

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**UM INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA REDUZ A
RESISTÊNCIA AO MILHO TRANSGÊNICO EM UMA
POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

**Sandy Sousa Fonsêca
Engenheira Agrônoma**

**T
E
S
E
/
F
O
N
S
Ê
C
A

S
.
S
.

2
0
2
3**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**UM INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA REDUZ A
RESISTÊNCIA AO MILHO TRANSGÊNICO EM UMA
POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

Discente: Sandy Sousa Fonsêca

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

F676i	Fonsêca, Sandy Sousa Um inibidor de tripsina da soja reduz a resistência ao milho transgênico em uma população de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera:Noctuidae) / Sandy Sousa Fonsêca. -- Jaboticabal, 2023 53 p. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Guilherme Duarte Rossi 1. Insetos. 2. Pragas agrícolas. 3. Biotecnologia. 4. Milho. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: UM INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA REDUZ A RESISTÊNCIA AO MILHO TRANSGÊNICO EM UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

AUTORA: SANDY SOUSA FONSÊCA

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
ODERLEI BERNARDI
Data: 06/12/2023 10:26:49-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. ODERLEI BERNARDI (Participação Virtual)
Departamento de Defesa Fitossanitária / Universidade Federal de Santa Maria (UFMS) - Santa Maria/RS

Dr. RENATO ASSIS DE CARVALHO (Participação Virtual)
Bayer Crop Science - Brasil / São Paulo/SP



Documento assinado digitalmente
RENATO ASSIS DE CARVALHO
Data: 12/12/2023 09:27:58-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Profa. Dra. NILZA MARIA MARTINELLI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO DA COSTA FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Sandy Sousa Fonsêca - nascida em 19 de outubro de 1993, na cidade de Valença - BA, filha de Sijara Souza Fonseca e de Agripino Santos Fonseca. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica em 2011 da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) na cidade de Cruz das Almas-BA. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq) na área de Nutrição de Plantas e bolsista EMBRAPA na área de Entomologia. Obteve seu título de Engenheira Agrônoma em julho de 2017. Em agosto de 2017, iniciou o mestrado pelo programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) na cidade de Jaboticabal-SP e desenvolveu dissertação na linha de pesquisa em Biotecnologia e Resistência de Plantas a Insetos, Ácaros e Nematoides sob a orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior. Obteve seu título de mestra em fevereiro de 2019 e, em março de 2019, iniciou o curso de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na FCAV/UNESP sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi e atuou na linha de pesquisa Biotecnologia e Resistência de Plantas a Insetos, Ácaros e Nematoides.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Dedico

À minha avó Sinhá (em memória) por ter me dado forças mesmo não estando aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, pelas bênçãos, por me proteger e iluminar meus caminhos.

À minha família por todo apoio psicológico, emocional e financeiro para que eu pudesse concluir o doutoramento com êxito.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV/UNESP pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi pela orientação, pela paciência, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo incentivo e confiança durante toda a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pela confiança de ceder o Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) durante algumas etapas do meu trabalho.

À colega do LGBBA Dra. Raquel Oliveira Moreira por toda parceria e troca de conhecimentos

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao meu companheiro de vida, Joacir do Nascimento, por ser meu ponto de apoio, pela paciência e por toda ajuda para execução desse trabalho.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Bioquímica de Insetos, Ana Letícia Zéro dos Santos, Ciro Pedro Guidotti Pinto, Amanda Guimarães, pelo companheirismo e parceria, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos demais colegas de laboratório Leonardo Thiesen, Carolina Veluci, Nicole de Paula pelos momentos de descontração durante o doutoramento.

À colega Juliana Barroso, por toda paciência e ensinamentos compartilhados para a execução do trabalho.

À amiga Andressa Bini, por toda disponibilidade e paciência para sempre ajudar e pelas conversas descontraídas.

Aos amigos Ana Beatriz Dilena Spadoni e Matheus Cardoso Castro pela amizade sempre presente, por toda força e por tornarem a jornada mais leve.

À amiga Juliana Silva Queiroz por sempre conseguir um sorriso no meio do caos.

A todos os colegas da pós-graduação e amigos que direta ou indiretamente ajudaram durante esse período.

