *ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY*, Vol. 79, No. 3, 153–181, 2012.

PILON, F.M. ; Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 115 p, 2008.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. . Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23-29, 2006.

PILON, A. M. ; OLIVEIRA, M. G. A. ; PILON, F. M. ; GUEDES, R. N. C. ; OLIVEIRA, J. A. ; FAZOLLO, A. . Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepoptera:Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Revista Ceres*, v. 56, p. 744-748, 2009.

PÓLGAR, L.; HALÁSZ, P. Currents problems in mechanistic studies of serine and cisteyne proteases. *Biochem. J.*, 207: 1-10, 1982.

PRAÇA, L.B.; SILVA NETO, S.P.; MONNERAT, R.G. *Anticarsia gemmatalis*/Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae:). *Biologia*, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196), 2006.

PRIYA, N. G.; OJHA, A. KAJLA, M.K. RAJ, A.; RAJAGOPAL, R. Host Plant Induced Variation in Gut Bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* , janeiro Volume 7 , 2012

RAETHER, W.; LOEWE, H.; SEIDENATH, H. Trypanozider effect der in saurer lösung entstehenden spaltprodukte Von berenil und ihre mögliche in vivo-rückkupplung in NMRI-mäusen. *Tropenmed. Parasit.*, 25: 273-282, 1974.

RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: 597-635, 1998.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRETT, A.J, *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 34, D270-D272, 2006..

REIS, D.T.C. purificação e caracterização de proteases digestivas *tripsina-like* do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 106 p, 2009

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: *Methods in plants Biochemistry*. New York Academic Press, 5: 259-305, 1991.

RITONJA, A.; KRIZAL, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKEL, J. B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.*, 504: 41-44, 1990.

SAVIO, G. M., PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, 2008.

SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato J Chem Ecol, 36:490–499, 2010

SHI, M.,HUANG, F., CHEN, Y. MENG, X.,CHEN, X. Characterization of midgut trypsinogen-like cdna and enzymatic activity in plutella xylostella parasitized by cotesia vestalis or diadegma semiclausum. Archives of insect biochemistry and physiology, vol. 70, no. 1, 3–17,2009.

SHIVAJI , R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TURLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. J Chem Ecol, 36:179–191, 2010

SHINDE, A.A.; SHAIKH, F.K.; PADUL, M.V. ;KACHOLE, M.S. Bacillus subtillis RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin-like proteases. Saudi Journal of Biological Sciences xxx, xxx–xxx, 2012

SILVA C. P.; TERRA W. R.; DE SÁ M. F. G.; SAMUELS R. I., ISEJIMA E. M., BIFANO T.D., Almeida J.S. Induction of digestive α - amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α - amylases inhibitor 1. Journal of Insect Physiology, v.47, p.1283- 1290, 2001.

SILVA-FIALHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento. 12: 38-42, 2000.

SILVA, F.B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R.B.; PIRES, C.V.; XAVIER, L. P. PIOVESAN, N.D.; OLIVEIRA, J.A.; JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A. Função

fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner.) Arquivos do Instituto Biológico, v.69, p.67-74, 2002.

SILVA, L.B.; REIS, A.P.; PEREIRA, E.J.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES R.N.C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 155 :12–19, 2010.

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interection between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue type plasminogen activator. J. Mol. Biol., 275: 347-363, 1998.

SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, v.11, p.132-154, 2006.

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

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

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

VISÔTTO, L. E., OLIVEIRA , M.G.A. , GUEDES, R.N.C., RIBON , A.O.B. GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Journal of Insect Physiology 55 : 185–191, 2009a.

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

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

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.

YIN, Y.; UM, D.; CHEN, S.; LIU, L.; WANG., Z; The title of the article: effects on growth and digestive enzyme activities of the *Hepialus gonggaensis* larvae caused by introducing probiotics. *World J Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s11274-010-0486-4, Springer Science+Business Media B.V. 4 julho de 2010

ZHAN, O.; ZHENG, S.; FENG, O.; LIU L. A midgut-specific Chymotrypsin cDNA (slctlp1) from *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, localization and expression analysis, *ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY*, Vol. 76, No. 3, 130–143 ,2011.

ZHANG, C.; ZHOU, D.; ZHENG, S.; LIN, L.; TAO, S.; YANG, L.; HU, S.; FENG, Q. A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. *Journal of Insect Physiology* 56:788–799, 2010a.

ZHANG, S.; SHUKLE, R.; MITTAPALLI, O.; ZHU, Y. C.; REESE, J.C.; WANGF, H.; HUA, B.; CHEN, M. The gut transcriptome of a gall midge, *Mayetiola destructor*. *Journal of Insect Physiology* ,56 :1198–1206, 2010b

ZHU-SALZMAN, K., KOIWA, H., SALZMAN, R.A., SHADE, R.E., AHN, J.E., Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12, 135–145. 2003.

ZHU-SALZMAN, K., LUTHE, D.S., FELTON, G.W., Arthropod-inducible proteins, broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology* 146, 852–858, 2008.

ZHU, Y.C., KRAMER, K.J., DOWDY, A.K., BAKER, J.E. Trypsinogen-like cDNAs and quantitative analysis of mRNA levels from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1027–1035, 2000a.

ZHU, Y.C., OPPERT, B., KRAMER, K.J., MCGAUGHEY, W.H., DOWDY, A.K. cDNA sequences, mRNA expression levels, and genomic DNAs of trypsinogen from the Indianmeal moth *Plodia interpunctella*. *Insect Mol. Biol.* 9, 19–26, 2000b.

WAGNER, W., MÖHRLIN, F., SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32(7), 803-814, 2002

WUNSCH, H. ; BALDWIN, I.T.; WU, J.S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata* *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 13, pp. 4605–4616, maio., 2011

CAPÍTULO I

Isolamento, identificação e expressão de genes de serino-proteases de *Anticarsia gemmatalis* em resposta a inibidores de proteases

RESUMO

A cultura da soja (*Glycine max*), vem ao longo dos anos destacando-se como um dos principais produtos agrícolas da economia brasileira. A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* é uma das principais pragas da cultura da soja. Os enormes prejuízos causados pelo ataque da lagarta associados à importância econômica da soja para o Brasil, fomentam a busca por alternativas no controle deste inseto. A utilização de inibidores de proteases (IPs), no controle de pragas, vem se destacando como uma alternativa menos danosa no contexto ecológico ao qual o inseto está inserido. Os IPs são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência proteica nos insetos. Apesar disso, os insetos geralmente conseguem driblar esses agentes considerados tóxicos ao seu organismo. A ligação entre a capacidade de adaptação do inseto e a diversidade de genes de proteases digestivas é um estudo interessante do ponto de vista evolutivo. Assim o presente estudo descreve o isolamento e a identificação de genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* e também avalia a expressão desses genes em insetos alimentados com dieta com e sem inibidores de serino-proteases. Foram isolados três genes distintos de serino-proteases do genoma da lagarta da soja chamados de Agem 1, Agem 2 e Agem 3, indicando que os genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* estão organizados em família multigênica no seu genoma. Os três genes mostraram alta identidade com tripsinas de outros insetos da ordem Lepidoptera. Foi verificado que a expressão do gene Agem 2 se sobressaiu em relação ao gene Agem 1 e Agem 3, evidenciando que esse deve ser expresso em maior quantidade no trato intestinal do inseto. As sequências descritas neste trabalho evidenciaram serem genes que expressam tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino protease Benzamidina, uma vez que ocorre um aumento na sua expressão durante o tratamento com o inibidor em relação ao controle. O inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes de tripsinas isolados neste estudo, evidenciando que o sítio de ativação secundária S2` de tripsinas, estando livre da interação com inibidores, são extremamente importantes na adaptação do inseto a inibidores de proteases. Os genes de tripsinas isolados mostraram ser sensíveis aos inibidores proteicos da soja SKTI e SBBI, diminuindo sua expressão durante o tratamento. Estudos anteriores mostram que ocorre uma adaptação da lagarta da soja a esses inibidores, assim é possível verificar que a repressão dos genes de tripsinas diante de SKTI e SBBI provavelmente ativa a produção de enzimas insensíveis

a esses inibidores da mesma classe e/ou outra classe mecanicista, propiciando assim a adaptação do inseto a esses inibidores de proteases. Esses estudos nos mostram que a expressão diferencial de proteases digestivas de insetos é de grande importância para elucidar o mecanismo adaptativo de pragas agrícolas a inibidores de proteases. São necessários estudos mais profundos sobre as respostas de genes de *A. gemmatalis*, frente a inibidores de proteases durante seu desenvolvimento larval, a fim de identificar moléculas que seriam fundamentais no processo de adaptação do inseto a esses compostos, permitindo assim a seleção ou o desenvolvimento de agentes inibidores que sejam efetivos no controle de pragas agrícolas.

PALAVRAS-CHAVE: lagarta da soja, digestão de insetos, genômica, interação planta-inseto.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país (SÁVIO et al., 2008). A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE et al., 2004; VIANNA et al., 2011).

Entre os insetos que trazem consequências econômicas mais significativas na soja, destaca-se a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae), uma das principais pragas desfolhadoras da cultura no Hemisfério Ocidental. Esta espécie causa perdas consideráveis na produção e requer atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (SÁVIO et al., 2008; Martins et al., 2009; VIANNA et al., 2011).

O controle dos insetos-praga como a lagarta da soja, tem sido realizado, essencialmente, mediante a aplicação de inseticidas químicos. Considerando os problemas relacionados à ação desses inseticidas sobre organismos não alvos, a contaminação de águas e resíduos em alimentos, tornam-se necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes (MILLS E KEAN, 2010).

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERRY et al., 2006; SCOTT et al., 2010). Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases. Esta via é responsável pela produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010; WUNSCHÉ, et al., 2011; JAMAL et al., 2012)

Os inibidores de proteases (IPs) são considerados agentes antimetabólicos que acarretam a uma deficiência protéica nos insetos. Sua atividade antimetabólica é atribuída à interferência na digestão protéica, através da diminuição da disponibilidade de aminoácidos, o que prejudica a síntese de proteínas necessárias ao crescimento,

desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010; MOREIRA et al., 2011, JAMAL et al., 2012). Pesquisas sobre a aplicabilidade de inibidores de proteases em programas de controle têm sido desenvolvidas visando, principalmente, à expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (HAQ et al., 2004; DUNAEVSKY et al., 2005; ZHANG et al., 2010a).

Estudos sobre as respostas biológicas e bioquímicas de *A. gemmatalis* submetidos a dietas contendo inibidores de serino-proteases, mostraram que esses agentes antimetabólicos causam retardo no crescimento, diminuição da taxa de sobrevivência e aumento da digestibilidade proteica dos insetos. Entretanto, é possível observar uma adaptação durante o desenvolvimento dos insetos frente aos inibidores de proteases, sugerindo que deve ocorrer a hiperprodução de enzimas sensíveis ao inibidor e a síntese de formas insensíveis, além de poder dispor da síntese de outras classes de proteases (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009, MOREIRA et al., 2011).

A relação entre a capacidade de adaptação do inseto e a diversidade de genes de proteases digestivas é um estudo interessante do ponto de vista evolutivo, tendo em vista que a adaptação dos insetos aos inibidores de proteases ainda não está totalmente esclarecida. Vários estudos com insetos foram realizados no sentido de avaliar o efeito de inibidores de proteases do ponto de vista genômico. Os resultados desses estudos mostram que os diferentes genes de proteases são ativados para atuar de forma coordenada para suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento do inseto contra os efeitos antinutricionais de IP (BROADWAY, 1997; AHN et al. 2009; CHI et al., 2009; OPPERT et al, 2010; JAMAL et al., 2012).

As serino-proteases são as principais classes de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteros (TERRA E FERREIRA, 1994). Estudos utilizando extrato bruto e purificado do trato intestinal de *A. gemmatalis* mostraram a predominância de serino-proteases no processo digestivo desse inseto (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005, REIS, 2009). Apesar da relevância das serino-proteases no processo digestivo de *A. gemmatalis*, pouco se sabe sobre os genes que expressam essas proteases e como elas se comportam frente a inibidores de proteases.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* e avaliar a expressão desses genes quando o inseto é alimentado com dieta acrescida de inibidores de serino-proteases, visando esclarecer o processo da interação planta-inseto. Os resultados desse trabalho poderão contribuir

para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle da lagarta da soja, possibilitando a seleção de inibidores de proteases que atuem de modo eficaz na inibição das proteases digestivas deste inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Insetos

2.1.1 Criação da lagarta da soja

Ovos de *A. gemmatalis* foram mantidos a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas. Para obtenção dos insetos adultos, as pupas foram colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50cm revestida internamente com folhas de papel sulfite A4. Após eclosão, os adultos alimentavam-se com solução nutritiva composta de mel (10,5g), cerveja (350mL), sacarose (60g), ácido ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri. As posturas de *A. gemmatalis* ocorreriam após três dias na superfície das folhas de papel que revestia internamente a gaiola, as quais foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5cm de largura x 10cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500mL) com um orifício circular na tampa de, aproximadamente 2cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram transferidos para uma câmara climatizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas. Após a eclosão dos ovos iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO et al., 1985) colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

2.1.2 Preparo da dieta

A dieta artificial foi composta de feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Ágar e água foram autoclavados por 15 minutos à pressão de $1,5\text{ kgf/cm}^2$. A essa mistura adicionaram-se os outros ingredientes e misturados, com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida foi adicionado ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (metilparabeno) (5g), formol 40% (6ml) e 10mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantotenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25mg), riboflavina (0,50mg), piridoxina (0,25mg), ácido fólico (0,25mg), biotina (0,02mg), inositol (20mg), água (1L) até formar uma pasta homogênea que foi transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida sob luz ultravioleta e conservada a 4°C .

Outras quatro dietas foram preparadas da mesma maneira descritas acima, porém com acréscimo de 0,5% (p/v) do inibidor sintético de serino-protease Benzamidina, 0,0019% (p/v) do inibidor sintético de serino-protease Berenil, 0,1% (p/v) do inibidor protéico de serino-protease SKTI e 0,1% (p/v) do inibidor proteico de serino-protease SBBI em cada dieta.

2.1.3 Insetos submetidos a tratamento com e sem inibidores

Lagartas foram criadas com dieta livre de inibidores de acordo com o item 2.1.2 até o 5º instar de desenvolvimento, a partir desse momento os insetos foram submetidos às dietas contendo inibidores de serino-proteases, sendo coletadas 100mg de amostras de intestinos após 6, 12, 24 e 48 horas de cada tratamento. Os tratamentos foram determinados como: controle, lagartas criadas com dieta livre do inibidor de serino-proteases; Tratamento 1 : lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor Benzamidina; Tratamento 2 : lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor Berenil; Tratamento 3 : lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor SKTI e Tratamento 4: lagartas criadas com dieta acrescida do inibidor SBBI.

2.2 Extrações de RNA e síntese de cDNA

Lagartas de 5º instar criadas com dieta artificial sem inibidor e lagartas submetidas aos tratamentos 1, 2, 3 e 4 (item 2.1.3), foram colocadas a -20 °C para redução das atividades vitais e dissecadas. 100 mg de intestinos médios foram retirados e lavados repetidas vezes com água DEPC (água Milli-Q tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato, autoclavada duas vezes) até a retirada total do conteúdo interno dos intestinos. O material biológico obtido foi macerado em presença de nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante.

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,0% (SAMBROOK, *et al.*, 2001). A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pelas leituras de absorvância a 260 nm e 280nm de 1 µL de amostra no aparelho Evolution 60 (Thermo Scientific).

A síntese de cDNA foi realizada, por meio do kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega®), utilizando 4 µg de RNA total e Oligo dT (12-18) primer, em um volume final de 20 µL. A ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante. O

cDNA foi quantificado com o uso do acessório nanocell Evolution 60 (Thermo Scientific).

O cDNA das lagartas de 5º instar criadas livre de inibidor foi submetido a amplificação por PCR, para posterior sequenciamento de genes. Os cDNAs de lagartas submetidas aos tratamentos (item 2.1.3) (1, 2, 3 e 4) foram armazenados a – 20°C até a reação de amplificação por PCR em tempo real para análises de expressão.

2.3 Amplificações do cDNA

As amplificações dos fragmentos de cDNA foram realizadas utilizando pares de primers degenerados baseados em domínios conservados de serino-proteases de insetos utilizados em trabalhos anteriores (Tabela 1).

Tabela 1-Primers usados neste trabalho.

Nome	Sequência	Referência
P1	5'ACTGCTGCHCAYTG3'	OLIVEIRA-NETO et al, 2004
P2	5'GGRCCACCAGAGTCR3'	
DMTF	5'GGTAGATCTCACGGCTGGACAYT3'	MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000
DMTR	5'TCGAATTCATTGTGACCGCCGCTCAYTG3'	
DMTF	5'GGTAGATCTCACGGCTGGACAYT3'	MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000
SerPR	5'TATCTAGATGGGCCACCGGARTCNCCYTG3'	

A reação de amplificação consistiu de 5,0 µL do cDNA, 1,0 µL *Taq* DNA Polimerase (fermentas), 5,0 µL de tampão 10X, 1,25 µL de desoxirribonucleico mix (dNTP) 10mM, 3,75 µL de MgCl₂ 25mM e 2,5 µL de cada *primer* 10µM sendo o volume final da reação completado com água Milli-Q para 50 µL. As amostras foram amplificadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para as seguintes condições: uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2 min, seguidos por 30 ciclos desnaturação inicial a 94°C, 1 min a 55° C e 3 min a 72°C, e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. A reação foi analisada em gel de agarose 1,2 % e corado posteriormente com 1,0 µg/mL de brometo de etídio. A imagem foi registrada em sistema de foto-documentação Eagle-Eye II (Stratagene).

2.4 Sequenciamento e análise *in silico* das sequências obtidas

Os fragmentos de cDNA amplificados com os pares de primers da Tabela 1 foram purificados usando *Kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Up System* (Promega®), conforme recomendações do fabricante. Os cDNAs purificados foram enviados à empresa MacroGen Inc. na Coreia do Sul (www.macrogen.com) onde foram sequenciados. As sequências foram montadas utilizando o programa Sequencher 4.10.1 (GeneCodes) e analisadas com as sequências disponíveis na base de dados do GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), usando o programa BLASTX ou tBLASTn, de forma a obter informações relativas à porcentagem (%) de similaridade com outras sequências já depositadas.

2.5 Confeções dos primers para análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Para a confecção dos primers específicos, visando o estudo da expressão dos genes de *A. gemmatilis* diante da presença de inibidores de serino proteases, as sequências de cDNAs obtidas conforme o item 2.4. foram alinhadas por meio do programa Clustal X 2.1 (THOMPSON et al., 1997) para desenhos dos primers específicos das regiões não homologas que codificam essas proteases (Tabela 2).

Tabela 2: Primers específicos de serino- proteases de *A. gemmatilis*

Nome da Sequência	Sequência (5'-3')
Agem 1f	5'GTATCAGAGCAACGTGCAG 3'
Agem 1r	5'CAGTTCGCGGTTAATTTTA 3'
Agem2f	5'CACACAGGAAACAGCTATGA 3'
Agem 2r	5'CAAGTAGCCTGATTGATGGT 3'
Agem 3f	5'AGTAGGTTCTGCTCTAGCCC 3'
Agem 3r	5'CCTTCCAACGTAACGTA ACTC 3'

2.6 Transcrições reversa PCR quantitativo (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo os manuais da Applied Biosystems. Baseado nos valores de Ct (Cycle threshold), que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi realizado a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). As reações de PCR

em tempo real foram realizadas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), oligonucleotídeos específicos (Tabelas 2), cDNAs obtidos dos tratamentos (item 2.1.3) e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o primer específico desenhado para gene HSC 70 de *Anticarsia gemmatalis* (GenBank: ADO32621. 1), que apresentou baixa variação de expressão entre os tratamentos avaliados (HscAG1f5'GGCAACAGGACCACGCCCTC3', HscAG1r5'CCGAGGTAGG CCTCGGCTGT 3'). Esse primer foi desenhado utilizando o programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems*).

As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. As análises de quantificação relativa de cada gene foram feitas em tubos individuais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento, sequenciamento e identificação de genes de serino-proteases expressos em *A. gemmatalis*.

Para obtenção dos genes de serino-proteases da lagarta da soja, o RNA total foi extraído do intestino de lagartas no 5º instar de desenvolvimento, no qual é verificada maior atividade de serino-protease (OLIVEIRA et al. 2005, PILON et al., 2006, PILON et al, 2009; MOREIRA et al., 2011). A integridade da amostra está mostrado na Figura 1.

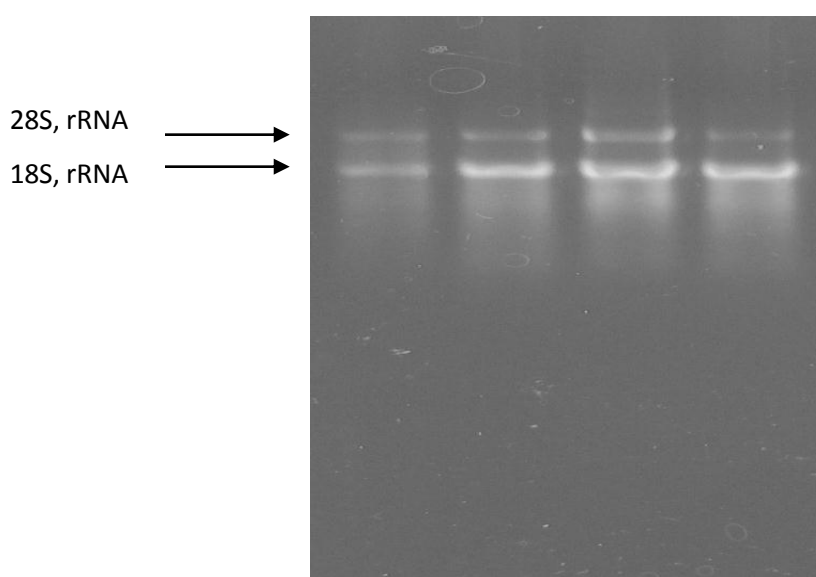


Figura 1: Análise por eletroforese em gel de agarose 1,0 % do RNA total extraído do intestino de *Anticarsia gemmatalis* de 5º instar.