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

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos gerais da cultura do milho	3
2.2. Aspectos gerais do milho transgênico expressando proteínas inseticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.3. Aspectos fisiológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	7
2.4. Proteases digestivas de lepidópteros.....	9
2.5. Inibidores de proteases digestivas de lepidópteros de origem vegetal.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Clonagem do inibidor de tripsina de soja (SBTI)	13
3.2. Produção do SBTI	13
3.3. Teste de solubilidade do SBTI.....	14
3.4. Solubilização do SBTI	15
3.5. Purificação do SBTI.....	16
3.6. Insetos	16
3.7. Extração do intestino médio e inibição de tripsinas digestivas de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
3.8. Mortalidade e peso de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt com ou sem SBTI	18
3.9. Atividade de tripsinas e fosfatases alcalinas digestivas de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI	19
3.10. Análises Estatísticas	20
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Expressão, solubilização e purificação do SBTI.....	20
4.2. Atividade das tripsinas digestivas de <i>Spodoptera frugiperda</i> na presença de SBTI ...	21
4.3. Mortalidade e peso de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI	22
4.4. Efeitos do consumo de SBTI nas atividades de tripsinas e fosfatases alcalinas do intestino médio de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI	23
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	27

**UM INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA REDUZ A RESISTÊNCIA AO MILHO
TRANSGÊNICO EM UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

RESUMO - Em determinadas culturas de importância econômica, lepidópteros pragas têm sido controlados com sucesso pela adoção de plantas transgênicas resistentes a insetos que expressam proteínas inseticidas Cry e/ou Vip derivadas do microrganismo *Bacillus thuringiensis* Berliner (plantas Bt). Dentre as pragas alvos das plantas Bt, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) destaca-se pelo seu potencial destrutivo na cultura do milho e pelos casos de resistência em campo às plantas Bt. Após serem ingeridas, as proteínas inseticidas expressas em plantas Bt interagem com receptores no intestino médio com consequente ruptura das células do intestino médio e morte da praga alvo. No intestino médio de imaturos de lepidópteros como *S. frugiperda*, as serino proteases são importantes na digestão de proteínas e na ativação ou degradação de proteínas inseticidas. O presente trabalho foi conduzido para avaliar se a ingestão de um inibidor de tripsina de soja (SBTI) poderia implicar em alterações no desenvolvimento de duas populações de *S. frugiperda*, sendo uma população resistente e a outra suscetível ao milho Bt que expressa as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2. O SBTI foi produzido e purificado utilizando expressão heteróloga em *E. coli* seguida de purificação em Ni-Sepharose. Bioensaios utilizando folhas de milho não Bt indicaram que o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes não foi influenciado pela ingestão de SBTI. No entanto, quando a população resistente consumiu plantas de milho Bt contendo SBTI, foi observada alta mortalidade juntamente com uma redução no peso larval e redução da atividade das tripsinas digestivas. Embora o modo de ação não tenha sido elucidado, foi possível observar que o consumo de SBTI aumentou a suscetibilidade da população resistente de *S. frugiperda* ao milho Bt.

Palavras-chave: inibição de tripsina, manejo de resistência de insetos, nutrição de insetos

**A SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR REDUCES THE RESISTANCE TO
TRANSGENIC MAIZE IN A POPULATION OF *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

ABSTRACT - Lepidopteran pests have been successfully managed by the adoption of insect resistant transgenic plants expressing Cry and/or Vip insecticidal proteins derived from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt plants). Among such pests, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is highlighted for its destructive potential in maize crops and for cases of field-evolved resistance to Bt plants. Cry insecticidal proteins expressed in Bt plants are known for their interaction with insect midgut receptors and subsequent midgut cell disruption that leads to target pest death. In the midgut of lepidopteran larval pests such as *S. frugiperda*, serine proteases are important in dietary protein digestion and activation or degradation of insecticidal proteins. This work was conducted to evaluate whether the use of a soybean trypsin inhibitor (SBTI) could disrupt the development of a Bt susceptible and a Bt resistant population of *S. frugiperda* ingesting Bt (expressing Cry1F, Cry1A.105, and Cry2Ab2 Cry proteins) and non-Bt maize plants. The SBTI was produced and purified using recombinant expression in *E. coli* followed by purification in Ni-Sepharose. Bioassays using non-Bt maize leaves indicated that the development of susceptible and resistant populations of *S. frugiperda* was not influenced by the ingestion of SBTI. However, when the resistant population consumed Bt maize plants amended with SBTI, high mortality along with a reduction in larval weight and reduced activity of digestive trypsins were observed. Although the mode of action was not elucidated, it is possible that the consumption of SBTI increased susceptibility to Bt maize in the resistant population of *S. frugiperda*.

Keywords: trypsin inhibition, insect resistance management, insect nutrition

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande importância mundial, sendo cultivado em 22,3 milhões de hectares no Brasil em 2022/2023 (Conab, 2022). A produtividade da cultura do milho é severamente prejudicada por insetos pragas, com destaque para a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), que causa danos desde a emergência da planta até os estágios reprodutivos da cultura (Blanco et al., 2016).

O manejo desta praga por meio de aplicações de inseticidas químicos ou microbianos é dificultado pelos hábitos comportamentais das lagartas de *S. frugiperda*, como alimentação e refúgio dentro do cartucho das plantas de milho, local de difícil aplicação dos agentes de controle (Barros et al., 2010). Atualmente, o uso de plantas transgênicas de milho que expressam proteínas inseticidas Cry derivadas do microrganismo entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* Berliner (milho Bt) destaca-se como uma tática eficaz para o manejo de lagartas de *S. frugiperda* (Bravo et al., 2011; Blanco et al., 2016; ISAAA, 2021).

Apesar da eficiência do milho Bt para o controle de lepidópteros pragas, a seleção de populações resistentes às plantas transgênicas tem sido uma preocupação contínua (Sparks et al., 2021). No Brasil, foram registrados casos de resistência de *S. frugiperda* em campo para plantas transgênicas que expressam as proteínas inseticidas Cry1F e Cry1Ab (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016). Para retardar o desenvolvimento de populações de pragas resistentes às plantas transgênicas de milho Bt, táticas de manejo de resistência a insetos (MRI) foram desenvolvidas e devem ser aplicadas no campo, como o plantio de áreas de refúgio com milho não Bt para manter a suscetibilidade em uma parte da população de pragas não expostas às plantas transgênicas, o uso de plantas transgênicas que expressam altas doses e o uso de mais de uma proteína inseticida ativa para controlar a mesma praga (piramidação de genes) (Tabashnik et al., 2013; Tabashnik e Carrière, 2017; Faretto et al., 2017). Para contribuir com a estratégia de piramidação de genes, é fundamental o investimento na descoberta de novas proteínas inseticidas com diferentes modos de ação para o controle de insetos pragas (Bravo et al., 2011; Faretto et al., 2017; Chae et al., 2022).

Mecanismos de resistência às proteínas Cry têm sido observados e sugeridos, como alterações na composição de receptores do intestino médio, reduzida taxa de ativação de pró-proteínas, desintoxicação de proteínas inseticidas por meio de hidrólise excessiva ou inadequada, rápida regeneração do tecido do intestino médio, mecanismos relacionados ao sistema imunológico (Jurat-Fuentes et al., 2021) e baixa permeabilidade ou aprisionamento de toxinas na membrana peritrófica (Pérez-Hedo et al., 2012; Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017). Especificamente em *S. frugiperda*, alterações no gene ABCC2 têm sido associadas à resistência de insetos pragas às proteínas Cry1A (Boaventura et al., 2020).

Como as proteínas Cry interagem com as enzimas digestivas e com o epitélio do intestino médio para causar a morte do inseto, interferências na digestão proteica de lagartas de lepidópteros podem alterar essa interação. Em lagartas de lepidópteros, as serino proteases, principalmente tripsinas, são responsáveis pela digestão de proteínas e representam um componente essencial para a nutrição de aminoácidos (Srinivasan et al., 2006; Terra e Ferreira, 2020). Durante a interação das proteínas inseticidas Cry com o processo digestivo de lagartas de lepidópteros, as tripsinas podem apresentar papéis distintos, como ativação de protoxina ou desintoxicação de proteínas inseticidas Cry (Pérez-Hedo et al., 2012, Singh et al., 2020).

A digestão de proteínas em lagartas de lepidópteros é conhecida por ser reduzida por inibidores de tripsina de origem vegetal e podem levar a deficiências nutricionais graves que podem resultar em malformação ou morte do inseto (Zhu-Salzman e Zeng, 2015; Singh et al., 2020). No que diz respeito à interação de inibidores de tripsina com proteínas Cry no sistema digestivo de lagartas de lepidópteros, levantam-se as hipóteses de que a redução da atividade de tripsinas causada por inibidores de tripsina pode (i) retardar as taxas de ativação de protoxinas reduzindo a eficácia de proteínas inseticidas Cry; (ii) retardar as taxas de desintoxicação de proteínas inseticidas Cry; (iii) resultar na desnutrição dos insetos, com as duas últimas hipóteses resultando em maior eficácia das proteínas inseticidas Cry.