Inicialmente foram feitas várias tentativas de extração de RNA, porém sem muito sucesso, pois o material apresentava-se sempre degradado. Por ser o lúmen intestinal um ambiente rico em diversos materiais biológicos, incluindo enzimas, decidiu-se lavar o interior do intestino com água livre de RNase antes da maceração em nitrogênio líquido. Após essa modificação foi possível obter um RNA total de boa qualidade para os experimentos posteriores. Verificou-se assim o aparecimento de duas bandas do RNA, 18S e 28S, sem a presença de arraste no gel de agarose (Figura 1).

Para amplificação da primeira fita do cDNA usaram-se primers degenerados com base em domínios conservados de serino-protease de outros insetos (Tabela 1) (MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000; OLIVEIRA-NETO et al., 2004). Estratégia similar foi utilizada com sucesso para a identificação de genes de serino-proteases em outros insetos da ordem Lepidoptera, *Sesamia nonagrioides* (DÍAS-MENDOZA et al.,

2005), *Ostrinia nubilalis* (LI et al., 2005), *Spodoptera frugiperda* (BRIOSCHI et al., 2007), *Plutella xylostella* (L.) (SHI et al., 2009), *Spodoptera litura* (ZHAN et al., 2011) entre outras.

A amplificação dos cDNA de *A.gemmatalis* foi satisfatória com todos os pares de primers utilizados, apresentando fragmentos com aproximadamente 500pb(Figura 2).

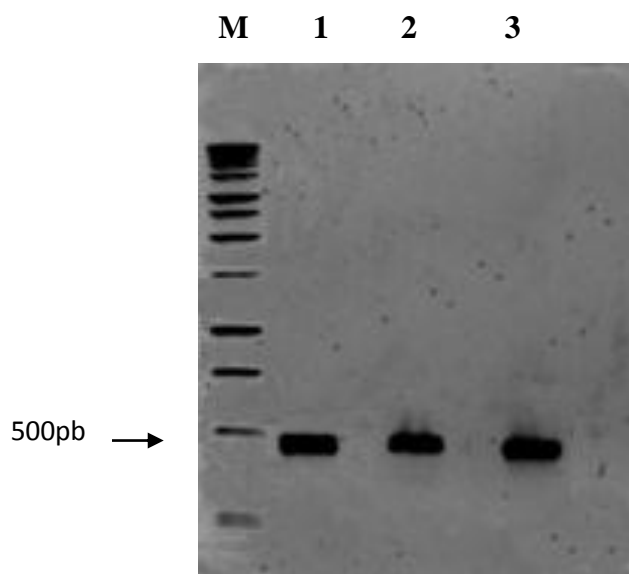


Figura 2: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0 % dos fragmentos de cDNA gerados da amplificação com os pares de primers (Tabela 1): P1 e P2(1); DMTF e DMTR (2); DMTF e SerPR (3). M: Marcador DNA ladder 1kb (Fermentas). A seta indica fragmentos amplificados (~500pb)

Após a reação de PCR os fragmentos de cDNA 1, 2 e 3 (Figura 2), foram purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas no programa Sequencher 4.10.1 (GeneCodes), no qual foi realizado o alinhamento da reação *forward* com a *reverse*, obtendo-se três “contig” diferentes, um para cada par de primer utilizado, dos quais foram denominados Agem 1, Agem 2 e Agem 3 (Figura 3).

Agem 1

```

attgtgaccgcgggcgcatagcnnngtgcagtgccccggcggtgctgcagcaccggccgcat
I V T A A H S X V Q C P A V R S T G R D
gtggcgcgagcctgcccattgcccagctgggtgctatcagcggcgagcgggcagc
V A R S L R H C R S W C Y Q R P Q R G S
gaaggcgtgattctgagccgctgcccggcgcgaaactggtggatattgctggtgatt
E G V I L S R V R R R A K L V D I A V I
aaaagcgagcattattggcctgaactatgtgaaccggatgatctgcccattgtgccc
K S A S I I G L N Y V N P D D L P I V R
gccccgctggggcgatgctgcagcggccccggcgagcaacgaactgctggatgtgacc
A G W G A I A Q R G P A S N E L L D V T
atataaaaattaaccggaactgtgcccggcgcgatctgaccctgcccacccccggc
I Y K I N R E L C A A R D L T L P T P G
tttgtgaccgaaaacatttgcggggcctgctggatattgaaggcgggcgctgcccag
F V T E N I C A G L L D I E G A G A C Q
ggcgatagcggcgccgagcccggcctggggcgaccggcacctttagctgc
G D S G G P S R R W A T G T F S C

```

Agem 2

gctggataacaactttaccaggaaccgctgacatgattaccccgagctatctgggc
A D N N F T Q E T A M T M I T P S Y L G
gataccattgaatatagcagctatgagcaacgcgctggcgctgccgatggccgc
D T I E Y S S Y A S N A L G A L P Y G R
ccggcgggggccggaatccagcagctttgaatattgtgaccgcgccgcatg
P A G G R E F T S D F E F I V T A A H C
tttattaacgatccggcgaaccgctggcgcttcgctgggcagcacctgggcgaacagc
F I N D P A N R W R I R V G S T W A N S
ggcgtggtgcataccgctgggcagcattattattcatccgaactataacggcgccgaccatt
G V V H T V G S I I I H P N Y N G A T I
gatagcgatgtggcgattctgagcagcgcgaccaccattagccataaacacctggtgccc
D S D V A I L R S A T T I S H N T L V R
ccggcgagcattgagcagcgcgagctatattctggcgataaccaggtggtggtggcgacc
P A S I A S A S Y I L A D N Q V V W A T
ggctggggcgctgtatgtgaacggccccgagcagcgaacagctgcccattgtgcagatt
G W G A L Y V N G P S S E Q L R H V Q I
tggaccattaaccagggcaccctggcgaccctgctatgagcccgccgccaacattacc
W T I N Q A T C R T R Y A T R G R N I T
gataacatgctgtgagcggctggctggatgtggcgcccgatcagtgccagggcgat
D N M L C S G W L D V G G R D Q C Q G D
agcgccggccccgagccgc
S G G P S R

Agem 3

cgcatgctgcccggcgccgattggcgcccgccgcaacagcattgtgaccgcccgcgcatg
R M L P A A I G G R G N S I V T A A H C
gtgcatgaatccgcaacgtgcccggcgctggcgcttcgctgggcagcgcgctggcg
V H E F R N V P A A W R I R V G S A L A
catagcggcgctttctgcattattgcccgaataattattattcatccgaactatgatcgc
H S G G F L H Y C G K I I I H P N Y D R
tttaccaccgaaaccgatattgctgatgataccgctgggccccgattgtgtatattgaa
F T T E T D I A L M H T V G P I V Y I E
aacgggtgagccggcgccgattggcgccaccaactatcatctggcgataacgaagaa
N A V Q P A R I A G T N Y H L A D N E E
gtgtggggcgctgggctggggcgctgtataacctgaccaacatggcgccgagcgaagaactg
V W A V G W G V Y N L T N M A A S E E L
cgccatgtgcagatgtggaccgtgaaccaggaaatttggccgctgctatgtggccgc
R H V Q M W T V N Q E I C R V R Y V G R
aacattaccgataacatgctgtgagcggctggctggatgtggcgcccgatgataccctgc
N I T D N M L C S G W L D V G G R D T C
cagggcgatagcgccggccccgagccgc
Q G D S G G P S R

Figura 3: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas de Agem1, Agem 2 e Agem 3 isoladas de *Anticarsia gemmatilis*. Os aminoácidos representados em vermelho fazem parte da tríade catalítica de serino-proteases His, Asp e Ser (H, D, S)-respectivamente.

As análises de similaridade das sequências Agem 1, Agem 2 e Agem 3 através do banco de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa BLASTX ou tBLAST-N, mostrou que todas as sequências de cDNA de serino-proteases de *A. gemmatilis* possuem maiores valores de identidade com tripsinas de outras lepidópteras (Tabela 3).

Tabela 3-Análise das sequências de genes de serino-proteases isoladas de *Anticarsia gemmatalis*

<i>Amostra</i>	<i>Classe</i>	<i>Identidade</i>	<i>Organismo/N° de acesso</i>
Agem 1	Tripsina	58%	<i>Ostrinia nubilalis</i> (<u>AAX62037.1</u>)
Agem 2	Tripsina	71%	<i>Helicoverpa armigera</i> (<u>CAA72957.1</u>)
Agem 3	Tripsina	57%	<i>Choristoneura fumiferana</i> (<u>AAA84423.1</u>)

Vários autores relataram à presença de genes que expressam serino-proteases do tipo tripsina em insetos de ordem Lepidoptera, usando primers degenerados baseados no domínio conservado dessa classe de enzimas. Entretanto, esses autores também relatam a ocorrência de serino-proteases do tipo quimotripsina na expressão dos genes dos insetos estudados, sendo que muitas vezes essas são expressas em maior quantidade em relação à expressão de tripsinas (MAZUMDARLEIGHTON & BROADWAY, 2001, DÍAS-MENDOZA *et al.*, 2005, BRIOSCHI *et al.*, 2007, SHI *et al.*, 2009). De acordo com esses fatos, é possível inferir que as serino-proteases, primariamente expressas pela lagarta da soja, seriam as do grupo das tripsinas, tendo em vista que não houve nenhuma similaridade das sequências analisadas no presente estudo com outras serino-proteases.

O alinhamento das sequências Agem1, Agem 2 e Agem 3 com várias outras serino-proteases de insetos disponíveis nos bancos de dados, mostrou a presença das regiões conservadas de serino-proteases, inclusive os resíduos His, Asp e Ser (H, D, S) que fazem parte da tríade catalítica característica de serino-proteases necessárias para clivagem proteolítica (Figura 4). A clivagem baseia-se na ação coordenada destes três resíduos (RAWLINGS & BARRETT, 1994; PAGE & DI CERA, 2008; NIU *et al.*, 2011, SRIWICHAI *et al.*, 2012), resultando na hidrólise da sequência alvo. Os genes Agem 1, Agem 2 e Agem 3 contém dois dos três motivos do sítio ativo de serino-proteases que são altamente conservados (TAAHC e GDSGGP), o terceiro motivo da tríade catalítica que costuma ser comum a essa classe de enzimas é o aparecimento do motivo DIAL, porém este apresentou-se variado para Agem 1 e Agem 2. Esse motivo apresenta-se variável para diferentes serino-proteases sem afetar a atividade catalítica da enzima (ZOU *et al.*, 2006; SRIWICHAI *et al.*, 2012). Dessa forma, a utilização de primers degenerados baseados em domínios conservados de serino-proteases de insetos,

mostrou-se eficiente como estratégia na identificação das seqüências que codificam tripsinas em *A. gemmatalis*.

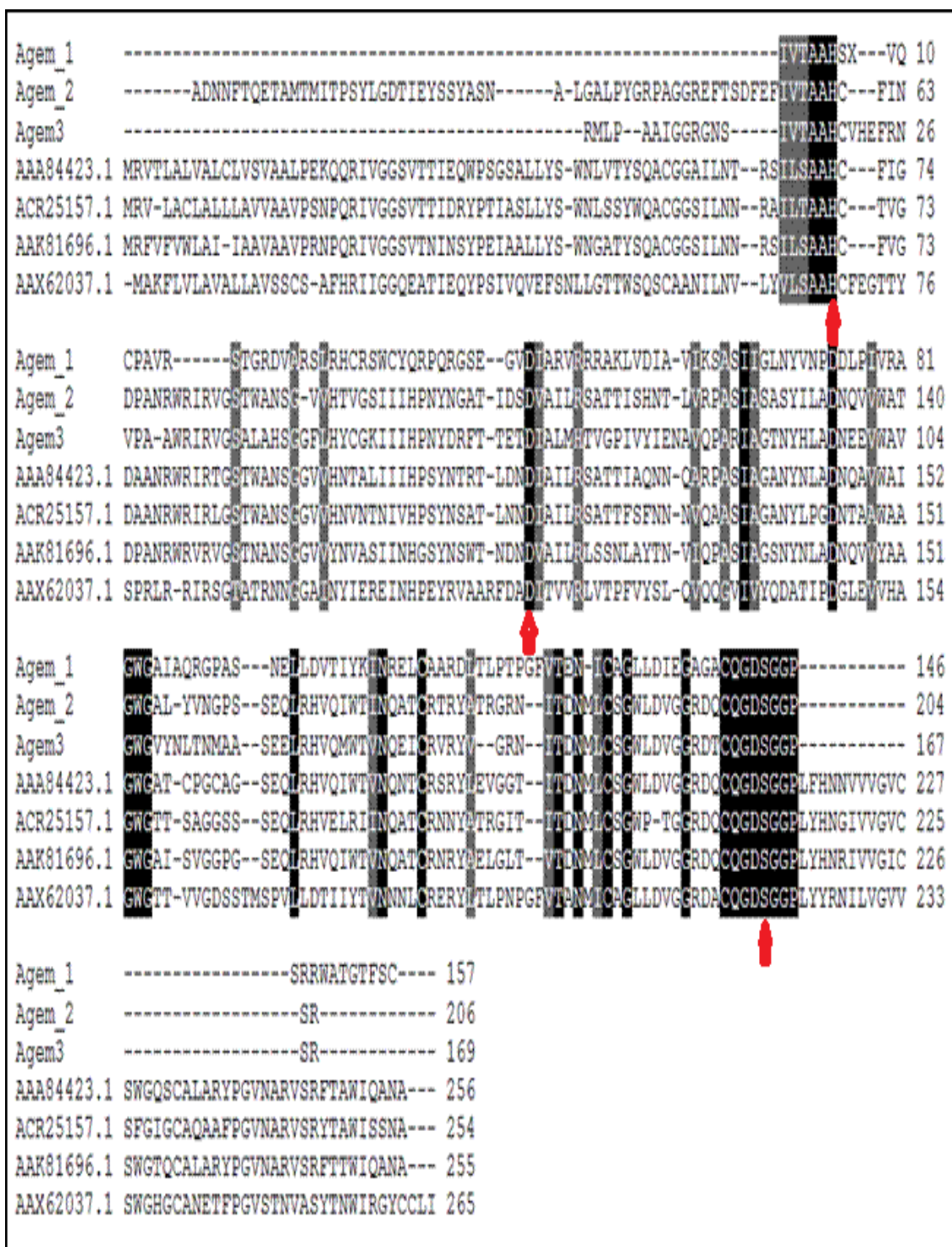


Figura 4: Alinhamento múltiplo de seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas de *Anticarsia gemmatalis* (Agem 1, Agem 2 e Agem 3), *Choristoneura fumiferana* (AAA84423. 1), *Spodoptera frugiperda* (ACR25157. 1), *Galleria mellonella* (AAk81696. 1), *Ostrinia nubilalis* (AAX62037. 1). As regiões conservadas estão mostrado em preto. As regiões em cinza diferem em apenas um aminoácido para as sete seqüências. As regiões da tríade catalítica de serino-proteases apontadas com as setas vermelhas.

Uma árvore filogenética *Bootstrap Neighbour-Joining* (Bootstrap 1000) derivada da análise do alinhamento das sete seqüências descritas na Figura 4 utilizando o programa Clustal X 2.1, mostrou a distância filogenética entre as mesmas (Figura 5). Através da filogênia, o cDNA Agem 2 e Agem 3 possuem maior similaridade, pois foram agrupados no mesmo grupo, já o Agem 1 aparece em outro grupo.

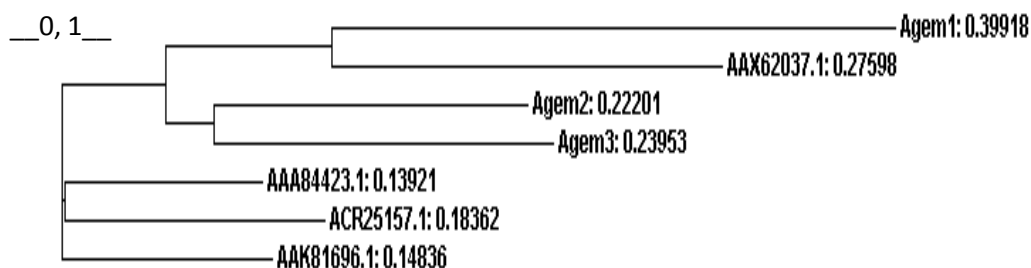


Figura 5: Árvore filogenética (Bootstrap 1000) construída do alinhamento padrão de Clustalx 2.0.10. das seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas de *Anticarsia gemmatalis* (Agem1, Agem 2 e Agem 3), *Choristoneura fumiferana* (AAA84423. 1), *Ostrinia nubilalis* (AAX62037. 1), *Spodoptera frugiperda* (ACR25157. 1), *Galleria mellonella* (AAK81696. 1). A escala indica um processo evolutivo de 0,1 de distância das substituições de aminoácidos por sítio.

Alinhando as seqüências Agem 1, Agem 2 e Agem 3 expressas por *A. gemmatalis* através do programa Clustal X 2.1, foi verificado que a similaridade entre Agem 2 e Agem 3 foi de 58%, enquanto esses dois em relação a Agem 1 foi em média de 32% de similaridade (Figura 6).

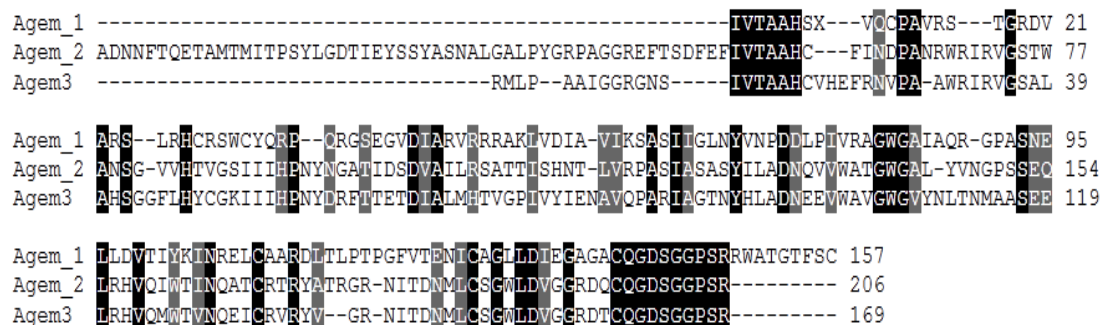


Figura 6: Alinhamento múltiplo de seqüências aminoacídicas de serino-proteases codificadas por *Anticarsia gemmatalis* (Agem 1 Agem 2 e Agem 3). As regiões conservadas estão em preto. As regiões em cinza diferem em apenas um aminoácido para as sete seqüências

Também foi obtido a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI) teóricos, para as seqüências codificadas de *A. gemmatalis*, através de predição utilizando o programa *Compute pI/Mw* (http://web.expasy.org/compute_pi/). As massas preditas em kDa

foram 16,83 para Agem 1, 22,32 para Agem 2 e 18,63 para Agem 3. Os pIs foram 9,38 para Agem 1, 6,20 para Agem 2 e 6,73 Agem 3.

Esses dados em conjunto nos levaram a verificar que apesar das similaridades apresentadas entre as sequências Agem 1, Agem 2 e Agem 3, estas ainda são diferentes entre si, tanto na estrutura como massa molecular e pI, indicando assim a presença de família multigênica de serino-proteases no genoma de *A. gemmatalis*. A utilização de primers degenerados possibilitou inferir que existam outras sequências dessas proteases que ainda não foram identificadas no genoma da lagarta da soja. Similarmente a vários outros artrópodes, tem se observado a organização de famílias multigênicas que codificam serino-proteases em várias espécies de insetos, com várias famílias já identificadas. Já foram realizados trabalhos similares com *Anthonomus grandis* (OLIVEIRA-NETO et al., 2004) *H. armigera* (BOWN et al., 2004; CHOUGULE et al., 2005), *Spodoptera frugiperda* (BRIOSCHI et al., 2007), entre outros.

A ocorrência de famílias multigênicas parece ser comum, e os insetos parecem se assemelhar aos vertebrados, onde a diversidade de sequências de genes de serino-proteases corresponde à evolução da especificidade e função da enzima. Famílias multigênicas podem prover um mecanismo mais eficiente para a digestão de proteínas tanto quanto promover uma vantagem adaptativa para espécies que se alimentam de plantas. A indução transcricional e a complexa regulação dos múltiplos genes codificando enzimas estruturalmente diversas em resposta à ingestão de inibidores de proteases, provavelmente reflete uma adaptação dos insetos à utilização de dietas contendo estes inibidores (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001).

3.2 Expressões de genes de serino-proteases de *A. gemmatalis* em resposta a inibidores de proteases

Estudos anteriores mostram que a lagarta da soja parece conseguir driblar o efeito de inibidores de serino-proteases na sua alimentação, modificando seu desenvolvimento larval e sua digestibilidade proteica adaptando-se a um composto considerado tóxico ao seu organismo (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009, MOREIRA et al., 2011).

A fim de compreender o envolvimento de cada gene de tripsina de *A. gemmatalis* identificada no presente estudo, em resposta a inibidores proteases, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real quantitativo para analisar a expressão desses genes durante o período de exposição dos insetos a diferentes inibidores de serino-proteases. Devido à similaridade de domínios conservados entre as sequências obtidas, primers

específicos das regiões não homologas que codificam essas proteases, foram desenhados através do alinhamento destas, para que as expressões das tripsinas fosse o mais fiel possível ao seu gene (Tabela 2).