Considerando a importância das serino proteases na ativação ou desintoxicação de proteínas inseticidas Cry, bem como na digestão proteica e,

consequentemente, na nutrição de insetos, o objetivo principal do presente trabalho foi observar se um inibidor de tripsina de soja (SBTI) poderia reduzir a resistência das lagartas de *S. frugiperda* a uma planta comercial de milho Bt que expressa as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da cultura do milho

A cultura do milho iniciou-se na agricultura formal há cerca de 10.000 anos na Mesoamérica, onde as sociedades primitivas desenvolveram e domesticaram o milho, transformando-o em raças primitivas que constituem a base genética para as diversas variedades e híbridos existentes atualmente. Após seu estabelecimento, a cultura rapidamente se espalhou pela Europa, Ásia e África, onde também é amplamente plantado e utilizado (García-Lara e Serna-Saldivar, 2019).

No Brasil, a cultura do milho é cultivada em pouco mais de 22 milhões de hectares, sendo 51% dessa produção localizada no centro-oeste, 25% no sul, 9% no sudeste, 10% no nordeste e 5% no norte do País (CONAB, 2023). Globalmente, o País é o terceiro produtor mundial, o quarto consumidor e o maior exportador de milho (Departamento do Agronegócio da Fiesp, 2023). Dos 22 milhões de hectares cultivados com milho, 16,3 milhões são transgênicos e, entre esses, são divididos em milho com resistência a insetos, com tolerância a herbicidas e com resistência a insetos associada a tolerância a herbicidas (ISAAA, 2019).

O milho constitui um alimento básico na dieta de diversos países, como na África Subsariana, América Latina e alguns países da Ásia, nos quais o cereal é responsável por mais de 20% das calorias consumidas (Shiferaw et al., 2011). Em países mais desenvolvidos, a utilização dos grãos de milho é destinada principalmente para alimentação de animais (Erenstein et al., 2022). Dessa forma, o milho representa um importante papel nos sistemas agroalimentares e na segurança nutricional dos consumidores (Grote et al., 2021; Poole et al., 2021).

A facilidade de adaptação para cultivo em diferentes regiões do mundo como os trópicos, subtropicais e zonas temperadas é dada em função do milho ser uma

planta C4 com alta eficiência fotossintética (Mekonnen e Gerbens-Leenes, 2020). Entretanto, principalmente na região dos trópicos, há também o favorecimento de fatores que afetam a produção, como o aparecimento de novas pragas e doenças (Burdon e Zhan, 2020; Boddupalli et al., 2020; De Groote et al., 2020).

No Brasil, o sistema de produção do milho é mecanizado e combina uma genética altamente produtiva com uma gestão intensiva das culturas (Erenstein et al., 2022). Por ser polinizado de forma cruzada, o milho aumentou as perspectivas de melhoramento dos híbridos, sendo que a progênie apresenta características melhores do que seus progenitores (Morris, 1998; Erenstein et al., 2022). Inicialmente, os investimentos em melhoramento genético tradicional do milho foram focados para alto rendimento na produção de grãos, resistência a pragas e doenças e, posteriormente, na tolerância a estresses abióticos (Krishna et al., 2021).

Desde a década de 90, o uso da biotecnologia em sementes de milho aumentou significativamente e resultou principalmente na obtenção de plantas transgênicas desenvolvidas para expressarem tecnologias de resistência a insetos e tolerância a herbicidas ou ambas características simultaneamente (Sanahuja et al., 2011; Areal et al., 2013). O sucesso dos materiais desenvolvidos pode ser observado pelo fato do milho figurar como a segunda cultura geneticamente modificada mais cultivada no mundo, com aproximadamente 61 milhões de hectares (ISAAA, 2019). Destes, o milho resistente a insetos (híbridos que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*) foi o que trouxe mais benefícios para a cultura em termos mundiais, principalmente em países como EUA, Brasil, África do Sul, Canadá e Argentina, seguido pelo milho com tolerância a herbicidas (principalmente glifosato) e milho tolerante à seca (Brookes e Barfoot, 2020).

2.2. Aspectos gerais do milho transgênico expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*

Atualmente, uma das formas mais eficazes para o manejo de pragas na cultura do milho é o cultivo de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), as chamadas plantas Bt (Blanco et al., 2016).