Todos os genes de tripsina de *A. gemmatalis* isolados no presente estudo, mostraram aumento dos níveis de transcritos quando as lagartas foram expostas a uma dieta rica em inibidor de serino-protease Benzamidina (Figura 7). A Benzamidina é uma amida aromática sintética que inibe de forma competitiva a tripsina, interagindo eletrostaticamente com o resíduo Asp localizada no fundo do bolso do sítio S1 da tripsina e estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico do centro ativo da enzima (MARES-GUIA & SHAW, 1965; MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993).

De acordo com a Figura 7, os genes Agem 1 e Agem 2 mostraram um aumento na expressão a partir das 6 h de tratamento com o inibidor, sendo que foi observada uma superexpressão desses genes a partir de 24h de tratamento em relação ao controle. O gene Agem 3, mostrou um aumento a partir de 12h de tratamento com o inibidor onde este foi constante até o final do experimento. Todos os genes considerados controles (ausência de inibidor) mostraram aumento nos níveis de expressão durante o experimento, porém esta foi inferior à quantificação relativa referente aos tratamentos com inibidor. Esse aumento pode ter ocorrido devido a alterações no desenvolvimento do inseto durante o curso do tempo do experimento, ou devido ao estresse causado pelas condições experimentais (BRIOSCHI et al., 2007). Estudos sobre proteases intestinais de *A. gemmatalis* apontam um aumento global na atividade de proteases durante o ciclo de vida do inseto alimentado com dieta artificial ausente de inibidor, apresentando altos picos no quinto instar de desenvolvimento do inseto (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009).

Na Figura 7 também é possível observar que a expressão do gene Agem 2, tanto para tratamento 1 quanto para controle, é mais elevada quantitativamente quando comparada que a expressão dos genes Agem 1 e Agem 3. Como todo o experimento ocorreu em concentrações padronizadas e iguais de cDNA de cada gene, é possível inferir que esse gene é expresso em maior quantidade e de forma diferenciada no organismo do inseto, caracterizando mais uma vez a presença de famílias multigênicas dessas proteases no genoma de *A. gemmatalis*.

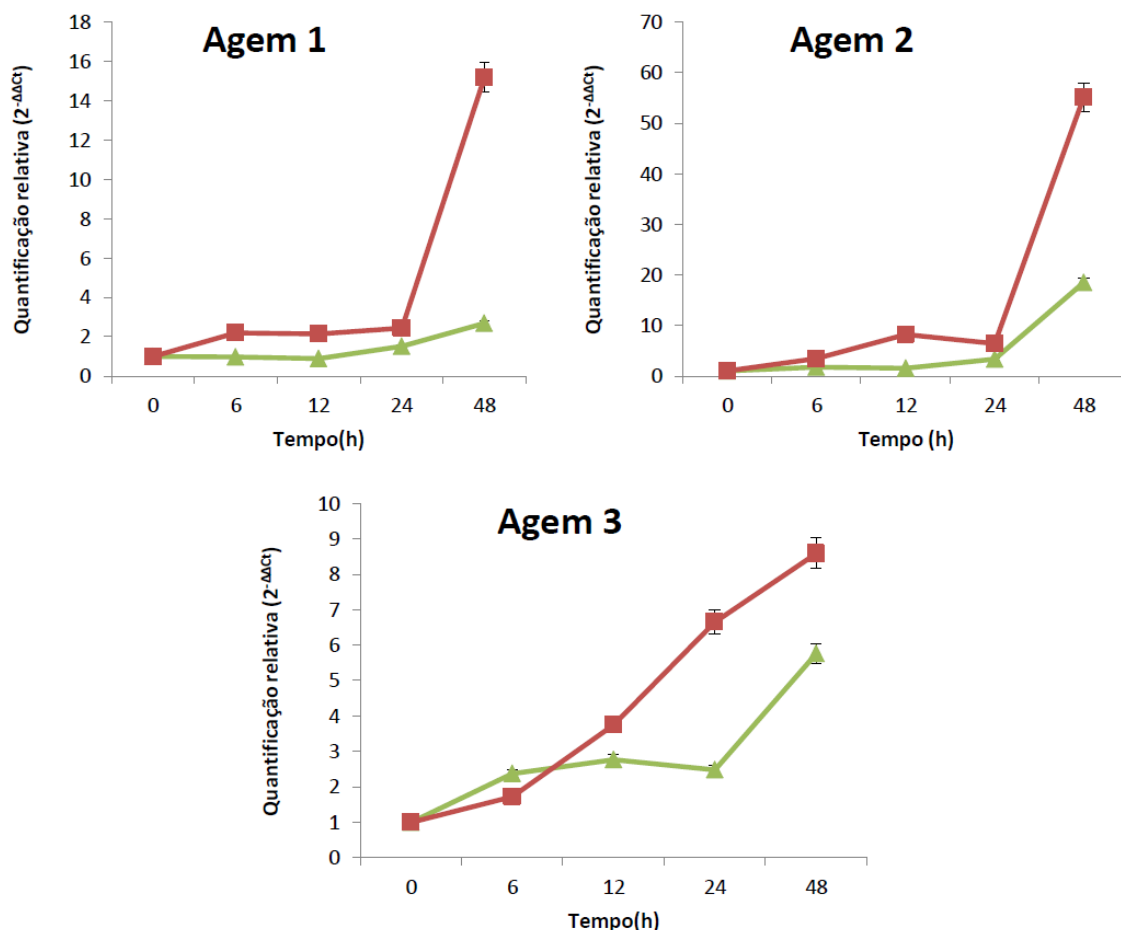


Figura 7: Análise quantitativa da expressão de genes de tripsina de *A. gemmatalis*, por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (Δ) e com uma dieta suplementada com inibidor Benzamidina 0.5% (p/v) (\square). As barras verticais representam o desvio padrão da média.

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

Tendo em vista esses relatos e os observados neste trabalho, as sequências isoladas de *A. gemmatalis* evidenciam ser genes de tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino-protease Benzamidina, uma vez que ocorre um aumento na expressão desses genes durante o tratamento com o inibidor. Provavelmente, num primeiro contato com o inibidor o inseto ativa e mantém ativo, os genes que codificam

essas enzimas digestivas, onde provavelmente ocorreria a síntese tripsinas sensíveis ao inibidor Benzamidina que seria produto da tradução de um pool de mRNA pré-existente. De outra forma, uma estratégia mais seletiva do inseto, os genes de enzimas digestivas seriam ativados de uma maneira similar à primeira, porém nas horas seguintes, apenas as enzimas insensíveis ao inibidor Benzamidina seriam mantidas e transcricionalmente reguladas seguindo a ingestão de inibidores de proteases. Assim a biodisponibilidade de aminoácidos estaria sendo utilizada para a síntese de mais proteases ao invés da biossíntese de outras proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto. Esta estratégia, embora energeticamente cara para o inseto, poderia ser considerada como uma das possibilidades de adaptação a inibidores de proteases.

O inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes Agem 1, Agem 2 e Agem 3 de tripsina de *A. gemmatalis* isolados neste estudo (Figura 8). O berenil é um inibidor sintético parcialmente competitivo parabólico de enzimas do tipo tripsina. Esse inibidor, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo no sítio de especificidade S1, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima S2', comportando-se como inibidor competitivo parabólico com o substrato (JUNQUEIRA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1993).

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

Relacionando os dados contidos nas Figuras 7 e 8 com os fatos relatados para o desenvolvimento de *A. gemmatalis* diante dos inibidores Benzamidina e Berenil, é possível inferir que os inibidores de proteases que ocupam apenas o sítio S1 do centro ativo da enzima, como no caso da Benzamidina, não têm a mesma eficiência inibitória que o Berenil, que além de ocupar sítio de especificidade S1, liga-se também o sítio de ativação secundária S2'. Provavelmente a ativação ou a inibição da expressão pelos genes que codificam enzimas proteolíticas no genoma de *A. gemmatalis* em presença de inibidores, está associada com a sinalização desencadeada pela ligação do inibidor ao sítio de ativação secundário S2' da tripsina. Esses fatos evidenciam que o sítio de ativação secundária S2' de tripsinas são extremamente importante na adaptação do inseto a inibidores de proteases.

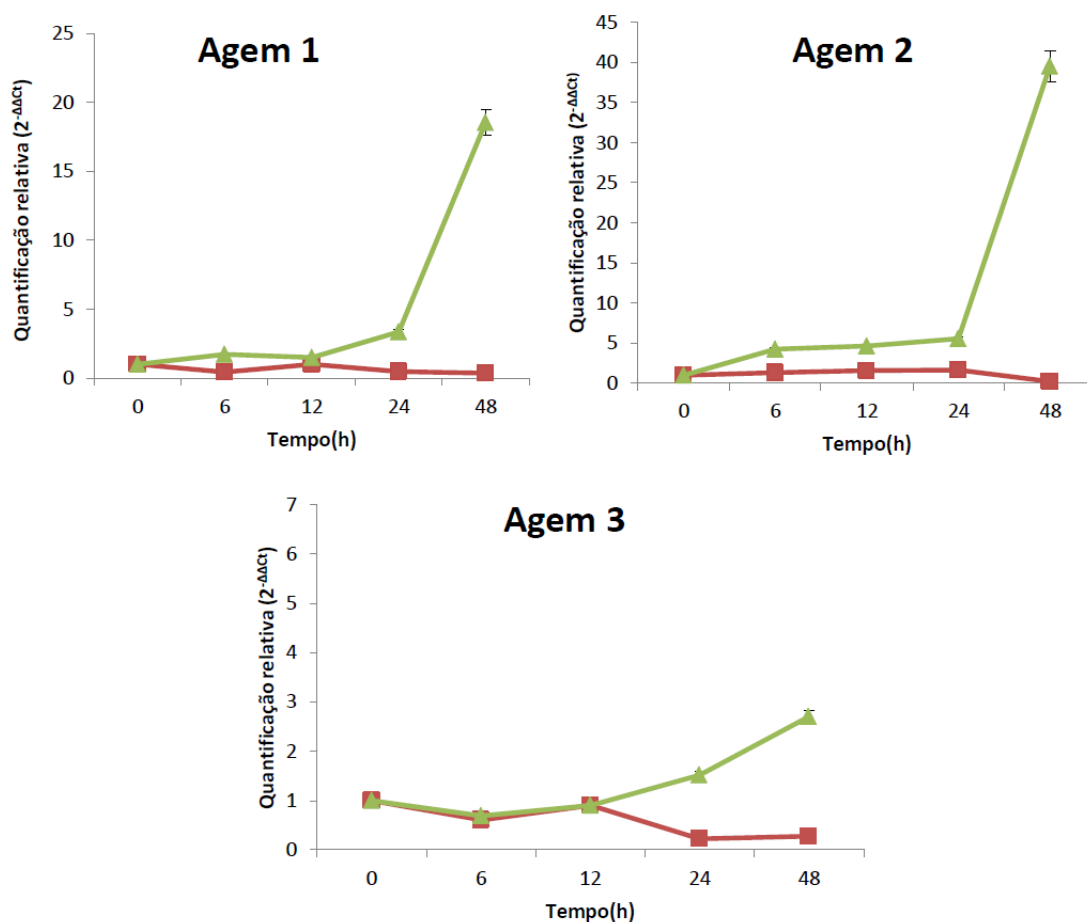


Figura 8: Análise quantitativa da expressão de genes de tripsina de *A. gemmatilis*, por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (Δ) e com uma dieta suplementada com inibidor Berenil 0,0019% (p/v) (\square). As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Nas Figuras 9 e 10, é possível verificar que os genes isolados, apresentam comportamento diferenciado nos níveis de expressão na presença dos inibidores proteicos de soja, dos tipos Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). É possível observar que houve uma diminuição na expressão com o aumento do tempo de exposição do insetos a tais inibidores. Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (BRANDON & FRIEDMAN, 2002), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (BRANDON et al., 1989).

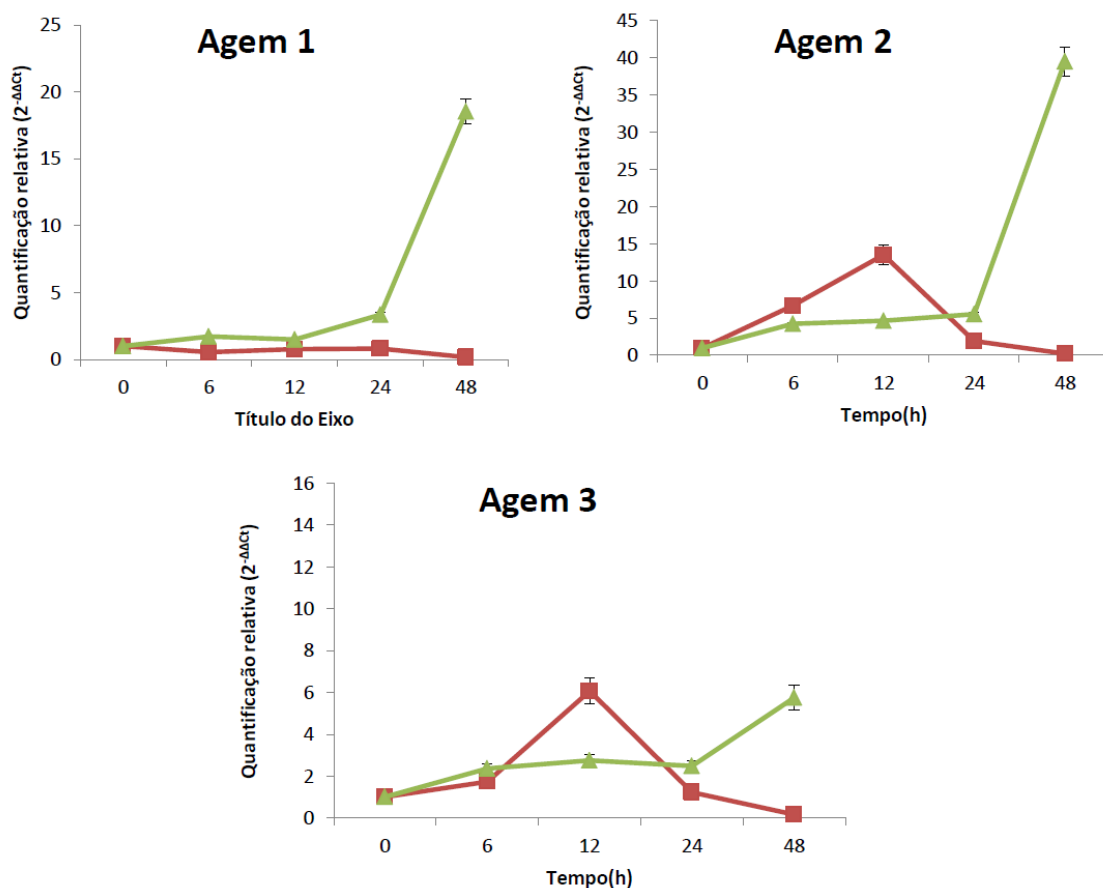


Figura 9: Análise quantitativa da expressão de genes de tripsina de *A. gemmatalis*, por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (Δ) e com uma dieta suplementada com inibidor SKTI 0,1% (p/v) (\square). As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Os inibidores do tipo Kunitz interagem com a enzima tendo o resíduo de aminoácido na posição P₁, arginina ou lisina. Essa interação direta do resíduo do sítio reativo do inibidor com o sítio catalítico da enzima caracteriza um mecanismo de inibição competitiva. Isto é relativamente comum para inibidores de tripsina da família Kunitz. A conformação canônica do *loop* do sítio reativo de SKTI interage com o sítio reativo da enzima através de ligações eletrostáticas e interações de hidrogênio (BODE & HUBER, 1992), formando assim, um complexo EI bastante estável.

Os inibidores da família Bowman-Birk também apresentam o *loop* com conformação canônica que interage com o centro ativo da enzima. As presenças de sete pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura do inibidor podem torná-lo menos flexível para adaptar-se às enzimas tripsina-like purificadas em comparação ao SKTI (BODE & HUBER, 1992).

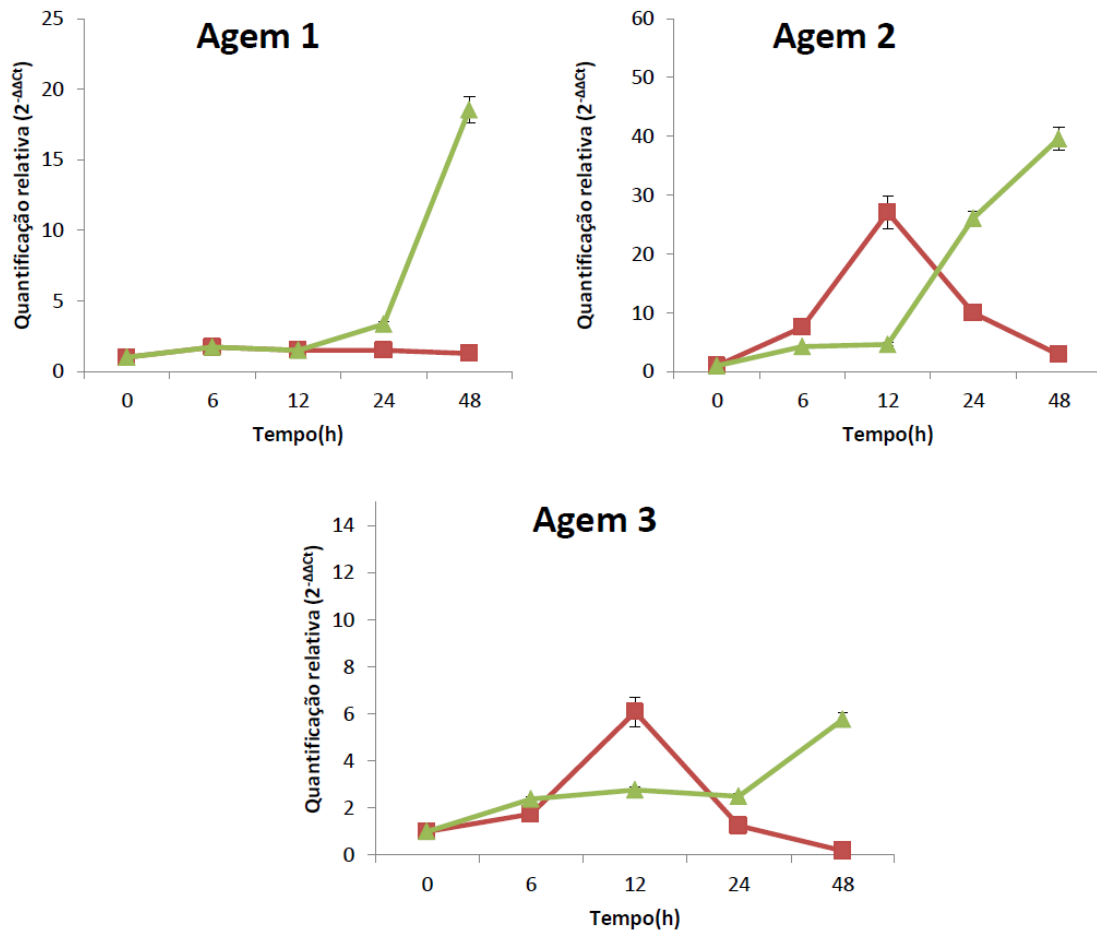


Figura10: Análise quantitativa da expressão de genes de tripsina de *A. gemmatalis*, por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído a partir dos intestinos de larvas alimentados com dieta livre de inibidor (Δ) e com uma dieta suplementada com inibidor SBBI 0,1% (p/v) (\square). As barras verticais representam o desvio padrão da média.

Observando as Figuras 9 e 10, inicialmente verificamos a diminuição da expressão do gene Agem 1 diante da interação entre enzima e inibidor, mostrando que esse gene expressa proteases sensíveis ao SKTI e SBBI e parece ser regulado de forma a inibir a expressão do mesmo diante desses inibidores. Os genes Agem 2 e Agem 3, foram ativados inicialmente até 12 h de tratamento, onde provavelmente ocorre a síntese tripsinas sensíveis aos inibidores proteicos SKTI e SBBI, que seriam produtos da tradução de um pool de mRNA pré-existente. Após 12h, a expressão relativa dos genes Agem 2 e Agem 3, chega praticamente a ser nula comparada com as expressões dos controles estudados, provavelmente isso ocorre devido ao consumo desse pool de mRNA para essas proteases sensíveis aos inibidores, uma vez que a expressão desses genes no grupo controle foi crescente. Como visto anteriormente pela árvore filogenética (Figura 5) e pela similaridade obtida do alinhamento dos genes de tripsinas

da lagarta da soja (Figura 6), observamos que apesar da diferença estrutural de Agem 2 e Agem 3, estes possuem maior similaridade entre si, o que justifica esse comportamento semelhante diante da sinalização provocada pela presença dos inibidores proteicos SKTI e SBBI.

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

Relacionando os resultados do presente estudo com os relatados por MENDONÇA (2012), é possível observar que ocorreu uma adaptação deste inseto a estes inibidores. Primeiramente, deve ocorrer uma ativação da expressão de proteases sensíveis aos inibidores como no caso dos genes Agem 2 e Agem 3, seguindo de uma regulação negativa sobre estes genes. Posteriormente, houve a produção de enzimas insensíveis a esses inibidores de mesma classe e/ou outra classe mecanicista o que permitiu os insetos se adaptarem e continuarem se desenvolvendo na presença de inibidores de proteases produzidos pelas plantas.

A ingestão de SKTI por *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* produziu uma diversidade de novas tripsinas que diferiram em peso molecular, carga e susceptibilidade a inibidores (BROADWAY, 1997). MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY (2001), estudando as mesmas espécies de insetos demonstraram que a ingestão de SKTI causou uma indução transcricional de tripsinas insensíveis no intestino médio destes, diferentemente dos insetos que não se alimentaram do inibidor, que continuaram a expressar tripsinas sensíveis de maneira constitutiva.

Uma espécie específica de inseto, muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (LIU et al., 2004; ZHU-SALZMAN et al. 2008; AHAN et al., 2009, JAMAL 2012). Postula-se que ter várias enzimas digestivas poderia ser uma sobreposição funcional para

assegurar a degradação nutricional de proteínas (AHAN et al., 2009). Muitos insetos exibem uma surpreendente flexibilidade na adaptação a diferentes plantas hospedeiras por alterar as proteases específicas do seu intestino. As alterações podem ser quantitativas, caracterizando-se pelo aumento nos níveis de proteases intestinais para manter a digestão nos níveis ideais, ou qualitativas, que incluem a síntese de isoformas insensíveis às quais o inibidor seria incapaz de se ligar e inibir (BOWN et al., 2004, SRINIVASAN et al., 2006, ZHANG et al., 2010, JAMAL 2012).

Estudos da interação entre enzimas digestivas de insetos e inibidores de proteases sobre o ponto de vista genômico, mostraram que os perfis da expressão de genes das proteases de insetos apresentam diferentes respostas. Uma delas seria que a presença de inibidor de protease leva à redução da expressão das proteases constitutivamente expressas no inseto, ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas, e que são insensíveis aos inibidores. Outros resultados mostram uma hiperprodução de proteases sensíveis ao inibidor no intuito de suprir o efeito deletério dos inibidores de proteases. Por último os inibidores de proteases ativam a expressão de proteases que não são comumente sintetizadas pelo inseto, mas que podem se ligar e degradar o inibidor de protease, deixando as principais proteases digestivas do inseto livres para atuarem na hidrólise de proteases (AHN et al. 2009; CHI et al., 2009; OPPERT et al, 2010, PETEK et al., 2012, JAMAL 2012). Assim, a redundância funcional resultante de múltiplas enzimas digestivas, pode ser uma necessidade para garantir suprimentos aminoácidos. Além disso, a coordenação entre as diferentes classes de proteases também são necessárias para a fragmentação eficaz de proteínas de defesa da planta (ZHU - SALZMAN et al., 2003).

Vários estudos já mostraram que a lagarta da soja produz as serino proteases como uma das suas principais enzimas digestivas (OLIVEIRA et al. 2005, XAVIER et al. 2005; REIS, 2009). Também já foi demonstrado a presença de cisteíno proteases no trato intestinal de *A. gemmatalis* em menor quantidade, mas com igual importância na atuação do processo digestivo do inseto (MENDONÇA et al, 2011, MENDONÇA et al, 2012). Recentes estudos sobre a existência e a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis* foram realizados. Foi verificado que além das proteases produzidas pelas próprias células de *A. gemmatalis*, há também proteases que são sintetizadas por microrganismos presentes no trato intestinal desses insetos e que parecem influenciar o seu desenvolvimento (MENDONÇA et al. 2009, VISÔTTO et al., 2009 a, b).

Assim, no processo adaptativo da lagarta da soja a inibidores de proteases, devem ocorrer um efeito sinérgico dessas enzimas digestivas produzidas pelo próprio inseto e/ou pela microbiota associada ao seu trato digestivo. Do ponto de vista evolutivo, percebe-se que *A. gemmatalis* consegue driblar as barreiras impostas por sua planta hospedeira e por inibidores sintéticos de tripsinas. Provavelmente a estratégia adotada pela lagarta da soja seria a produção de um grande repertório de enzimas digestivas para garantir a produção de proteases insensíveis aos inibidores de proteases, possibilitando assim à adaptação do inseto a planta hospedeira.

Estudos mais aprofundados, sobre os perfis de expressão das diversas proteases presente no trato intestinal do inseto em resposta a presença de inibidores de proteases na dieta alimentar ainda são necessários. Esse tipo de estudo permitirá avaliar quais genes de proteases são expressos ou suprimidos diante da presença do inibidor, e quais levariam a produção de proteases sensíveis e/ou insensíveis aos inibidores, como também a produção de outras proteases que não são comumente sintetizadas pelo inseto, mas que sejam capazes de se ligar e degradar o inibidor de proteases, facilitando a adaptação dos insetos a esses compostos considerados tóxicos ao seu organismo. Esses conhecimentos fornecerão uma valiosa contribuição que pode ser definitiva no sentido de se propor um método de controle eficiente para a lagarta da soja.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AHN, J.E., ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal of Insect Physiology* 55 :678–685. 2009.

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). *Arq. Inst. Biol.*,v.71, p.391-398, 2004.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein inhibitors and their interactions with proteinases. ***Eur. J. Biochem.***,.204: 433-451, 1992.

BOWN,D.P.,WILKINSON,H.S.,GATEHOUSE,J.A., Regulation of expression of genes encoding digestive proteinase sin the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary proteinase inhibitors.*Physiol.Entomol.*29,278–290. 2004.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybean. *J. Agr. Food Chem.*, 37: 1192-1196, 1989.

BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 6635-6642, 2002.

BRIOSCHI, D., NADALINI, L.D., BENGTON, M.H., SOGAYAR , M. C., MOURAA, D. S., SILVA-FILHOA, M. C. General up regulation of Spodoptera frugiperda trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 :1283–1290. 2007

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v.43, p.855-874, 1997.

CHI, Y.H., SALZMAN, R.A., BALFE, S., AHN, J.E., SUN, W., MOON, J., YUN, D.J., LEE, S.Y., HIGGINS, T.J., PITTENDRIGH, B., MURDOCK, L.L., ZHU-SALZMAN, K., Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin—costs and benefits of counter-defence. *Insect Molecular Biology* 18, 97–110. 2009.

CHOUGULE, N.P., GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S. Gene Expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 355–367. 2005.

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

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

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. & GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Research*, 15:13-19, 2006.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*. 156: 145-169, 2002.

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

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

JAMAL, F. ; PANDEY, P.K., SINGH, D.; KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Ver.* Publicação online: 4 maio 2012.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25: 873-887, 1992.

LI, H., OPPERT, B., HIGGINS, R.A., HUANG, F., BUSCHMAN L.L., GAO, J-R., ZHU, K.Y. Characterization of cDNAs encoding three trypsin-like proteinases and Mrna quantitative analysis in Bt-resistant and –susceptible strains of *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 847-860, 2005.

LIU, Y.L., SALZMAN, R.A., PANKIW, T., ZHU-SALZMAN, K., Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1069–1077. 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D.. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method.. *Methods*, 25, 402-8. 2001

MARTINS, G.L.M., TOSCANO, L.C., TOMQUELSKI, G.V., MARUYAMA, W.I.. Inseticidas no controle de *Anticarsi gemmatalis* (Lepidopter: Noctuidae) e impacto sobre aranhas predadoras em soja. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife. 4(2):128-132. 2009

MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate said chain. *J. Biol. Chem.*, 240: 1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *J. Biol. Chem.*, 256: 1661-1668, 1981

MAZUMDAR-LEIGHTON, S., BABU, C.R., BENNETT, J. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insects pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 57-68, 2000.

MAZUNDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.31, p.645-657, 2001.

MENDOÇA, 2012. Enzimas digestivas de *Anticarsia gemmatalis*: influência de inibidores de proteases e caracterização bioquímico-cinética de cisteíno-proteases parcialmente purificadas. UFV. 64p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MENDONÇA, E.G., VISÔTTO, L.E., COSTA, N.C.S., RIBEIRO, F.R., DE OLIVEIRA, J.A., de Almeida Oliveira, M.G. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)[Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)], *Ciencia e Agrotecnologia* Volume 35, Issue 3, May 2011, Pages 446-454, 2011

MENDONCA, E. G.; OLIVEIRA • M. G. A, VISOTTO, L. E., GUEDES, • R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hubner)) *J Pest Sci* 85:117–123, 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.

MILLS, N.J. E KEAN, J.M. .Behavioral studies, molecular approaches, and modeling: Methodological contributions to biological control success. *Biological Control* 52 , 255–262.2010

NIU W, CHEN Z, GANDHI PS, VOGT AD, POZZI N, PELC LA, ZAPATA F, DI CERA E.. Crystallographic and kinetic evidence of allostery in a trypsin-like protease. *Biochemistry* 50:6301–6307. 2011

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.*, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-*like* proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.140B, p.369-380, 2005.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J. A. N.; RIGDEN, D.J.; FRAGOSO, R.R.; SILVA, R.O.; GOMES, E.A; FRANCO, O.L. DIAS, S.O; CORDEIRO, C.M.T.; MONNERAT, G.; GROSSI-DE-SA', M.F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton bollweevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 : 903–918, 2004.

OPPERT, B.; ELPIDINA, N., TOUTGES, M.; MAZUMDAR- LEIGHTON, S. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 5 280–287, 2010.

PAGE, M.J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.65, p.1220-1236, 2008

PETEK, M. ; TURNSEK, N.; GASPARIC, M. B.; NOVAK, M.P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N., POPOVIC, T. , STRUKELJ, B. JONGSMA, M.A. Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. *Archives of insect biochemistry and physiology*, Vol. 79, No. 3, 153–181, 2012.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. . Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23-29, 2006.

PILON, A. M. ; OLIVEIRA, M. G. A. ; PILON, F. M. ; GUEDES, R. N. C. ; OLIVEIRA, J. A. ; FAZOLLO, A. . Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepdoptera:Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. Revista Ceres, v. 56, p. 744-748, 2009.

Rawlings ND, Barrett AJ. 1994. Families of serine peptidases. Methods Enzymol 244:19–61.1994

REIS, D.T.C. purificação e caracterização de proteases digestivas *tripsina-like* do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,106 p,2009

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SAVIO, G. M., PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, 2008.

SRIWICHAI, P. ; RONGSIRYAM, Y., JARIYAPAN, N.;SATTABONGKOT; APIWATHNASORN, C.; NACAPUNCHAI, D., PASKEWITZ, S.Cloning of a trypsin-like serine protease and expression patterns during plasmodium falciparum invasion in the mosquito, *Anopheles dirus* (peyton and harrison) Archives Of Insect Biochemistry and Physiology, Vol. 00, No. 0, 1–15 (2012)

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

SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato J Chem Ecol, 36:490–499, 2010

SHI, M.,HUANG, F., CHEN, Y. MENG, X.,CHEN, X. Characterization of midgut trypsinogen-like cdna and enzymatic activity in plutella xylostella parasitized by cotesia vestalis or diadegma semiclausum. Archives of insect biochemistry and physiology, vol. 70, no. 1, 3–17,2009.

SHIVAJI , R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. J Chem Ecol, 36:179–191, 2010

SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, v.11, p.132-154, 2006.

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

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, v.25, p.4876-4882, 1997.

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Biochemistry, 102: 147-153, 2005

ZHAN, O.; ZHENG, S.; FENG, O.; LIU L. A midgut-specific Chymotrypsin cdna (slctlp1) from *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, localization and expression analysis, ARCHIVES OF INSECT BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, Vol. 76, No. 3, 130–143 ,2011.

ZHANG, C.; ZHOU, D.; ZHENG, S.; LIN, L.; TAO, S.; YANG, L.; HU, S.; FENG, Q. A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, developmental and

induced expression patterns, and localization. *Journal of Insect Physiology* 56:788–799, 2010a.

ZHU-SALZMAN, K., KOIWA, H., SALZMAN, R.A., SHADE, R.E., AHN, J.E., Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12, 135–145. 2003.

ZHU-SALZMAN, K., LUTHE, D.S., FELTON, G.W., Arthropod-inducible proteins, broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology* 146, 852–858, 2008.

Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang H. 2006. Comparative analysis of serine protease related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* 15:603–614.

Archives of

WUNSCHE, H. ; BALDWIN, I.T.; WU, J.S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata* *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 13, pp. 4605–4616, maio., 2011

CAPÍTULO II

Purificação e Caracterização de Serino Proteases Produzidas pela Microbiota Intestinal de *Anticarsia gemmatalis*

RESUMO

A Microbiota intestinal de insetos e o papel desempenhado por estes no contexto ecológico ao qual está inserido vêm ganhando atenção de vários pesquisadores. Muitos desses microrganismos são simbioses e contribuem para o desenvolvimento do inseto, atuando em seus processos metabólicos e colaborando para uma eficiente transformação de macromoléculas a nutrientes essenciais. Um aspecto que vem ganhando destaque é que a microbiota simbiote de insetos, excreta no seu trato intestinal enzimas digestivas, as quais podem atuar auxiliando na sua digestão proteica e também na desintoxicação de compostos de defesa de plantas. Estratégias de controle de insetos-pragas baseadas no uso de inibidores de proteases vêm se mostrando como uma alternativa viável. Entretanto o conhecimento das enzimas digestivas presentes no trato intestinal de insetos tem se mostrado fundamental para o sucesso dessa estratégia. Estudos com a lagarta da soja verificaram a existência e a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia deste inseto. Foram verificadas, que além das proteases produzidas pelas próprias células de *A. gemmatalis*, existem também proteases que são sintetizadas e excretadas por microrganismos presentes no seu trato intestinal e que estas influenciam no desenvolvimento larval do inseto. Neste sentido, este trabalho realizou a purificação das serino-proteases produzidas pelas bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. O processo de purificação das enzimas bacterianas foi realizado em cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina). As massas moleculares estimadas das enzimas foram de aproximadamente 25 kDa (SDS-PAGE). As enzimas apresentaram maior atividade em temperatura a 40°C e em pH 7,5 para *B. cereus*, pH 10,0 para *E.mundtii*, e pH 8,5 para *S.xylosus* e *E.gallinarum*. Os íons cálcio não afetaram a atividade enzimática nas concentrações testadas. Os valores de K_M da serino protease de *E. gallinarum*, *B. cereus*, *S. xylosus* e *E. mundtii* foram de 0,35mM, 0,18 mM, 0,21 mM e 0,22 mM, respectivamente. As enzimas foram sensíveis à inibição por inibidores típicos de serino-proteases e tripsina, como Aprotinina, Berenil e SKTI. Suas atividades não foram alteradas pelos inibidores TPCK de quimiotripsina, Pepistatina A de aspartil-proteases, E-64 de cisteíno-proteases e EDTA de metalo-proteases. Esses resultados demonstram que as bactérias sintetizam e excretam no lúmen intestinal de *A. gemmatalis* enzimas tripsinas-like, com características semelhantes às produzidas pelo próprio inseto. Esses resultados têm implicação no desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle desta praga que objetivam o uso de inibidores de proteases,

atuando via sistema digestivo. O conhecimento das moléculas-alvo dos inibidores, as proteases digestivas tanto do inseto como da sua microbiota associada, permite que inibidores de proteases mais específicos e mais potentes sejam selecionados ou desenvolvidos, tornando essa estratégia de controle mais eficiente na redução da população dos insetos-pragas.

PALAVRAS-CHAVE: microbiota simbiote, digestão de insetos, proteases, lagarta da soja

1. INTRODUÇÃO

O intestino de insetos é habitado por uma grande variedade de microorganismos como resultado da sua exposição contínua ao ambiente externo (STEINHAUS, 1960). Muitos desses microorganismos são simbiotes e estão envolvidos em várias funções fisiológicas e ecológicas, contribuindo para reprodução de insetos, nutrição, produção de feromônio, degradação de pesticidas, desintoxicação de aleloquímicos de plantas e exclusão competitiva (DILLON & DILLON, 2004; DOUGLAS, 2009; LUNDGREN & LEHMAN; 2010; SHIND et al., 2012).

Microorganismos simbiotes contribuem com as complexas vias bioquímicas, ajudando no metabolismo do seu hospedeiro. Essas relações simbióticas ajudam a definir o perfil metabólico do inseto, contribuindo para uma eficiente transformação de macromoléculas a nutrientes essenciais (BRENNAN et al., 2004). Além disso, as bactérias intestinais aumentam a sobrevivência do inseto hospedeiro, melhorando a eficiência da digestão e fornecendo enzimas digestivas ou vitaminas (DILLON & DILLON, 2004; DOUGLAS, 2009; SHIND et al., 2012). Os microorganismos também possuem propriedades metabólicas que estão ausentes nos insetos, auxiliando diretamente no seu desenvolvimento. Esses microorganismos, são denominados de “microorganismos corretores”, pois capacitam insetos fitófagos a superar barreiras bioquímicas como, por exemplo, a adaptação dos insetos a inibidores de proteases produzido pelas plantas como forma de defesa (DOUGLAS, 2009).

A diversidade de microorganismos e o papel da flora bacteriana presente no sistema digestivo de insetos da ordem Lepidoptera, os quais incluem algumas das pragas agrícolas e florestais mais prejudiciais do mundo, estão ganhando atenção. As enzimas digestivas de alguns desses insetos podem ser derivadas da microbiota intestinal, a qual auxilia na digestão proteica do hospedeiro e também na desintoxicação de metabólitos secundários de plantas (TERRA et al, 1996; DOUGLAS, 2009).

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das piores pragas da cultura da soja na América do Norte e do Sul (VIANNA et al., 2011). Apesar do fato de que a soja possui inibidores de protease induzíveis como um mecanismo de defesa contra *A. gemmatalis*, é comprovado que estes insetos conseguem contornar os efeitos deletérios provocados por esses compostos produzidos pelas plantas e também por inibidores sintéticos adicionados a sua dieta através do aumento da

síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de outras classes, na tentativa de bular esse efeito inibitório (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; MOREIRA et al., 2011; MENDONÇA et al, 2011; MENDONÇA et al, 2012).

Mesmo com os mecanismos adaptativos do inseto, o desenvolvimento de potentes inibidores orgânicos, peptídeos ou peptídeos miméticos para serem utilizados na defesa da planta como controle contra pragas agrícolas ou então para produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga é uma estratégia promissora (FERRY et al., 2006; PILON, 2008; ZHANG et al., 2010a; JAMAL et al., 2012). Entretanto, para garantir o sucesso dessa estratégia deve-se conhecer todas as proteases presentes no trato intestinal do inseto, as quais estão envolvidas no seu processo digestivo e adaptativo. Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto e as interações com o ambiente ao qual ele está inserido, levando em consideração a contribuição da microbiota associada ao seu trato digestivo, à bioquímica da sua digestão e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pelo inseto e/ou pela microbiota associada (SRINIVASAN et al., 2006; PILON, 2008; VISÔTTO et al., 2009a, b; DOUGLAS, 2009).

Vários estudos de caracterização bioquímica e cinética das proteases digestivas com *Anticarsia gemmatalis*, foram realizados (OLIVEIRA et al., 2005, XAVIER et al., 2005, REIS, 2009; MENDONÇA et al, 2011; MENDONÇA et al, 2012), efeitos de inibidores de proteases no desenvolvimento larval, na digestibilidade proteica e na atividade enzimática das proteases digestivas presente no trato intestinal do inseto (PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; MOREIRA et al., 2011). Recentes estudos sobre a existência e a contribuição da microbiota intestinal na bioquímica e fisiologia de *A. gemmatalis* foram realizados. Verificou-se que além das proteases produzidas pelas próprias células de *A. gemmatalis*, há também proteases que são sintetizadas por microrganismos presentes no trato intestinal desse inseto e que estas influenciam o seu desenvolvimento (MENDONÇA et al. 2009, VISÔTTO et al., 2009 a, b). PILON (2008) realizou caracterizações bioquímica e cinético enzimáticas das serino e cisteíno proteases presentes nos extratos brutos das proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal da lagarta, onde foi observado que as características das proteases bacterianas se assemelharam com as proteases produzidas pelo próprio inseto. Nesse sentido evidenciou-se que a microbiota de *A. gemmatalis* assume um papel importante no processo de interação planta-inseto. Possivelmente, auxiliando na digestão proteica do inseto e também podem estar atuando na desintoxicação de inibidores de proteases produzidos pelas plantas contra o ataque dos insetos.

Neste contexto o presente trabalho purificou as serino- proteases produzidas pelas bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* com objetivo de caracterizar bioquimicamente e cineticamente essas proteases na forma pura, para posterior esclarecimento do ponto de vista da estrutura/função dessas macromoléculas frente a inibidores de proteases auxiliando. Esses resultados contribuirão para uma melhor compreensão dos centros ativos e os mecanismos de ação proteases na interação multitrófica, planta-inseto-microorganismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições da cultura

As bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus munditti* e *Enterococcus gallinarum*, utilizadas neste estudo foram isoladas do intestino de *Anticarsia gemmatalis* por VISÔTTO et al, (2009b).

Para a produção das proteases foi utilizado o meio de cultura infusão cérebro coração (BHI) acrescido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA) de acordo com PILON, 2008. Inicialmente foi preparado pré-inóculo contendo 25 mL do meio de cultura BHI e inoculados com as bactérias mantidas a -80°C. O pré-inóculo foi mantido em um agitador a 200 rpm e temperatura de 37°C. Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo de cada cultura bacteriana foi retirado a uma densidade ótica a 600nm igual 0,2 e colocado em novos meio de cultura individualmente para realização da curva de crescimento e leitura da atividade enzimática durante o processo. Os inóculos foram incubados em um agitador a 200 rpm mantidos a temperatura de 37°C por 24 horas. Os experimentos foram realizados com três repetições, sendo cada uma delas constituída por 50 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL. Durante o processo em determinados intervalos de tempo de 2 em 2 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL para medida da densidade ótica a 600 nm, medida da quantidade de proteína e dosagem da atividade da enzima nos filtrados das culturas.

2.2. Obtenção dos extratos enzimáticos de bactérias isoladas do trato intestinal de larvas de *A. gemmatalis*

Para obtenção do extrato enzimático, 1 mL do pré-inóculo de cada cultura bacteriana foi retirado a uma densidade ótica a 600nm igual 0,2 e inoculadas individualmente em 200 mL em erlenmeyer de 1L do meio de cultura BHI acrescido de 0,1% de BSA e mantidas a 37°C, a 200 rpm, durante 4 horas para *E. munditti* e *S. xylosum* e 6 horas para *B. cereu* e *E. galinarum*. Os inóculos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes contendo os extratos enzimáticos foram retirados e concentrados por ultrafiltração em um dispositivo Amicon Ultra-15 com membrana porosa de limite molecular de 3 kDa (Millipore®) e conservado a -20°C para uso posterior como fonte de enzima para purificação.