Inicialmente, o uso de *B. thuringiensis* para o controle de insetos pragas foi realizado por meio da pulverização de formulações do bioinseticida Bt sobre culturas comerciais (Angus, 1964; Lacey, 2017). A descoberta das proteínas inseticidas Cry como principal fator virulento, garantiu melhorias no desenvolvimento e consequente sucesso dos bioinseticidas Bt (Hannay, 1953). Entretanto, fatores de campo como a suscetibilidade dos bioinseticidas Bt a radiação ultravioleta e a altas temperaturas reduzem a atividade residual, o que aumenta a necessidade de novas aplicações com consequente aumento dos custos de produção (Navon, 2000; Sanahuja et al., 2011; Nascimento et al., 2022).

O aumento da estabilidade das proteínas inseticidas de Bt em campo foi dado a partir de 1980, quando foram desenvolvidas as primeiras plantas transgênicas expressando as proteínas inseticidas de Bt (Sanahuja et al., 2011). Em 2001, a variedade de milho Herculex expressando Cry1F foi produzida em uma parceria entre a Pioneer Hi-Bred (Johnston, IA) e Dow AgroSciences (Indianapolis, IN) (evento TC 1507), conferia proteção das plantas contra a lagarta preta (*Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera, Noctuidae)), a lagarta do cartucho (*S. frugiperda*) e a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae)) e foi aprovada para comercialização e cultivo pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Sanahuja et al., 2011). No Brasil, a tecnologia de milho Bt derivada do milho MON810 que expressa a proteína inseticida Cry1Ab foi implantada comercialmente em 2008 e a variedade Herculex que expressava a proteína inseticida Cry1F foi comercialmente implantada em 2009 (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016).

Atualmente, diferentes eventos de milho que expressam as proteínas Cry e Vip de *B. thuringiensis* têm sido eficazes para o manejo de uma série de pragas alvos (Bravo et al., 2011). Além da eficiência para o manejo de pragas alvos, as plantas Bt não apresentam toxicidade para humanos e apresentam efeitos reduzidos, ou até mesmo nulos, sobre organismos não alvo (Yaqoob et al., 2016; Svobodová et al., 2017; Shu et al., 2019).

As proteínas Cry são classificadas em função da similaridade observada entre suas composições de aminoácidos (Crickmore et al., 1998). Diante das mudanças ocorridas na nomenclatura das proteínas, as classes de proteína Cry, Cyt e Vip3 não sofreram alteração em relação a nomenclatura anterior, sendo que a classe das

proteínas Cry incluem apenas proteínas que apresentam três domínios (Crickmore et al., 2021) que podem estar associados ao modo de ação dessas toxinas, sendo o primeiro relacionado com a oligomerização das toxinas e o segundo e terceiro domínios com o reconhecimento e a ligação a proteínas receptoras do intestino médio (Bravo et al., 2013).

Em insetos suscetíveis, o modo de ação dessas proteínas inseticidas está diretamente relacionado com os domínios das proteínas e os domínios II e III são os principais determinantes da especificidade das toxinas. De maneira geral, o modo de ação das toxinas Cry expressas em plantas transgênicas envolve a ativação da protoxina inativa por proteases do intestino médio, ligação das toxinas a receptores específicos e, após uma sequência de processos bioquímicos, formação de poros na membrana que resultam na morte do inseto por choque osmótico e lise celular (Bravo et al., 2007; Bravo et al., 2013).

Entretanto, o principal problema dos cultivos de plantas Bt tem sido a evolução da resistência nas populações das pragas alvos (Bernardi et al., 2017). No Brasil, já são registrados casos de resistência de *S. frugiperda* em campo para cultivares de milho transgênico que expressam as proteínas inseticidas Cry1F e Cry1Ab (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016).

Algumas estratégias são utilizadas para manejar a resistência e a adoção do plantio de áreas de refúgio e o plantio de plantas piramidadas com expressão em alta dose têm sido as mais recomendadas (Tabashnik et al., 2013; Tabashnik e Carrière, 2017; Fatochetto et al., 2017). As áreas de refúgio são áreas próximas dos cultivos de plantas Bt nas quais plantas de fenologia semelhante e não Bt são plantadas para manutenção de populações de indivíduos suscetíveis não expostos à pressão de seleção exercida pelas plantas Bt em campo. Esses insetos suscetíveis não expostos às plantas Bt, ao cruzarem com indivíduos resistentes selecionados nos cultivos Bt, formam descendentes heterozigotos suscetíveis ao cultivo Bt que expressa alta dose. A alta dose é definida como a utilização de plantas transgênicas que expressam concentrações elevadas de toxinas, ou seja, concentrações de 25 a 50 vezes superior à concentração letal necessária para matar 99% de uma população suscetível (Tabashnik e Carrière, 2017). Outra estratégia para o manejo da resistência é a piramidação de genes, ou seja, a expressão de vários genes que codificam proteínas

inseticidas na mesma planta de forma a atingir o inseto por diferentes mecanismos (Sanahuja et al., 2011).