2.3. Determinação de proteína

O teor proteico das amostras analisadas nas diversas etapas da purificação foi determinado pelo método de BRADFORD (1976) utilizando BSA na faixa de concentração de 0-0,2mg/mL como padrão.

2.4 Ensaio enzimáticos

As atividades das serino-proteases foram determinadas utilizando-se o método de ERLANGER et al, (1961). Foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 e o substrato cromogênico L-BApNA 1,2 mM. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (2,5min). Os cálculos foram realizados considerando o coeficiente de extinção molar específico de $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o produto. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.5. Purificação enzimática

2.5.1. Precipitação por sulfato de amônio

Os sobrenadantes dos extratos enzimáticos como descritos no item 2.2 foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 0-70% de saturação. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração e agitação. A quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir esta faixa de saturação foi calculada com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação segundo SCOPES (1994). Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para a etapa de precipitação, a suspensão formada foi mantida por 1 hora sob agitação e, após, mais 1 hora em repouso sob refrigeração. Após este tempo, os extratos foram centrifugados a 12000 rpm por 60 minutos a 4°C recolhendo-se em seguida os precipitados. Os precipitados foram solubilizados em 10mM de tris-HCl pH 7,5 e dialisados overnight contra o mesmo tampão a 4°C, utilizando-se membranas com poros de limite molecular de 3 kDa. Após este período foi realizada uma centrifugação de 33000 rpm por 60 minutos a 4°C, para remoção de impurezas. Os sobrenadantes foram retirados e armazenado a -20°.

2.4.2. Cromatografia de afinidade

O sobrenadantes obtidos como descritos no item 2.5.1 foram submetidos à cromatografia de afinidade, em uma coluna de p-aminobenzamidina agarose (2,5 mL)

(Sigma®) equilibrada com tampão Tris -HCl 0,05M, pH 7,5, NaCl 0,5M. A eluição das proteínas foi realizada com tampão glicina 0,05M, pH 3,0, com fluxo contínuo de 1 mL/min e coletadas em frações de 1,5mL. As frações eluídas foram monitoradas pela determinação da Abs₂₈₀ e a determinação da atividade tripsina-*like* utilizando L-BAPNA como substrato. As frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas e conservadas a -20°C para uso posterior nos ensaios de caracterização enzimática.

2.5 Eletroforese

2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Após cada etapa de purificação a eletroforese foi realizada com as amostras utilizando-se o método descrito por LAEMMLI (1970) com gel de poliacrilamida 12,0% na presença de SDS (0,1%). O experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 1h e 20min, à temperatura ambiente. A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por BLUM et al., (1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados em 100 mL de solução, contendo metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12: 38 em volume, por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 min cada, com solução de etanol 50 %. A seguir, os géis foram lavados por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Posteriormente, os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados por 15 min em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 µL de formaldeído 37 % (v/v). Após serem lavados por 3 vezes de 20 segundos com água destilada, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 µL de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

2.7. Caracterização enzimática

2.7.1 Efeito do pH

Os perfis de pH foram determinados utilizando-se os seguintes sistemas-tampão (Tabela 1), na concentração de 0,1 M:

Tabela1: Sistemas-tampão utilizado na avaliação da atividade de proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*

<i>Tampão</i>	<i>Faixa tamponante</i>
Ácido cítrico/Fosfato dissódico	3,0 – 6,5
Tris- Hidrocloro	7,0 – 8,5
Glicina / Hidróxido de sódio	9,5 – 10,5
Fosfato dissódico / Hidróxido de sódio	11,0

A atividade da enzima foi determinada misturando-se 50 µL do extrato enzimático, 250 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM e 250 µL de tampão correspondente ao pH desejado. A atividade enzimática foi realizada de acordo com o item 2.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado a 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C utilizando-se um espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada para que as soluções alcançassem as respectivas temperaturas, através do acoplamento deste com um banho maria. As soluções (tampão, amostra, substrato) foram pré-incubadas por 5 minutos em cada temperatura em banho-maria. A reação foi iniciada pela adição do substrato e a atividade determinada como descrito no item 2.5, já com o tampão de melhor atividade determinado no item 2.7.1 para cada enzima bacteriana. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7.3 Efeito da concentração de íons cálcio

As proteases bacterianas foram analisadas em relação ao efeito da concentração de íons cálcio em suas atividades utilizando-se o substrato L-BApNA, como descrito no item 2.5, em concentrações de CaCl₂ variando de 5 a 30 mM, utilizando as temperaturas e os tampões de melhor atividade, obtidas nos itens 2.7.1 e 2.7.2 respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7.4 Determinação da K_M e V_{max}

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} foram realizadas nos tampões e nas temperaturas de melhores atividades obtidas nos itens 2.7.1 e 2.7.2 respectivamente, utilizando o substrato L-BApNA na faixa de concentração variando de 0,05 a 2,0 mM. A atividade enzimática foi realizada de acordo com o item 2.5. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear, empregando-se o programa de computação Sigma Plot.

2.7.5. Avaliação do efeito de inibidores

No estudo do efeito de modificadores químicos sobre a atividade dos extratos proteicos bacterianos foi utilizado L-BApNA na concentração final de 0,5 mM em temperaturas e tampões de melhor atividade obtidos nos itens 2.7.1 e 2.7.2 na presença de: EDTA (0 – 100 mM) - inibidor de metalo proteases e de proteases ativadas por metais por ser quelante de Ca^{+2} e outros metais divalentes, Pepstatina A (0,005 - 10 μ M) – inibidor de aspartil-protease, E-64 (1 - 100 μ M) – inibidor irreversível de cisteíno-protease, Aprotinina (0,5 - 4,0 μ M) – inibidor de serino proteases, com exceção de trombina e Fator X_a , TPCK (10 a 100 μ M)-um inibidor irreversível de serino- proteases tipo quimiotripsina, Berenil (10- 40 μ M)- -inibidor sintético parcialmente competitivo parabólico da tripsina, também avaliado o efeito do inibidor proteico da soja, SKTI (0,1 - 1 μ M).

Os extratos passaram por um período de pré-incubação de cinco minutos com cada inibidor. Posteriormente, foram adicionados o substrato L-BApNA, e as atividades amidásica foram analisadas como descrito no item 2.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfis do crescimento bacteriano e da atividade das proteases produzidas pelas bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.

O perfil do crescimento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum*, isolados do trato intestinal de *A. gemmatalis* e da atividade das proteases produzidas por esses microrganismos em função do tempo foram observados (Figura 1). De acordo com a Figura 1, observamos que o crescimento foi iniciado imediatamente após a incubação das bactérias com o meio de cultura. O mesmo foi observado para as secreções das proteases produzidas por todas as bactérias. O crescimento exponencial dos microrganismos foi observado por um período de tempo relativamente curto, em torno de 4 horas para *B. cereus* e *E. mundtii*, e 6 horas para *E. galinarum* e *S. Xylosus*. A partir destes tempos, a velocidade do crescimento foi reduzida e as culturas entraram na fase estacionária.

A produção enzimática foi crescente na fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. A atividade máxima das proteases foi alcançada após 4 horas de incubação *E. munditti* e *S. xylosus* e após 6 horas para *B. cereus* e *E. galinarum*, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante a fase estacionária quando as culturas já haviam alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade das proteases foi reduzida, o que sugere que a produção da enzima está associada ao crescimento e que foi produzida quando as culturas estavam metabolicamente ativas.

De acordo com esses resultados foram então utilizados os tempos de máxima atividade das proteases bacterinas, 4 horas para *E. munditti* e *S. xylosus* e 6 horas para *B. cereu* e *E. galinarum*, para a obtenção dos extratos enzimáticos que foram no utilizados no processo de purificação.

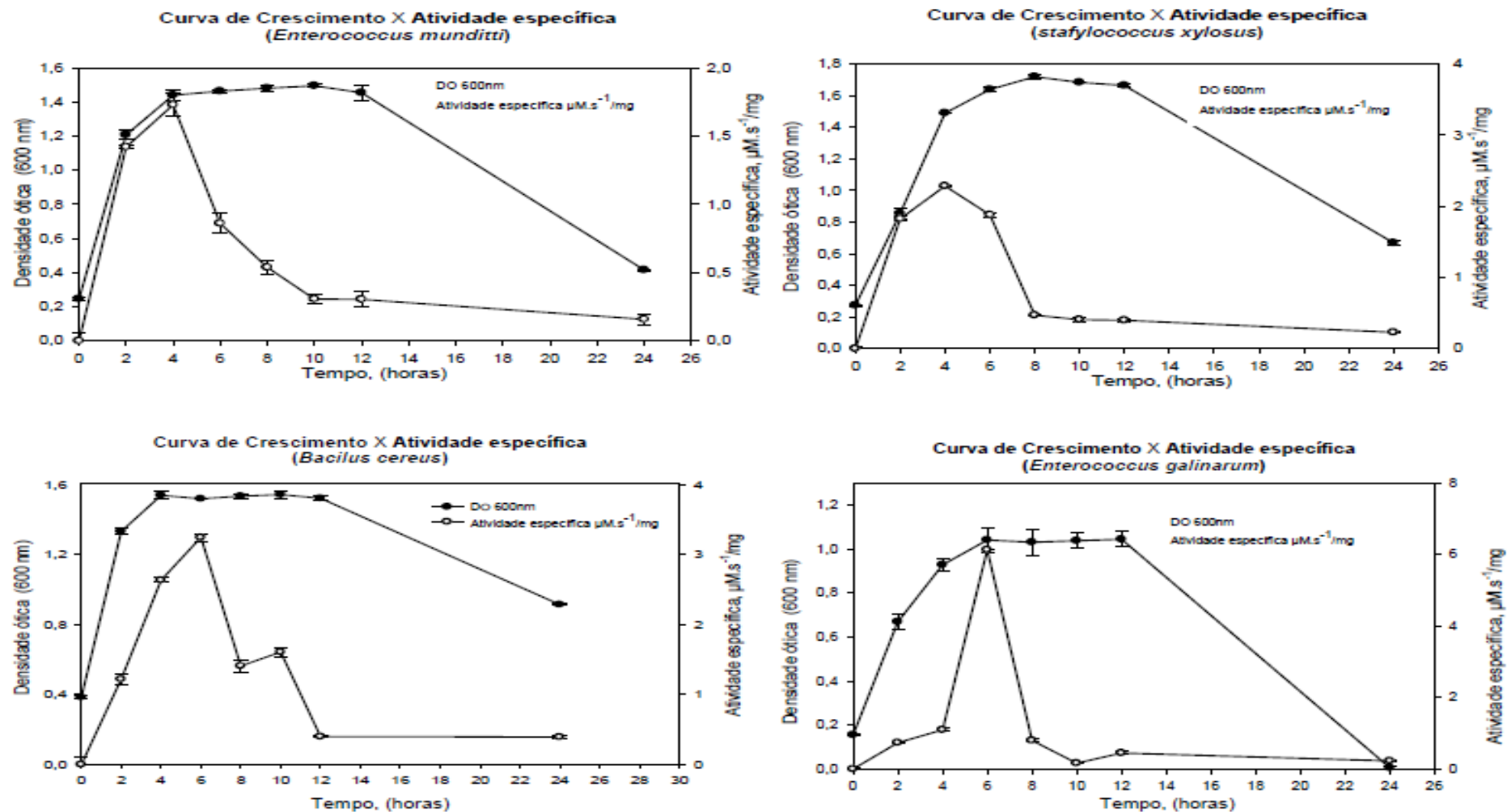


Figura 1: Crescimento e atividade das proteases secretada por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, incubadas a 37°C em meio de cultura líquido infusão cérebro coração (BHI) enriquecido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA).

3.2 Purificações das serino-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*

As serino-proteases de *B. cereus*, *E. mundtii*, *S. xylosus* e *E. gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* foram obtidas a partir dos extratos enzimáticos concentrados após cromatografia de afinidade em coluna p-aminobenzamidina agarose (SIGMA®). As frações eluídas foram monitoradas pela determinação da Abs₂₈₀ e determinação da atividade amidásica utilizando L-BApNA. O perfil cromatográfico para cada uma das bactérias foi obtido como apresentado na Figura 2.

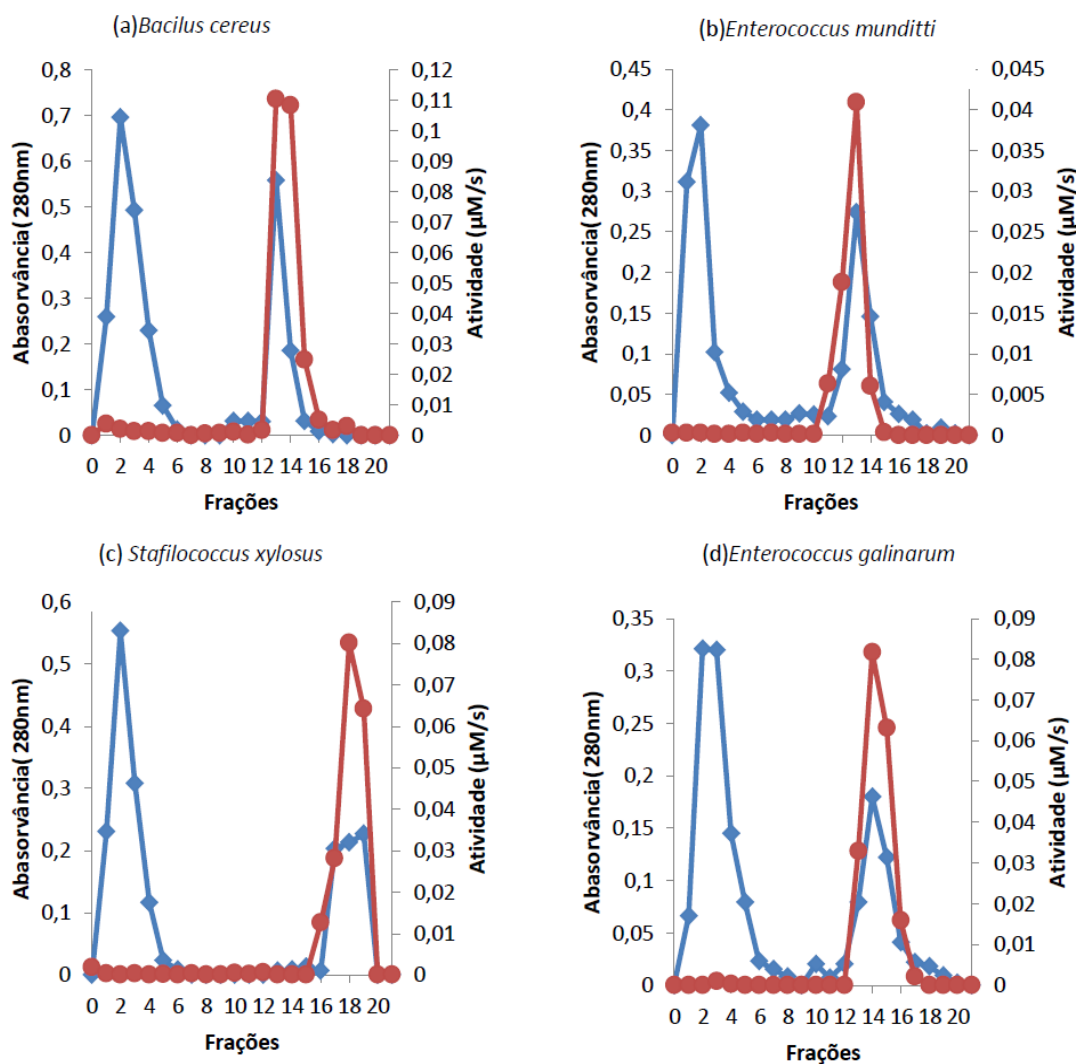


Figura 2: Perfil cromatográfico de serino proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* em p-aminobenzamidina, equilibrada com tampão Tris- HCl pH 8,5 0,1M e eluídas com tampão glicina 0,1M pH 3,0. ◆ Absorvância (280nm) ● Atividade amidásica (µM/s).

A coluna escolhida possui um ligante a benzamidina, um potente inibidor competitivo de tripsina-*like* que ocupa o subsítio S1 da enzima, ou seja, o sítio de especificidade (MARES-GUIA et al., 1981). Quando presente no meio de reação em baixas concentrações posiciona-se no sítio de especificidade, da tripsina onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interação eletrostática entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico presente na porção do fundo do bolso do sítio S1. (MARES-GUIA & SHAW, 1965, MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al. 1993).

Para todas as proteases bacterianas foram observados a eluição de um pico proteico após lavagem exaustiva com tampão de equilíbrio. Este primeiro pico correspondente às proteínas que não possuem afinidade pela p-aminobenzamidina e não possuem a capacidade de hidrolisar eficientemente o substrato L-BApNA.

Foi observado também um segundo pico proteico menor durante a passagem do tampão de eluição, glicina, correspondente à eluição de proteínas com capacidade de se ligar a p-aminobenzamidina e com capacidade proteolítica significativa frente ao substrato L-BApNA. Esses dados são compatíveis com o esperado, considerando que as serino-proteases são capazes de hidrolisar o substrato L-BApNA. Este substrato mimetiza a ligação peptídica, enquanto que a p-aminobenzamidina mimetiza este substrato, ocupando o sítio S₁ de tripsina-*like*. A coluna de p-aminobenzamidina agarose é específica para a purificação ou remoção de tripsinas, desse modo é possível sugerir que as serino-proteases bacterianas purificadas devem se tratar de enzimas pertencentes ao grupo das tripsina-*like*.

As amostras eluídas que apresentaram atividade relativamente alta foram reunidas e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

Os rendimentos das purificações foram iguais a 73,73% para *Bacillus cereus*, 68,92% para *Enterococcus galinarum*, 65,19% para *Enterococcus munditti* e 67,49% para *Staphylococcus xylois*. A purificação realizada para as serino proteases produzidas pelo *B.cereus* apresentou maior fator de purificação devido à maior recuperação da enzima no final do processo em relação às outras enzimas bacterianas, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Etapas de purificação das serino-proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*

Etapas de purificação	Bactéria	Proteína total (mg)	Atividade total^a ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	Atividade específica^a ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto		2,03	0,16	0,08	1,00	100,00
Precipitação (Sulfato de amônio)	<i>Bacillus cereus</i>	0,16	0,14	0,87	10,87	87,50
Afinidade (p-aminobenzamidina agarose)		0,01	0,10	12,52	155,65	71,43
Extrato bruto		2,16	0,16	0,07	1,00	100,00
Precipitação (Sulfato de amônio)	<i>Enterococcus munditti</i>	0,22	0,15	0,69	9,50	93,75
Afinidade (p-aminobenzamidina agarose)		0,01	0,10	10,20	140,36	66,67
Extrato bruto		1,99	0,16	0,08	1,00	100,00
Precipitação (Sulfato de amônio)	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,21	0,14	0,69	8,57	87,50
Afinidade (p-aminobenzamidina agarose)		0,01	0,10	12,26	152,63	71,43
Extrato bruto		2,30	0,17	0,07	1,00	100,00
Precipitação (Sulfato de amônio)	<i>Enterococcus galinarum</i>	0,22	0,14	0,61	8,47	82,35
Afinidade (p-aminobenzamidina agarose)		0,01	0,09	10,37	143,62	64,29

^a Substrato usado: L-BApNA

Amostras do *pool* das enzimas purificadas e dos extratos brutos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O perfil da migração das proteínas está representado na Figura 3. A cromatografia em coluna de afinidade se mostrou eficiente na separação das serino-proteases dos extratos brutos bacterianos, apresentando apenas uma banda nas canaletas referentes às amostras purificadas. É visualizado nas colunas 3, 5, 7 e 9 bandas com aproximadamente 25 kDa quando comparado com o marcador molecular utilizado. Essa massa é semelhante com a massa de tripsinas solúveis e insolúveis purificadas do trato intestinal *A. gemmatalis*, que foi de 24,9 kDa (REIS, 2009). Esse resultado já era esperado tendo em vista que as bactérias estudadas provavelmente produzem e secretam essas proteases no trato intestinal do inseto hospedeiro auxiliando na sua digestão.

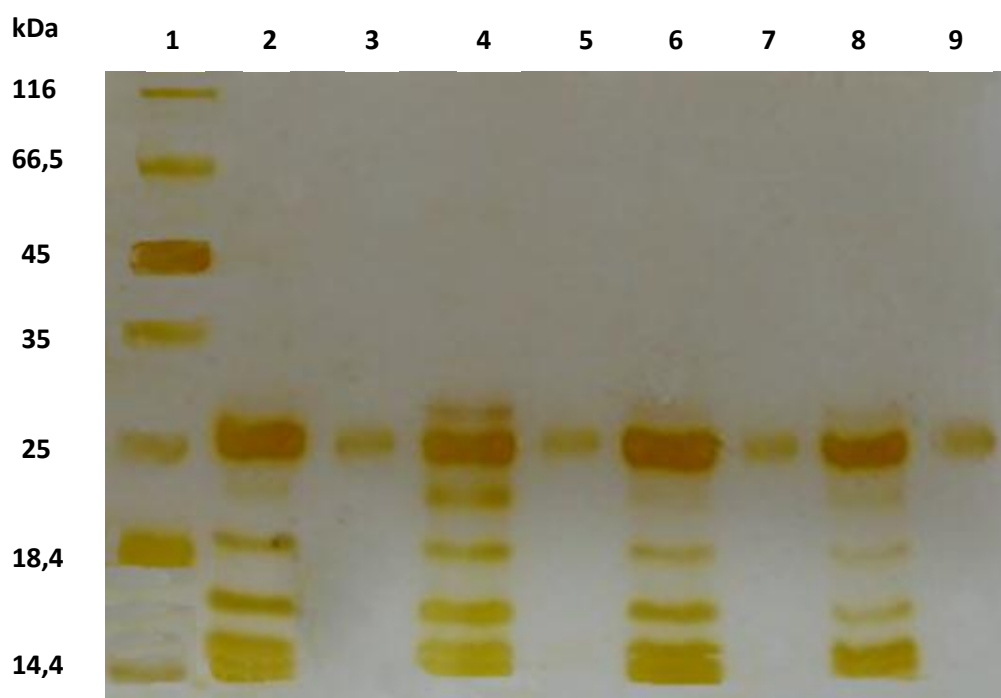


Figura 3: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12 %) das serino proteases produzidas pela microbiota isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. 1- marcadores de massa molecular(Fermentas®) ; 2-extrato bruto de *B. cereus*; 3- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *B. cereus*; 4-. extrato bruto de *E. munditti* 5- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *E. munditti* 6- extrato bruto de *E. gallinarum* 7- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *E. gallinarum*; 8- extrato bruto de *S. xylosum*; 9- fração enzimática pós cromatografia de afinidade (p-aminobenzamidina agarose) de serino proteases de *S. xylosum*. .

3.3. Caracterização Enzimática

3.3.1 Efeito do pH

Os perfis de melhor atividade de serino proteases dos extratos enzimáticos bacterianos da microbiota de *A. gemmatalis* frente o substrato L-BApNa apresentaram valores variados, sendo de pH 7,0 para *B. cereus*, pH 9,5 para *E.munditti*, e pH 8,5 para *S.xylosus* e *E.galinarum* (Figura 4). De acordo com RAO et al. (1998), as serino-proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Portanto os valores aqui encontrados para serino proteases bacterianas com picos de atividade entre pH 7,5 e pH 10,0, encontram-se na faixa descrita pela literatura para serino-proteases.

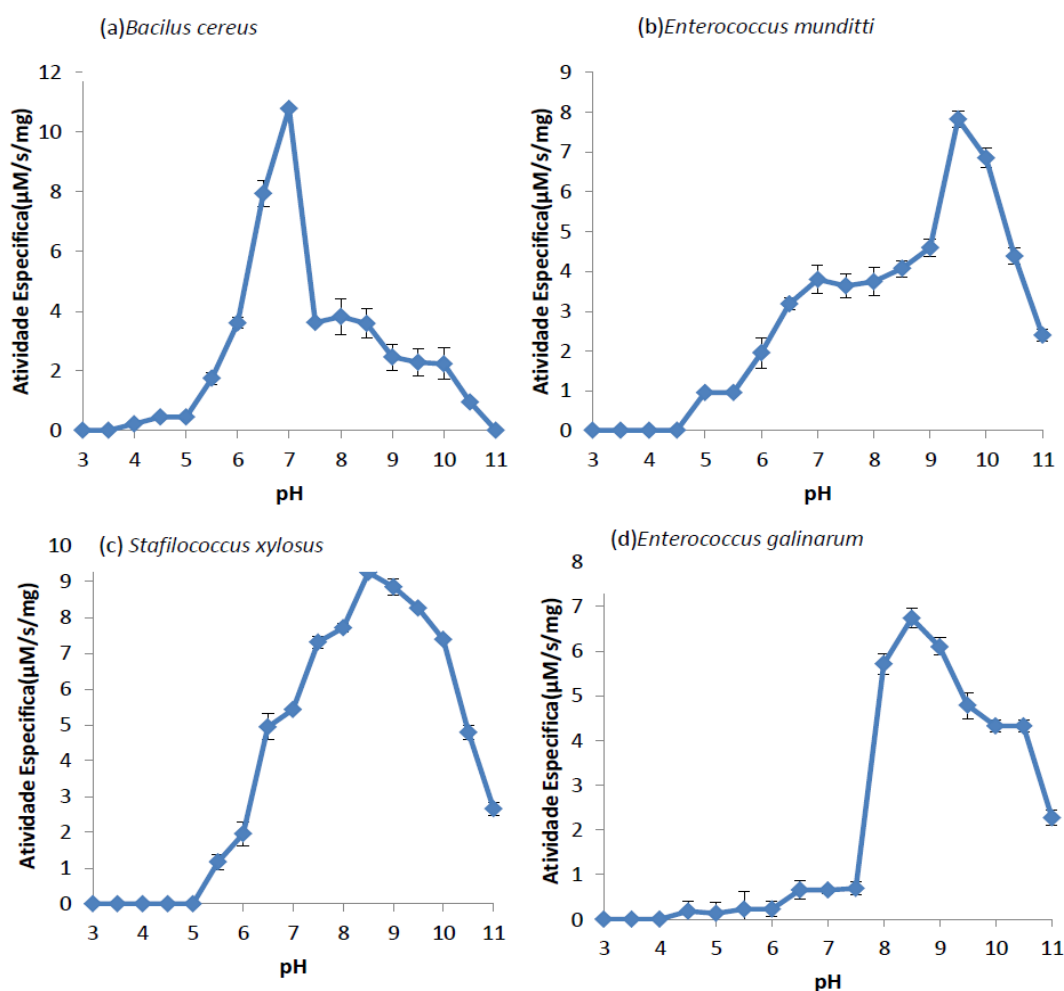


Figura 4: Efeito do pH sobre a atividade de serino proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

PILON (2008) verificou a presença de dois picos de melhor atividade para as serino-proteases do extrato bruto produzido pela microbiota de *A. gemmatalis*, o que

não foi verificado nos ensaios para amostras purificadas no presente estudo. Para as nossas amostras foi observada uma faixa de atividade amidásica onde a enzima pode manter 25% da sua atividade, em torno do pico de melhor atividade (Figura 4). Esta diferença de ação se deve provavelmente a presença de isoformas da enzima no extrato bruto e que são eliminadas no processo de purificação.

Os valores de pH e melhor atividade de tripsinas-*like* obtidas do trato intestinal de *A. gemmatalis* frente o substrato L-BApNA, foram de pH 8,5 para as enzimas parcialmente purificadas (OLIVEIRA, et. al. 2005) e pH 9,0 para as totalmente purificadas (REIS, 2009). Esses valores sugerem que as proteases utilizadas na digestão proteica deste inseto precisam de um ambiente alcalino para atuar de forma otimizada. Assim a presença de uma flora bacteriana produtora de proteases com elevada atividade em pH alcalino deve ser de extrema importância para digestão proteolítica do inseto hospedeiro. Em especial se as proteases produzidas pelas células pelo inseto estiverem inibidas.

3.3.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura das enzimas bacterianas isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA, apresentaram melhor atividade a 40°C, para todas as proteases bacterianas, e mantiveram uma atividade relativamente alta entre as faixas de temperatura 25 – 40°C (Figura 5). Valores acima desta faixa provocaram diminuição da atividade enzimática, possivelmente causada pela desnaturação da estrutura proteica (NELSON & COX, 2007).

Como verificado para os valores de pH, PILON (2008) também verificou a presença de dois picos de melhor atividade para as serino proteases do extrato bruto produzido pela microbiota de *A. gemmatalis* em relação à temperatura, o que não foi verificado no presente estudo para as proteases purificadas. Novamente este fato deve ter ocorrido pela eliminação de diferentes formas da enzima através do processo de purificação. Verifica-se assim que a caracterização da enzima na forma pura é de extrema importância para o entendimento da relação estrutura/função dessas macromoléculas, auxiliando na compreensão dos centros ativos para o desenvolvimento de inibidores de proteases.

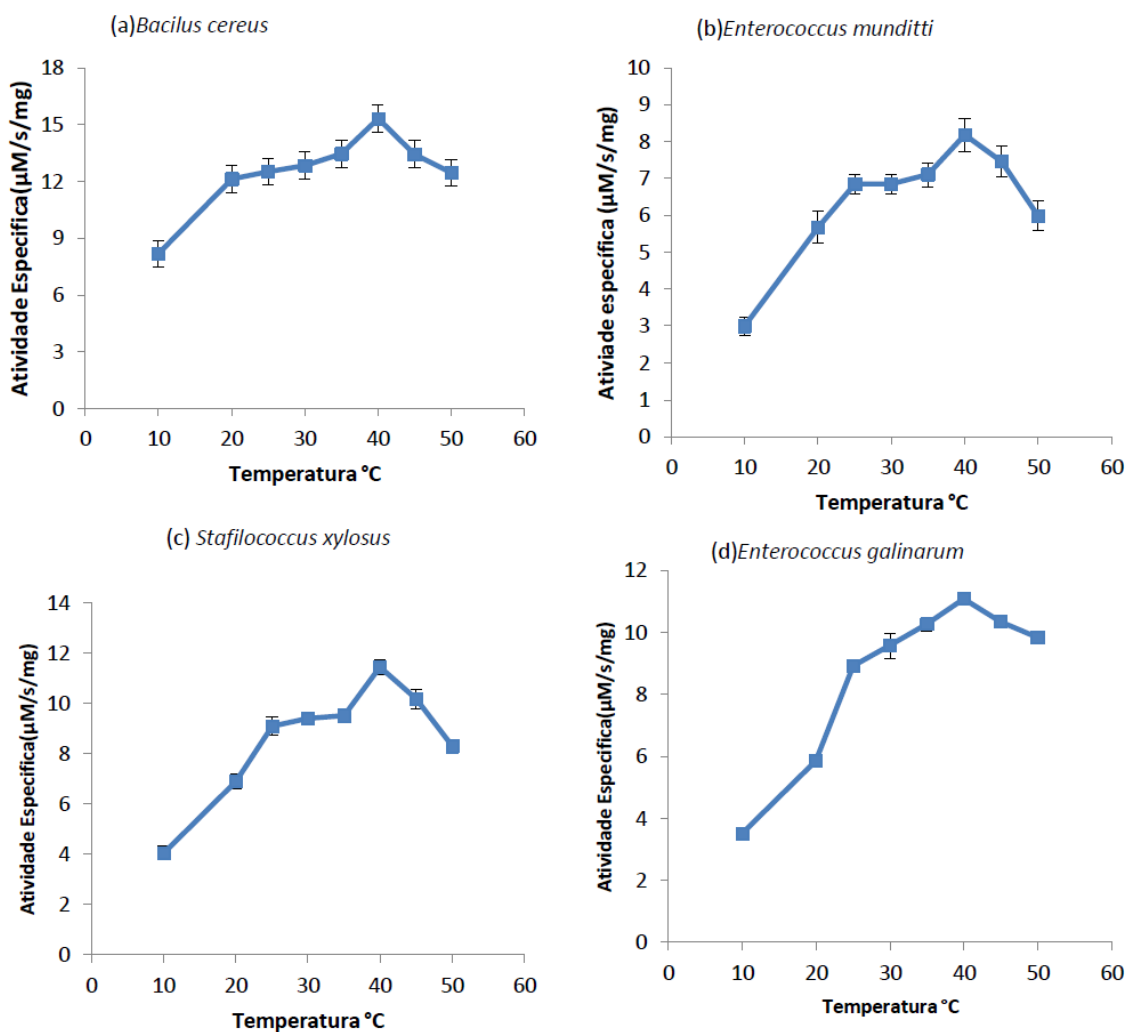


Figura 5: Efeito da temperatura sobre a atividade de serino proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Cada ponto representa a média de três determinações. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

OLIVEIRA et al. (2005) trabalhando com amostras de serino proteases parcialmente purificadas, de *Anticarsia gemmatalis*, observaram temperatura ótima frente o substrato L-BApNA de 35°C. O mesmo foi relatado por REIS (2009) para as serino proteases purificadas do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Esses resultados são semelhantes aos observados no presente trabalho, constatando-se assim a semelhança cinética entre as serino proteases da lagarta da soja e sua microbiota associada, mais uma vez observamos uma correlação intrínseca entre a interação inseto-microorganismo.

3.3.3 Efeito de íons cálcio

As serino proteases bacterianas foram analisadas em relação ao efeito da concentração de íons cálcio variando de 5 a 30 mM de CaCl₂. As atividades das tripsinas produzidas por de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* não foram

afetadas pela presença de íons cálcio nas concentrações testadas como apresentado na Figura 6. De acordo com RAO et al. (1998), algumas proteases bacterianas não necessitam de íons bivalentes para atuar eficientemente.

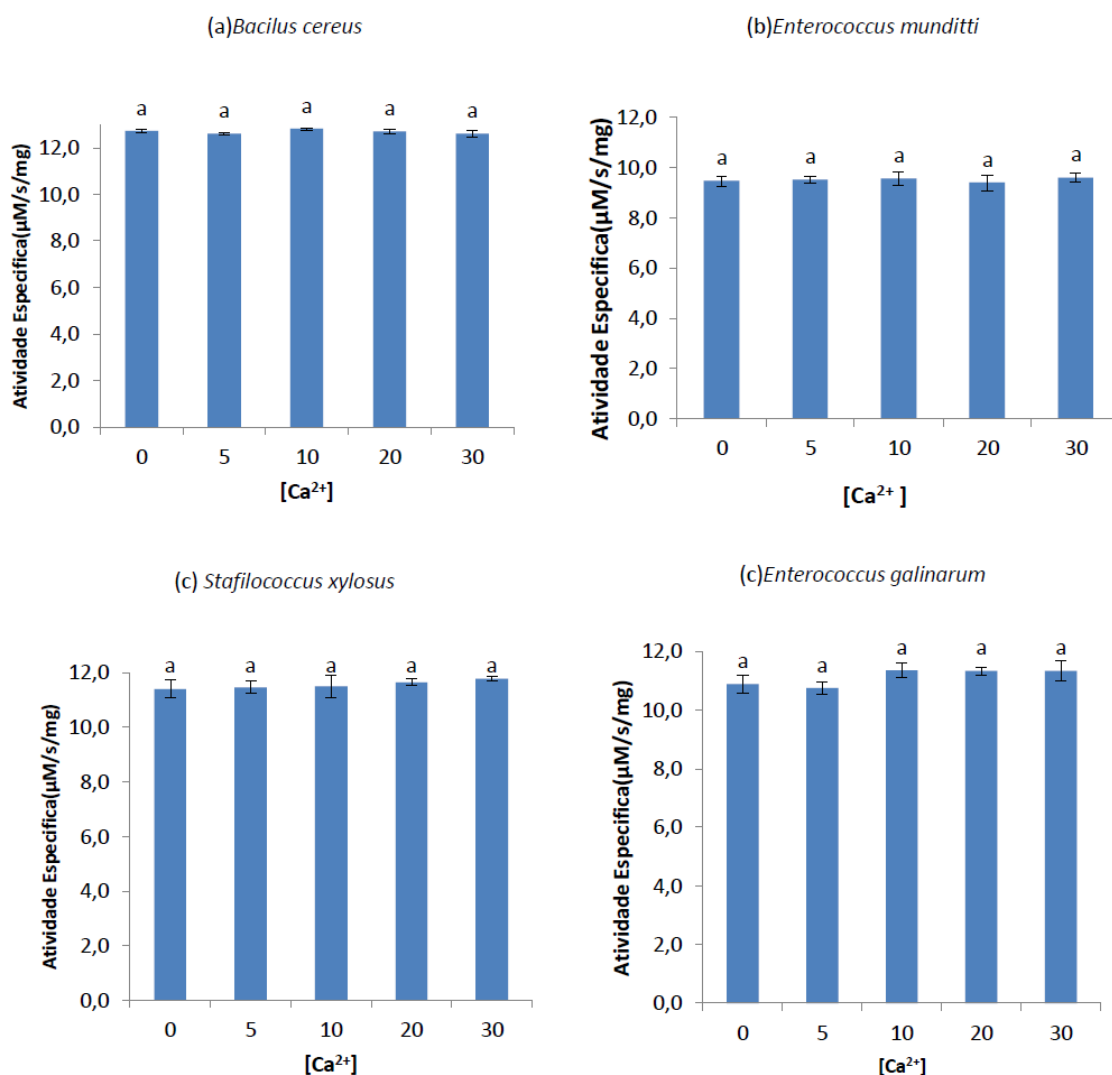


Figura 6: Efeito de íons cálcio sobre a atividade serino proteases produzidas pela microbiota isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos pela mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com o que foi apresentado por REIS (2009), no qual os íons cálcio não exerceram efeito sobre a atividade de serino proteases purificadas a partir do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Segundo o autor, o efeito de íons cálcio na atividade e estabilidade de tripsinas de inseto ainda não é conclusivo. Por outro lado, a importância dos íons cálcio foi relatada na atividade de serino proteases solúveis parcialmente purificadas e proteases insolúveis de *A.*

gemmatalis, como também nas serino proteases do extrato bruto excretado pela sua microbiota associada (OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005; PILON, 2008).

Esses resultados sugerem que devem ocorrer à presença de isoformas das enzimas produzidas pelos insetos e por sua microbiota associada, que requerem íons cálcio para a sua estabilização e outras isoformas que não necessitam do cálcio como cofatores de atividade. Esses cofatores provavelmente levam à mudança na conformação das moléculas de enzimas e melhoram o posicionando do centro ativo, acarretando aumento da atividade. Assim ocorrendo à purificação dessas proteases, o meio reacional ficaria livre de isoformas que necessitam de cofatores como íons cálcio para ocorra o aumento da atividade enzimática.

3.3.4 Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max})

A equação do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten apresenta dois parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} essenciais na caracterização de uma determinada enzima. Quando toda concentração de enzima, no meio de reação, está sob a forma de complexo [ES], então a cinética Michaeliana fornece o parâmetro V_{max} . Portanto, V_{max} não é uma constante cinética, uma vez que depende da concentração de enzima pura e da própria constante catalítica da enzima (k_{cat}). Entretanto, é um parâmetro cinético importante, uma vez que a concentração de substrato na metade da V_{max} fornece a constante cinética K_M . O K_M é uma constante cinética que relaciona a velocidade enzimática com a concentração de substrato. Estabelece, portanto, um valor aproximado para o nível intracelular de substrato, ou seja, a concentração fisiológica de substrato. A constante de Michaelis indica também uma “adequacidade” do substrato ao centro ativo da enzima. Portanto, quanto menor o valor de K_M maior adaptação do substrato ao centro ativo da enzima (OLIVEIRA et al., 1993).

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pelas serino proteases produzidas pela microbiota intestinal de *A. gemmatalis* foi determinado utilizando-se o substrato sintético L-BApNA. Todas as serino proteases dos extratos bacterianos analisados apresentaram gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que essas enzimas seguem a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de L-BApNA avaliada. Os gráficos com as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* estão apresentados na Figura 7. Nessa figura, encontra-se ainda inseridos os gráficos de Lineweaver-Burk de cada enzima bacteriana.

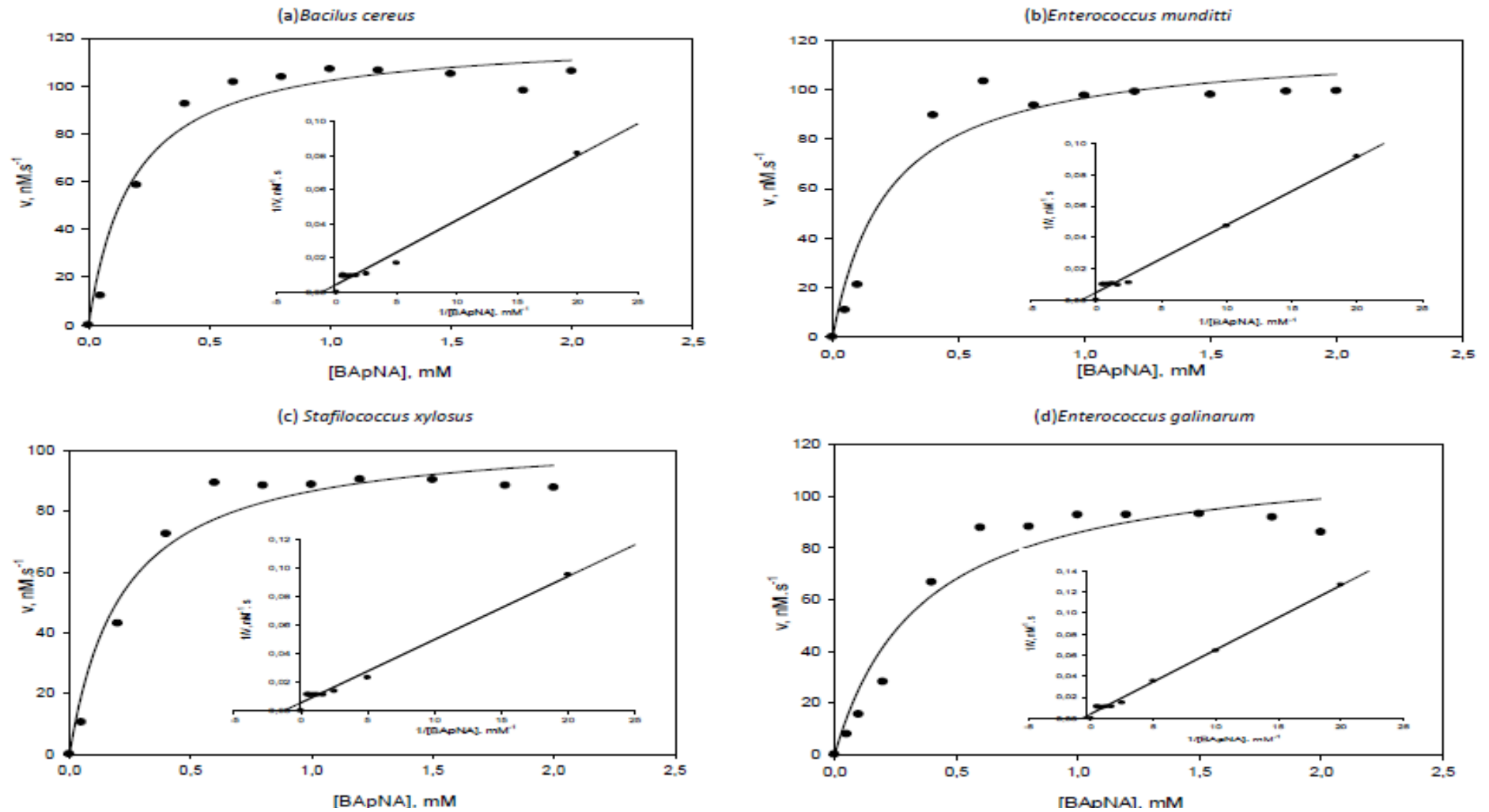


Figura 7: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade serino proteases das bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade da amostra purificada sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais. A linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de K_M e V_{\max} .