Apesar das ações para manejo da resistência, a evolução da resistência de insetos é um fato predisposto a acontecer e pode estar relacionada a diversos fatores e alterações fisiológicas/bioquímicas observadas em insetos resistentes que interfiram em qualquer um dos passos do modo de ação das toxinas e pode resultar na ineficiência das mesmas (Bravo et al., 2011; Fatoretto et al., 2017).

2.3. Aspectos fisiológicos de *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda, popularmente chamada de lagarta do cartucho, é uma praga fitófaga altamente polífaga conhecida por se alimentar de pelo menos 353 plantas hospedeiras pelo mundo (Montezano et al., 2018). No milho, é considerada uma das principais pragas e causa danos desde a emergência até a fase reprodutiva da cultura, comprometendo a qualidade e o rendimento da produção (Blanco et al., 2016). Originária das Américas (Sparks, 1979), espalhou-se recentemente pela África Central e Ocidental e por países asiáticos como Índia e China (Goergen et al., 2016; Sisodiya et al., 2018; Sun et al., 2021).

Devido à polifagia, as lagartas de *S. frugiperda* são capazes de se alimentarem de diversas partes das plantas hospedeiras (Sena et al., 2003). Para isso, sua fisiologia é adaptada para lidar com a fenologia da planta, lidar com as defesas químicas e físicas das plantas e digerir materiais vegetais complexos para obter nutrientes essenciais para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (Simon et al., 2015).

A capacidade de desenvolvimento de *S. frugiperda* alimentando-se de novos hospedeiros aumenta com o passar das gerações e a aptidão dessa praga por esses hospedeiros está relacionada à expressão de genes que codificam enzimas digestivas e de desintoxicação (Hafeez et al., 2021).

A digestão dos alimentos ingeridos por lagartas de *S. frugiperda* inicia-se dentro da membrana peritrófica (espaço endoperitrófico), progride para o espaço ectoperitrófico e é encerrado na superfície das microvilosidades das células do intestino médio com a absorção dos nutrientes. Esse processo conservado entre

lagartas de lepidópteros é diferenciado em *S. frugiperda* em função da presença de muitas enzimas envolvidas na digestão terminal presas no glicocálice, poucas enzimas no espaço ectoperitrófico e uma grande quantidade de enzimas presas ao material gelatinoso próximo a membrana peritrófica (Ferreira et al., 1994; Fuzita et al., 2022)

Devido aos diferentes alimentos que consomem e seus respectivos valores nutricionais, de maneira geral, os insetos herbívoros precisam desenvolver mecanismos de adaptação que envolvem a expressão de diferentes enzimas digestivas e uma série de enzimas de desintoxicação para consumirem adequadamente os alimentos (Roy et al., 2016; Pym et al., 2019). Em *S. frugiperda*, ocorrem alterações na expressão gênica de enzimas digestivas e de desintoxicação em função da planta que a lagarta consome (Hafeez et al., 2021). Com isso, a presença de toxinas na planta hospedeira influencia no aumento da expressão de enzimas digestivas (Gog et al., 2014; Lei et al., 2014; Herde e Howe, 2014). Em lagartas de *S. frugiperda*, ocorre o aumento da expressão de proteases em função da ingestão de inibidores de proteases das plantas, além disso, observa-se a alta expressão de lipases que fornecem nutrição e energia para a fase imatura do inseto em compensação ao efeito causado pelos inibidores (Srinivasan et al., 2006; Roy et al., 2016).

As toxinas de algumas plantas também podem degradar proteínas associadas a membrana peritrófica, porém, nessa situação, lagartas de *S. frugiperda* expressam uma resposta transcriptômica compensatória para remodelação da membrana peritrófica e aumento da sua resistência contra danos físicos e enzimáticos associado a sua diversificada dieta (Fescemyer et al., 2013; Roy et al., 2016).

Após a digestão extracelular, transportadores moleculares auxiliam na absorção dos nutrientes, manutenção do pH e equilíbrio osmótico no intestino (Lei et al., 2014; Ribeiro et al., 2014). Lagartas de *S. frugiperda* adaptadas ao milho apresentam alterações na expressão desses transportadores quando comparadas com lagartas não adaptadas, o que sugere que insetos generalistas apresentam mais respostas às diferentes dietas (Roy et al., 2016; Govind et al., 2010).

Todas essas estratégias do sistema digestivo de *S. frugiperda* servem para que o inseto otimize a aquisição de nutrientes por um mecanismo compensatório para suprir a necessidade de energia das diferentes dietas (Roy et al., 2016).

2.4. Proteases digestivas de lepidópteros

O tubo digestivo dos imaturos de lepidópteros pode ser dividido em intestinos anterior, médio e posterior. O intestino anterior é responsável principalmente pela digestão mecânica dos alimentos, visto que essa região intestinal é toda revestida por cutícula e não ocorre absorção significativa de nutrientes. O intestino anterior é composto pelo ponto de recebimento do conteúdo das glândulas salivares e faringe, esôfago, papo e pró-ventrículo, sendo os últimos de tamanho bem reduzido. O intestino médio é a maior porção do intestino de lepidópteros imaturos é onde ocorre a maior parte da digestão química e absorção dos alimentos, visto que não há revestimento por cutícula e é onde está a maior concentração de enzimas digestivas. Inicia-se logo após o final do intestino anterior, não apresenta cecos gástricos e tem fim no ponto de inserção dos túbulos de Malpighi. O intestino médio de lepidópteros imaturos possui uma estrutura não celular semelhante a um filme, chamada membrana peritrófica, que protege as células do intestino médio contra abrasões pelos alimentos, invasões por microrganismos, compartimentaliza o intestino médio em espaços endoperitrófico e ectoperitrófico e apresenta permeabilidade seletiva para enzimas e produtos da digestão (Bolognesi et al., 2001; Bolognesi et al., 2008). Por último, o intestino posterior, apesar de ser revestido por cutícula, é responsável pela absorção de substâncias importantes na região das papilas retais antes que elas sejam eliminadas. É composto pelo íleo, cólon e reto (Terra e Ferreira, 2009; Hegedus et al., 2009; Engel e Moran, 2013; Gullan e Cranston, 2014).

Os aminoácidos necessários para manutenção da vida dos insetos são obtidos pela digestão de proteínas presentes na dieta, que são clivadas por uma ampla gama de enzimas digestivas presentes no intestino médio do mesmo (Murdock et al., 1987; Emani, 2018). Proteases hidrolisam as proteínas em tamanhos que facilitam a absorção pelo intestino médio (Terra, 1996). Podem ser classificadas em função de

seus mecanismos de catálise como, por exemplo, serino proteases, cisteíno proteases, proteases aspárticas e metaloproteases (Bode e Huber, 1992).

Por muito tempo, sabia-se que os insetos apresentavam apenas serino proteases e proteases aspárticas. Entretanto, atualmente, sabe-se que a maior parte das proteases presentes nos sistemas digestivos dos insetos são as serino proteases e as cisteíno proteases (McFarlane, 1985; Haq et al., 2004). Foi realizado um estudo detalhado sobre as proteínas do intestino médio de diferentes espécies de lepidópteros (Srinivasan et al., 2006) e, as serino proteases correspondem a 95% das enzimas digestivas presentes no intestino médio (Macedo e Freire, 2011).

As serino proteases estão presentes na maioria dos animais e são indispensáveis para a manutenção de processos biológicos de diversos organismos (Joanitti et al., 2006; Macedo e Freire, 2011). Recebem esse nome pois são compostas por uma tríade catalítica, na qual os três aminoácidos do sítio ativo envolvido na catálise são asparagina (Asp), histidina (His) e serina (Ser) e, por meio de uma catálise covalente, as enzimas clivam as ligações peptídicas das proteínas, devido a presença de um aminoácido nucleofílico (Ser) no sítio ativo que reage com uma região eletrofílica do substrato e forma uma ligação covalente transitória (Walsh e Wilcox, 1970; Tyndall et al., 2005; Macedo e Freire, 2011).

As serino proteases mais estudadas em lepidópteros são as quimotripsinas e as tripsinas (Macedo e Freire, 2011). O principal ponto de clivagem das quimotripsinas são os aminoácidos aromáticos, enquanto o ponto de clivagem das tripsinas são os aminoácidos arginina e lisina (Muhlia-Almazán et al., 2008; Lazarevic e Janković-Tomanić, 2015).