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de K_M e V_{max} obtidos das serino proteases excretadas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* e das serino proteases produzidas pelo próprio inseto, ambas purificadas e utilizando o substrato L-BApNA para determinação dos parâmetros cinéticos .

Os valores de K_M da serino protease de *E. gallinarum*, *B. cereus*, *S. xylosus* e *E. mundtii* foram de 0,35mM, 0,18 mM, 0,21 mM e 0,22 mM, respectivamente. Ainda observando a Tabela 3 é possível verificar que as serino proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatalis* assemelham-se, na mesma ordem de grandeza, com os valores descritos por Reis (2009) para as serino proteases tripsina-like purificadas de *A. gemmatalis* ($K_M=0,12$ mM para L- BApNA). Esses resultados mostram uma adaptação semelhante de L- BApNA pelo centro ativo das serino proteases produzidas pela microbiota de *A. gemmatalis* e pelo próprio inseto.

Tabela3: Parâmetros cinéticos das serino proteases excretadas por bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* e das serino proteases produzidas pelo próprio inseto

Espécie	Substrato	K_M	V_{max}	Referências
<i>Bacillus cereus</i>	L-BApNA	0,18mM	120,72 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Staphylococcus xylosus</i>	L-BApNA	0,21 mM	105,43 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Enterococcus mundtii</i>	L-BApNA	0,22 mM	117,89 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Enterococcus gallinarum</i>	L-BApNA	0,35 mM	116,79 nM.s ⁻¹	Presente trabalho
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	L-BApNA	0,12 mM	540,00 nM.s ⁻¹	REIS, 2009

O K_M é uma constante cinética característica para uma determinada enzima, seu valor numérico fornece um meio de comparação entre enzimas de diferentes organismos ou de diferentes estágios de desenvolvimento.

Nesse sentido, os valores de K_M em conjunto com os fatores pH e temperatura e o efeito de íons cálcio relatados anteriormente, mostram-se semelhantes entre as proteases da microbiota de *A. gemmatalis* e as produzidas pelo próprio inseto. Assim um mecanismo de controle da lagarta da soja utilizando-se inibidores de serino proteases poderá ocorrer com um único tipo de inibidor, desde que potente para as diferentes formas de enzimas presentes no processo digestivo deste inseto, ou seja, das produzidas pela microbiota de *A. gemmatlis* e as produzias pelo próprio inseto, uma vez

que parâmetros cinéticos são semelhantes para as diferentes formas de proteases presentes no meio.

3.3.5 Avaliação do efeito de inibidores na atividade de serino proteases bacterinas

3.3.5.1 Efeito de Aprotinina

A Aprotinina é um peptídeo inibidor natural de serino competitivo protease, sendo obtido de órgãos internos de bovinos, como pâncreas, pulmão e glândulas parótidas, apresentando massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa, capaz de inibir as ações da tripsina (LASKOWISKI E KATO, 1980).

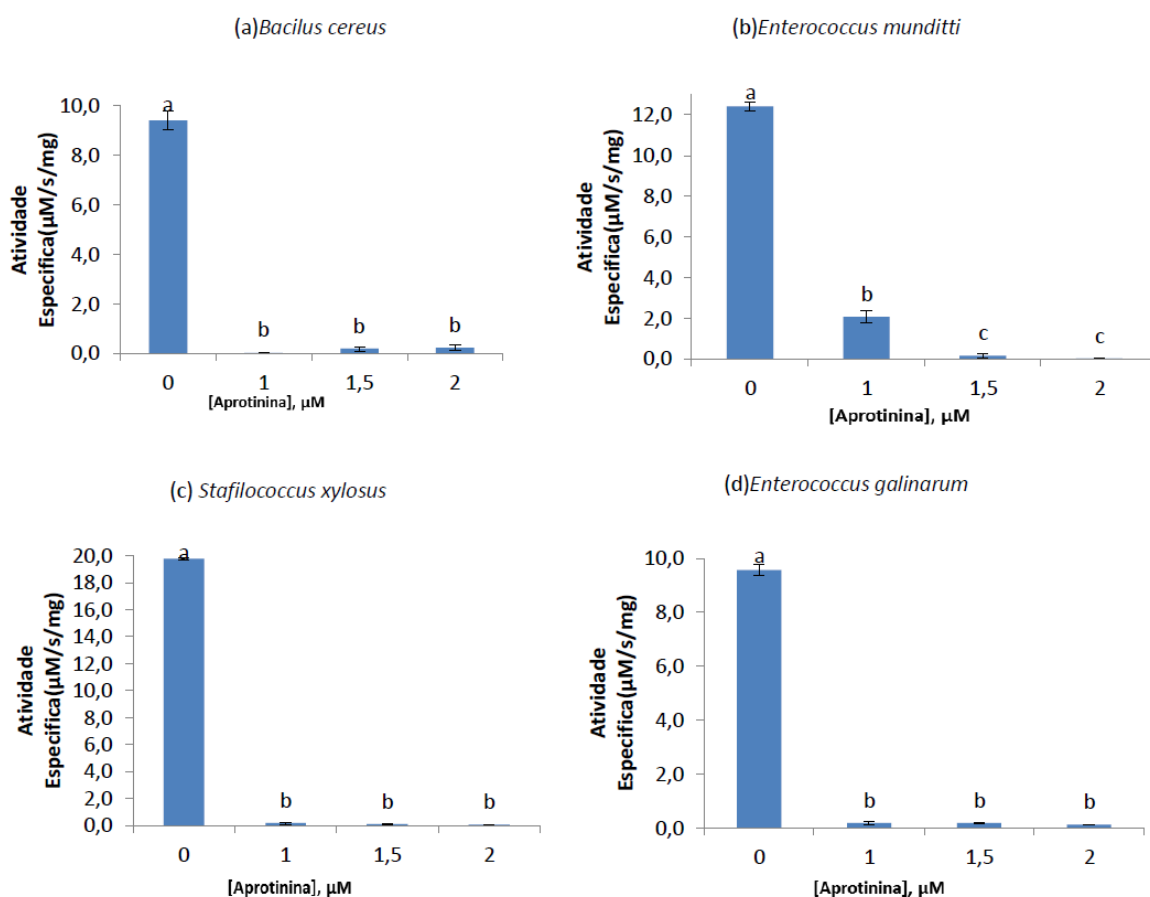


Figura 8: Efeito de Aprotinina sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O efeito de Aprotinina frente às enzimas purificadas de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* associada ao trato intestinal de *A. gemmatilis*, causou uma

queda significativa ($p < 0,05$) em função do aumento da concentração de Aprotinina para todas as serino proteases bacterianas (Figura 8). Verificou-se que a concentração igual a 1 μM o inibidor Aprotinina foi capaz de agir eficientemente sobre mais de 50% da atividade proteásica e a 1,5 μM , o inibidor foi capaz de agir com quase 100% de eficácia sobre a atividade de todas as serino proteases produzidas pela microbiota isolada do trato intestinal de *A. gemmatalis*. Resultados semelhantes foram relatadas para serino proteases classificadas como tripsinas-like de *A. gemmatalis* frente o inibidor Aprotinina (OLIVEIRA, et. al. 2005; XAVIER et. al., 2005; REIS, 2009).

Esses resultados sugerem que as serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* devem tratar de enzimas tripsina-like uma vez que em presença de um inibidor competitivo proteico de serino-protease, capaz de inibir tripsinas, ocorreu queda na atividade amidásica de tais proteases.

3.3.5.2 Efeito de Berenil

O berenil é um inibidor sintético parcialmente competitivo parabólico da tripsina apresentando K_i de 1,79 μM (JUNQUEIRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1993). O efeito de Berenil à frente às enzimas purificadas de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* associada ao trato intestinal de *A. gemmatalis*, foi capaz de inibir 50% da atividade enzimática quando a concentração do inibidor atingiu 20 μM , de todas as serino proteases bacterianas (Figura 9).

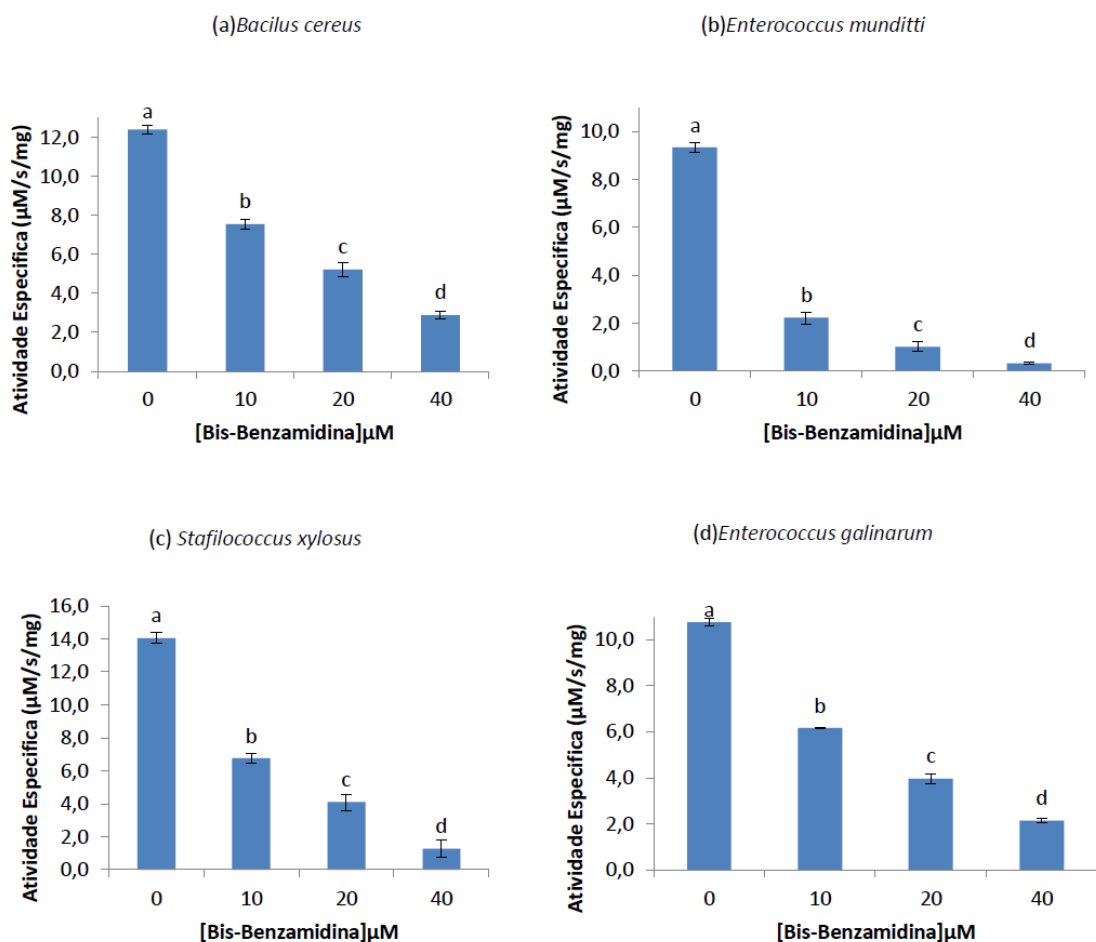


Figura 9: Efeito de Berenil sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo MOREIRA et al. (2011) a adição de Berenil à dieta de *A. gemmatalis* afetou significativamente todos os parâmetros relacionados ao consumo, utilização do alimento e características fenotípicas do inseto.

Estes dados corroboram novamente a hipótese de que as enzimas purificadas produzidas pela microbiota intestinal de *A. gemmatalis* são do tipo tripsinas-like, a qual se assemelha a tripsina produzida pelo próprio inseto.

3.3.5.3 Efeito de TPCK

O TPCK é o inibidor irreversível de serino protease do tipo quimotripsina. A porção fenilalanina que existe na estrutura do TPCK é ligada fortemente ao resíduo de His₅₇ da triade catalítica da quimotripsina, devido a sua grande especificidade para resíduos de aminoácidos aromáticos no centro ativo desta enzima (FARREL & CAMPBELL, 2006).

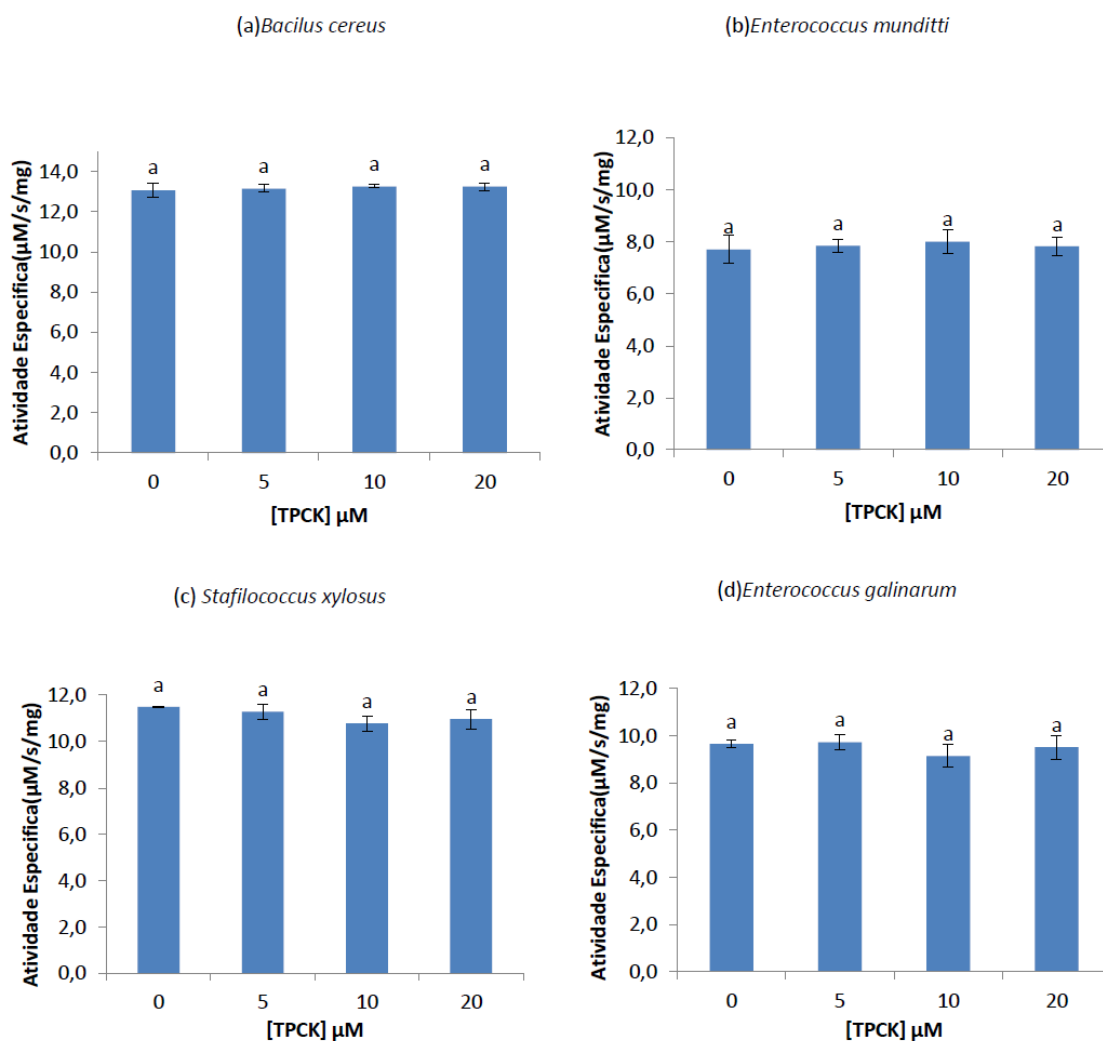


Figura 10: Efeito de TPCK sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatilis*, sobre o substrato L-BAPNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com a Figura 10, o efeito de TPCK, sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosois*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* não apresentou eficácia sobre as concentrações do inibidor analisadas. Nesse sentido conseguimos reforçar a ideia de que as serino proteases bacterianas de *A. gemmatilis* podem ser classificadas como tripsina-like, uma vez que elas não foram afetadas pelo inibidor de quimitripsina TLCK. Reis (2009) encontraram resultados semelhantes aos verificados no presente estudo para as serino proteases de *A. gemmatilis* o que os levaram inferir que essas enzimas seriam classificadas como tripsinas-like.

Essas semelhanças reforçam a proposição de que deve ocorrer uma interação benéfica da microbiota simbiote de *A. gemmatilis* sobre a digestão proteica do seu inseto hospedeiro.

3.3.5.4 Efeito de SKTI

O inibidor proteico de protease de planta, SKTI (inibidor de tripsina da soja, tipo Kunitz (SONG & SUN, 1998)) também foi testado sobre as enzimas bacterianas. Foi verificado que o SKTI inibiu as enzimas bacterianas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis* de forma efetiva (Figura 11). Reis (2009) verificou que o SKTI foi capaz de inibir 80% a ação de serino proteases purificadas e produzidas pelo trato intestinal de *A. gemmatalis*.

A manipulação da expressão endógena de inibidores nas plantas de soja objetivando defesa anti-herbívora pode ser alcançada. Entretanto, ensaios *in vivo*, realizados através da incorporação destes inibidores na dieta devem ser previamente realizados. Tem sido demonstrado que *in vivo* o efeito destes inibidores não corresponde às expectativas quando comparado aos efeitos *in vitro* devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos insetos (BROADWAY, 1995; JONGSMA et al., 1995; BOWN et al., 1997). Desta forma, para que um inibidor de protease seja selecionado ou projetado de maneira apropriada, objetivando a proteção sustentável de culturas, o conhecimento da diversidade das proteases presentes no trato intestinal do inseto-alvo e de como o perfil da expressão dessas enzimas varia em resposta a presença do inibidor na dieta são ainda necessários (TELANG et al., 2005; DIÁZ-MENDONZA et al., 2005).

Assim, é sugestivo que estudos genômicos e/ou proteômicos sobre a interação de microorganismos-insetos sejam realizados concomitantemente com a suplementação de inibidores de proteases na dieta do inseto, a fim de verificar como funciona a expressão das proteases excretadas pelo microorganismos simbiotes frente a esses compostos que são considerados tóxicos ao inseto-hospedeiro.

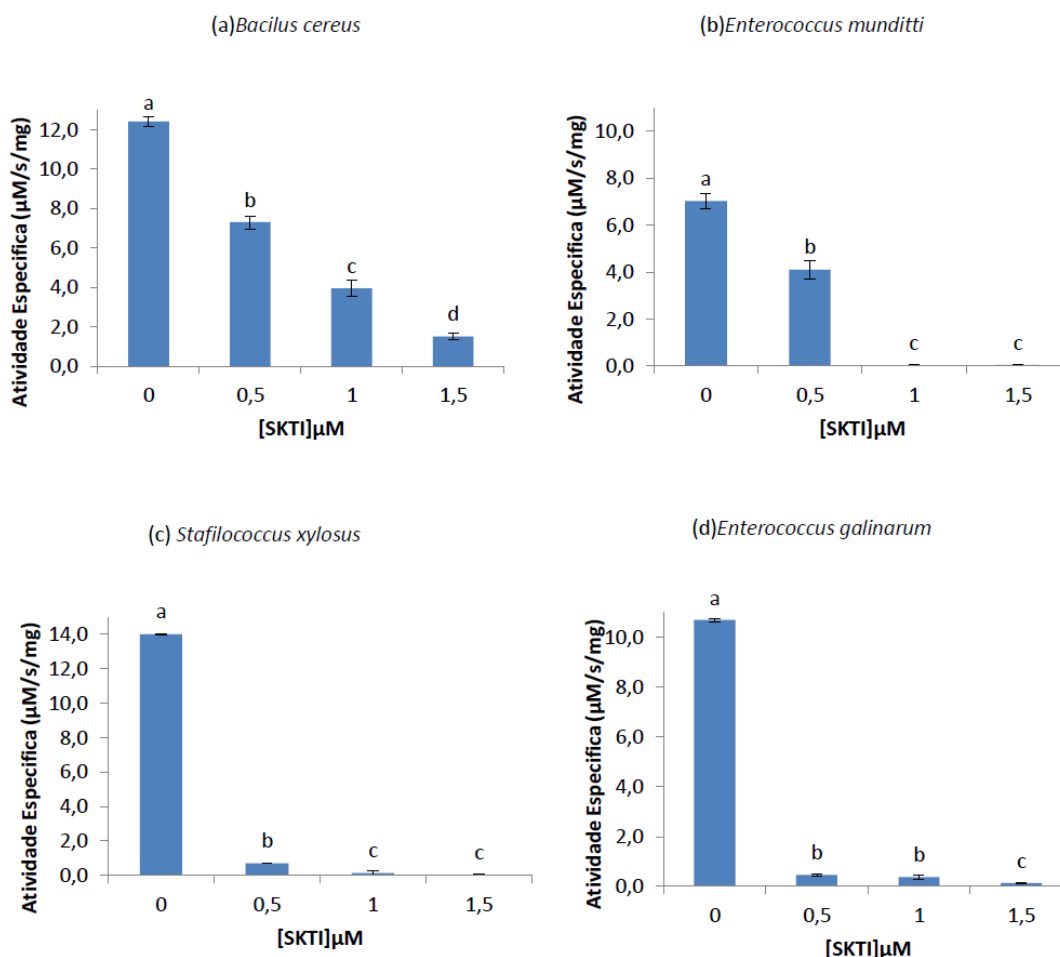


Figura 11: Efeito de SKTI sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BAPNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3.5.5 Efeito de Pepstatina A

A Pepstatina A inibe aspartil-proteases já caracterizadas, tais como pepsina, quimosina, catepsina D e renina. É um pentapeptídeo secretado por espécies de *Streptomyces* que contém dois resíduos de estatina [(3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid] que se caracteriza por ser um aminoácido raro (SALVESEN & NAGASE, 2001).

O efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases bacterianas frente o L-BAPNA não diferiram ($p > 0,05$) nas concentrações analisadas sobre as atividades amidásicas (Figura 12). O mesmo foi observado por FEDATTO et al. (2006), estudando *Xylella fastidiosa*. Portanto, os resultados obtidos não demonstram presença de aspartil proteases nos extratos enzimáticos da microbiota de *A. gemmatilis*.

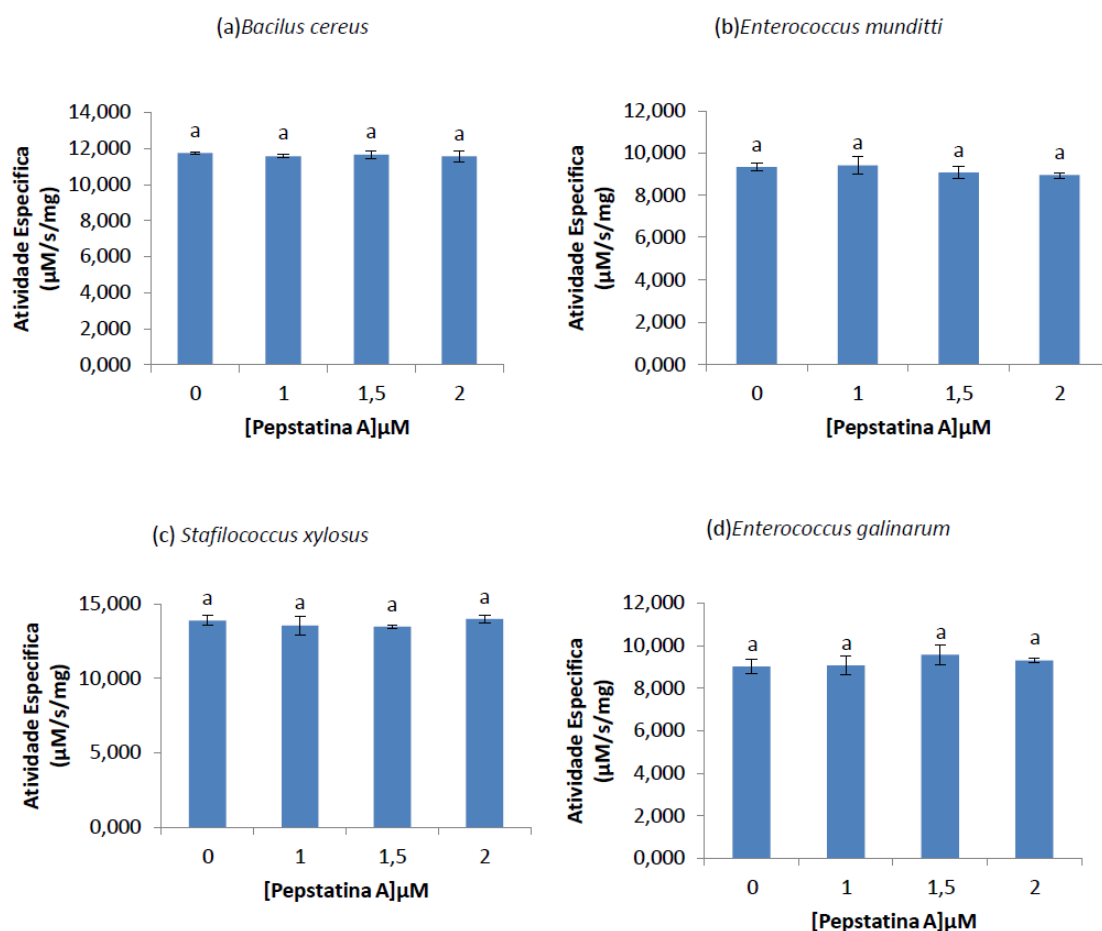


Figura 12: Efeito de Pepstatina A sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3.5.6 Efeito de E-64

Os peptídeos epóxidos são um grupo de inibidores irreversíveis baseados no composto E-64 isolado por HANADA et al. (1978) de um extrato de *Aspergillus japonicus*. Este inibidor causa uma inibição irreversível em cisteíno proteases pertencente às famílias papaína e calpaínas (HANADA et al., 1978; HASHIDA et al., 1980; BARRETT et al., 1982; PARKES et al., 1985) A inibição de proteases da família da papaína por E-64 resulta da ocupação de subsítios da enzima seguido por alquilação da cisteína da tríade catalítica pelo grupo trans epóxido (SALVESEN & NAGASE, 2001).

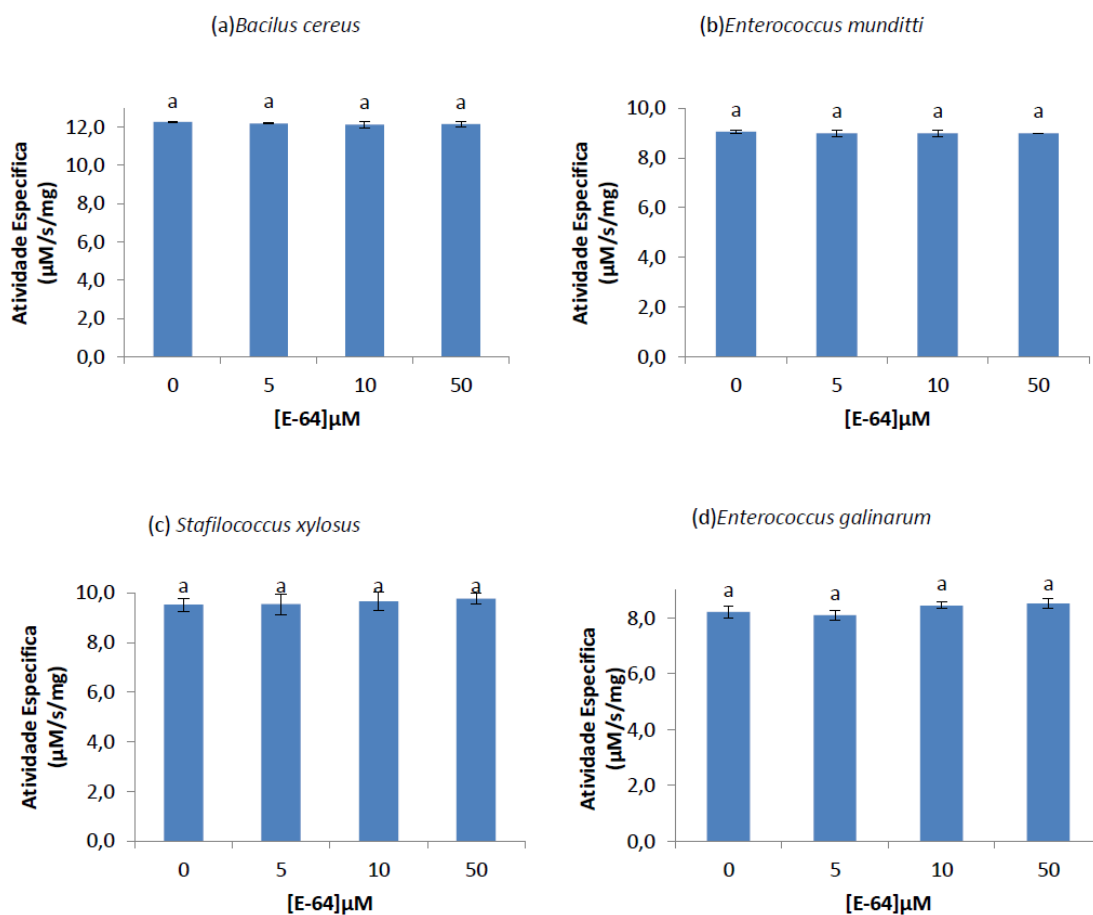


Figura 13: Efeito de E-64 sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O efeito de E-64 sobre a atividade sobre a atividade de serino proteases de *B. cereus*, *S. xylosus*, *E. mundtii* e *E. gallinarum* frente o L-BApNA não diferiram ($p > 0,05$) nas concentrações analisadas sobre as atividades amidásicas (Figura 13). E-64 também não afetou a atividade de serino proteases de *Bacillus mojavensis* obtendo um valor de 100% de atividade quando adicionado 1 mM desse inibidor (BEG et al., 2003). ZIBAE et al. (2011) verificou que as tripsinas-like *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae) também não foram afetadas pelo inibido E-64. Portanto, os resultados obtidos não demonstram presença de cisteíno proteases nos extratos enzimáticos da microbiota de *A. gemmatlis*.

3.3.5.7 Efeito de EDTA

A Figura 14 apresenta o efeito da concentração de EDTA, inibidor de metalo proteases e de proteases ativadas por metais por ser quelante de Ca^{+2} e outros metais

divalentes, na atividade das proteases bacterinas purificadas, sobre o L-BApNA. É possível observar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) nas concentrações analisadas sobre as atividades amidásicas. PEREIRA et al.(2010) verificou que as serino protease Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) (Lepidoptera: Noctuidae) também não foram afetadas pelo inibidor EDTA. Portanto, nossos resultados não demonstram presença de metalo proteases nos extratos enzimáticos de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.

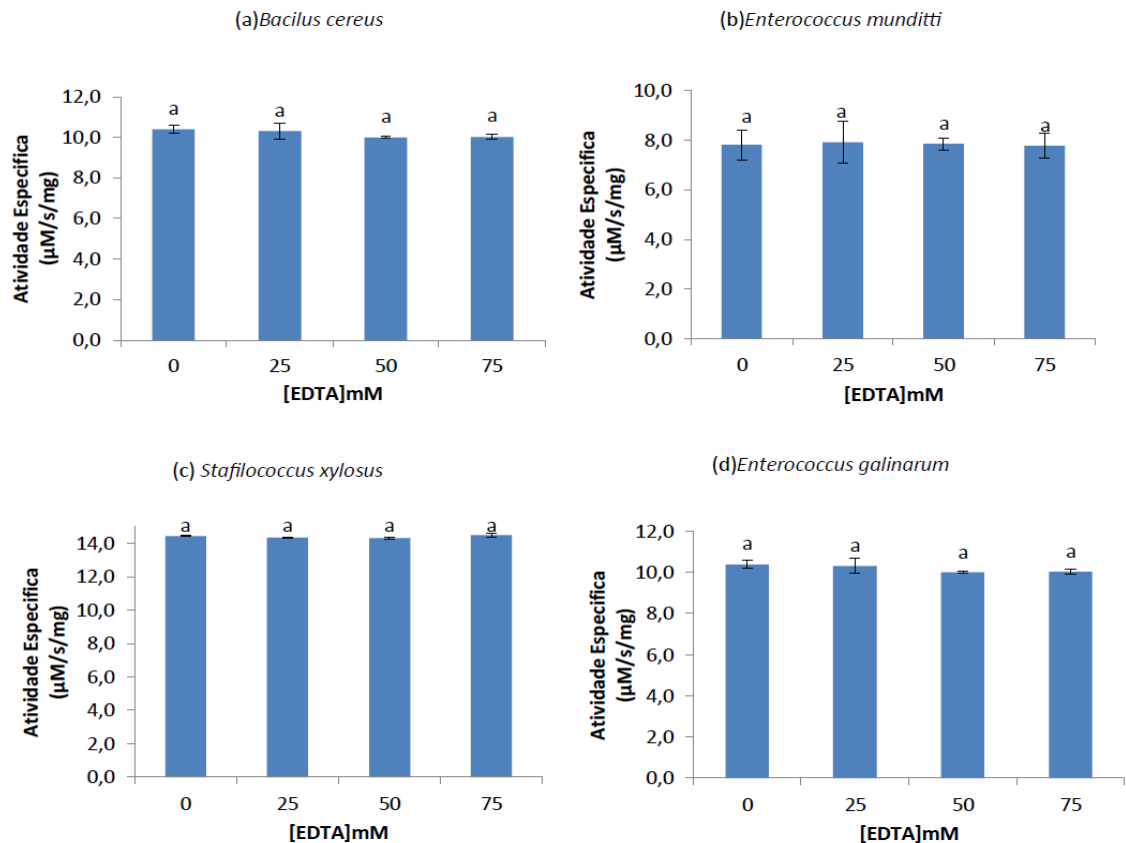


Figura14: Efeito de EDTA sobre a atividade de serino proteases de bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*, sobre o substrato L-BApNA. Valores seguidos de mesma letra nas barras não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O conjunto de resultado desse trabalho mostra que bactérias isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*, sintetizam e excretam enzimas com atividade de tripsina-*like* as quais apresentam características bioquímicas e cinético-enzimáticas semelhantes às produzidas pelo próprio inseto hospedeiro. Essas semelhanças provavelmente são benéficas para a lagarta da soja, uma vez que sua microbiota associada parece fornecer enzimas que podem atuar em um ambiente favorável para suas atividades, o intestino do inseto, auxiliando sua digestão proteica e atuando na adaptação dos insetos aos

inibidores da protease de plantas hospedeiras. Possivelmente durante uma ingestão crônica de inibidores de proteases por *A. gemmatalis*, após bloqueio das proteases produzidas pelo próprio inseto, os microorganismos passem a produzir proteases com a mesma eficiência catalítica, contribuindo assim como um mecanismo de defesa para o inseto.

Assim, com as enzimas de *A. gemmatalis* e da sua microbiota associada, purificadas e caracterizadas o próximo passo será iniciar testes com tripeptídeos sintéticos e inibidores naturais de origem vegetal. Essas informações em conjunto serão de extrema importância, pois além de revelarem a diversidade estrutural dessas proteases, elas fornecerão a base para estudos de moléculas que serão efetivas na inibição dessas proteases. Estas moléculas conhecidas poderão então ser utilizadas para a produção de potentes inibidores orgânicos, peptídeos ou peptídeos miméticos para serem utilizados na defesa da planta, como controle contra pragas agrícolas, ou então para a produção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos praga.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

BEG Q. K.; GUPTA R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enz. and Microb. Tech.* v. 32, p. 294 – 304, 2003.

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

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p. 93-99, 1987.

BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v.43, p.855-874, 1997.

DIÁZ-MENDONZA, M.; ORTEGO, F.; LACOBBA, M.G.; MAGAÑA, C.; de la POZA, M.; FARINÓS, G.P.; CASTÑERA, P.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagroides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochem. Molec. Biol*, v.35, p.1005-1020, 2005.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* v. 49, p. 71-92, 2004.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* , 23 , 38–47-2009

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. of Biochem. and Bioph.* v. 95, p. 271-278, 1961.

FARRELL, SHAWN O.; CAMPBELL, MARY K. (2006). *Biochemistry*. Australia: Thomson Brooks/Cole. p. 160

FEDATTO, L. M.; STENICO, M. E. S. ;ETCHEGARAY, A; PACHECO, F. T. H.; RODRIGUES, J. L. M.; TSAI, S. M. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research* 161:263-272,2006.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.& GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Research*, 15:13-19, 2006.

HIRAZAWA, N., UMEDA, N., HATANAKA, A., KURODA, A. Characterization of serine proteases in the monogenean *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture* 255 :188–195, 2006.

JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 43: 885-895, 1997.

JAOUADI, B., ELLOUZ-CHAABOUNI, S., RHIMI, M., BEJAR, S. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie xx* : 1-15, 2008.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25: 873-887, 1992.

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

LASKOWSKI, J. M.; KATO, I. Protein inhibitor of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* v. 49, p. 593-626, 1980.

LUNDGREN, J.G.; LEHMAN, R.M. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle PLoS ONE, 5 (5) p. e10831, 2010.

MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrateside chain. The Journal of Biological Chemistry, v.240, p.1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. J. Biol. Chem., 256: 1661-1668, 1981.

MENDONÇA, E.G., VISÔTTO, L.E., COSTA, N.C.S., RIBEIRO, F.R., DE OLIVEIRA, J.A., de Almeida Oliveira, M.G. Enzymatic characterization of cysteine protease isoforms of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)[Caracterização enzimática de isoformas de cisteína protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)], *Ciencia e Agrotecnologia* Volume 35, Issue 3, May 2011, Pages 446-454, 2011

MENDONCA, E. G.; OLIVEIRA • M. G. A, VISOTTO, L. E., GUEDES, • R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hubner)) *J Pest Sci* 85:117–123, 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.

NELSON, D.L. AND COX, M.M. (2007) *Lehninger Principles of Biochemistry* (Worth, New York, ed. 4, 2007).

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.*, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.140B, p.369-380, 2005.

PEREIRA, D.A.; RAMOSA, M. V., SOUZA, D. P.; PORTELA, T.C.L., GUIMARÃES, J.A.MADEIRAA, CLEVERSON, S.V.F., FREITAS, D.T. Digestibility of defense proteins in latex of milk weeds by digestive protease of Monarch butterflies, *Danaus plexippus* L.: A potential determinant of plant-herbivore interactions. *Plant Science*, V179, Issue 4, p. 348-355, outubro, 2010.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. . Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23-29, 2006.

PILON, A. M. ; OLIVEIRA, M. G. A. ; PILON, F. M. ; GUEDES, R. N. C. ; OLIVEIRA, J. A. ; FAZOLLO, A. . Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepdoptera:Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Revista Ceres*, v. 56, p. 744-748, 2009.

PILON, F.M. ; Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 115 p, 2008.

RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 597-635, 1998.

SALVESEN, G.S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. & BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes*. Oxford: Oxford University Press, cap 5, p. 105-130, 2001.

SCOPES, R.K. Protein purification: principles and practice. 3. Ed. New York: Springer-Verlag, 1994

SHINDE, A.A.; SHAIKH, F.K.; PADUL, M.V. ;KACHOLE, M.S. Bacillus subtilis RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin-like proteases. Saudi Journal of Biological Sciences xxx, xxx-xxx, 2012

SONG, H.K.; SUH, S.W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from Erythrina caffra and tissue-type plasminogen activator. J. Mol.Biol., v. 275, p.347-363, 1998

SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, v.11, p.132-154, 2006.

TELANG, M.A.; GIRI, A.P.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S. Characterization of two midgut proteinases of Helicoverpa armigera and their interaction with proteinase inhibitors. Journal of Insect Physiology, v.51, p.513-522, 2005.

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

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

VISÔTTO, L. E., OLIVEIRA , M.G.A. , GUEDES, R.N.C., RIBON , A.O.B. GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Journal of Insect Physiology 55 : 185–191, 2009a.

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

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Biochemistry, 102: 147-153, 2005.

ZIBAE, A., BANDANI, A.R., FAZELI-DINAN, M.; ZIBAE, I. SENDI, J.J., MALEKI, F.A.A Trypsin-Like Protease In Rice Green Semi-Looper, *Naranga Aenescens Moore* (Lepidoptera: Noctuidae): Purification And Characterization Arch Insect Biochem Physiol. Jun 15, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

- Foram isolados três genes diferentes de serino-proteases de *A. gemmatalis* denominado Agem 1, Agem 2 e Agem 3, demonstrando a presença de família multigênica dessas proteases no genoma da lagarta da soja.
- As sequências apresentaram similaridades com genes de tripsinas de outros insetos de ordem lepidópteras, evidenciando que os domínios conservados de serino-proteases são mantidos para os genes de *A. gemmatalis*.
- Foi verificado que a expressão do gene Agem 2 se sobressaiu em relação ao gene Agem 1 e Agem 3, mostrando que esse deve ser expresso em maior quantidade no trato intestinal do inseto.
- As sequências descritas neste trabalho mostraram ser genes de tripsinas sensíveis e/ou insensíveis ao inibidor de serino protease Benzamidina uma vez que ocorre um aumento na expressão desses genes durante ao tratamento com o inibidor em relação ao controle.
- O inibidor sintético Berenil foi potencialmente eficiente na supressão dos genes de tripsinas isolados neste estudo, evidenciando que o sítio de ativação secundária S2` de tripsinas estando livre da interação com inibidores são extremamente importante na adaptação do inseto a inibidores de proteases.
- Os genes Agem 1, Agem 2 e Agem 3 mostraram ser sensíveis aos inibidores proteicos da soja SKTI e SBBI, diminuindo sua expressão durante o tratamento.
- A purificação em coluna p-aminobenzamidina foi eficiente na separação das serino-proteases tripsina-like dos extratos brutos excretados por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus gallinarum* isoladas do trato intestinal de *A. gemmatalis*.
- A massa molecular estimada em SDS-PAGE para as enzimas bacterianas foram de aproximadamente 25 kDa.

- As tripsinas-*like* produzido pela microbiota da lagarta da soja apresentaram maior atividade em temperatura a 40°C e em pH 7,5 para *B. cereus*, pH 10,0 para *E. mundtii*, e pH 8,5 para *S. xylosus* e *E. galinarum*.
- Os íons cálcio não afetaram as atividades enzimáticas das serino-proteases bacterianas nas concentrações testadas, indicando que o motivo de ligação de cálcio não é necessário às enzimas bacterianas purificadas.
- Os valores de K_M da serino-protease de *E. gallinarum*, *B. cereus*, *S. xylosus* e *E. mundtii* foram de 0,35mM, 0,18 mM, 0,21 mM e 0,22 mM, respectivamente.
- As enzimas bacterianas foram sensíveis à inibição por inibidores típicos de serino proteases e tripsina, como Aprotinina, Berenil e SKTI. Suas atividades não foram alteradas pelos inibidores TPCK de quimiotripsina, Pepistatina A de aspartil-proteases, E-64 de cisteíno-proteases e EDTA de metalo-proteases.