Os alimentos ingeridos afetam diretamente a atividade de tripsina através da regulação da síntese por alterações no pH e condições redox do intestino. O intestino médio de lepidópteros imaturos apresenta pH altamente alcalino e apresenta tripsinas de pH ótimo alcalino (Ferreira et al., 1994). O pH alcalino de lepidópteros imaturos representa uma adaptação a alimentos ricos em compostos polifenólicos como taninos que são conhecidos por se complexarem às proteínas ingeridas e reduzirem a digestibilidade proteica em condições de pH não alcalino (Hughes e Vogler, 2006; Brune, 2014; Lazarevic e Janković-Tomanić, 2015).

Além disso, o aumento da expressão de algumas serino proteases está relacionada com a exposição dos insetos a moléculas tóxicas de ocorrência natural no alimento, como por exemplo os inibidores de proteases de plantas (Srinivasan et al., 2006). As tripsinas também podem ser responsáveis pelo sequestro desses inibidores de proteases (Mazumdar-Leighton et al., 2000) e a presença desses inibidores também pode ocasionar uma expressão elevada de tripsina (Oliveira-Neto et al., 2004). A tripsina também pode estar relacionada com ativação da protoxina de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) ou degradação da toxina Bt (González-Cabrera et al., 2013).

2.5. Inibidores de proteases digestivas de lepidópteros de origem vegetal

O processo de crescimento das plantas, desde a germinação até a senescência é controlado por uma série de proteases que desempenham funções como auxiliar no desenvolvimento da planta, proteção contra estresses abióticos e predadores, remoção de outras proteínas que estejam danificadas. De maneira geral, as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e também são capazes de clivar substratos menores (Brix e Stöcker, 2013; Kaysser, 2019). Entretanto, esse processo é altamente equilibrado, de maneira que inibidores de proteases e proteases coexistem e desempenham funções bem específicas (Rawlings et al., 2014). Os inibidores de proteases de origem vegetal são uma família bem ampla de peptídeos que mantem a homeostase fisiológica da planta e fazem parte dos mecanismos de defesa inato da mesma (Hellinger e Gruber, 2019).

As plantas desenvolveram vários mecanismos, principalmente químicos, para se protegerem do ataque de patógenos, vírus, bactérias e herbívoros. Os inibidores de proteases podem se manifestar de maneira constitutiva ou induzida como resultado das injúrias causadas pelos agentes patogênicos (Polya, 2003; Aljbory e Chen, 2018).

A maioria dos inibidores de proteases são moléculas orgânicas, aminoácidos ou seus derivados. Entretanto, os inibidores proteicos são os mais expressos nas plantas (Hellinger e Gruber, 2019). Normalmente, suas principais funções envolvem a regulação das proteases endógenas, impedem a degradação de proteínas de armazenamento em sementes ou grãos e representam mecanismos de defesa contra

patógenos e insetos (Valueva e Mosolov, 2004; Lawrence e Koundal, 2002; Ryan, 1990; Gomes et al., 2011).

Contra os insetos, essas moléculas inibem as enzimas digestivas ou outras proteases essenciais ao se ligar ao seu local ativo e bloquear a atividade proteolítica, o que causa uma diminuição ou interrupção da digestão de proteínas e, conseqüentemente, escassez de aminoácidos importantes nos processos vitais (Jongsma et al., 1997; Zhu-Salzman e Zeng, 2015; Shamsi et al., 2018; Cingel et al., 2017). Além disso, os inibidores de proteases podem interferir em processos bioquímicos ou fisiológicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento do inseto e participam do processo de morte celular programada (Stevens, et al., 2012; Ge et al., 2016).

Ao ingerir um inibidor de protease junto com o alimento, algumas proteases dos insetos se tornam indisponíveis por sofrerem um bloqueio pelo inibidor e, com isso, o inseto se torna incapaz de hidrolisar as proteínas. Entretanto, alguns insetos são capazes de se alimentarem de uma planta que expressa esses inibidores, por apresentarem algum mecanismo alternativo em sua digestão (Brunelle et al., 2004; Telang et al., 2005).

Os inibidores de proteases são classificados de acordo com o sítio catalítico da enzima alvo, que podem ser as serinas, cisteínas, aspártico e as metaloproteases. A maioria deles inibem as serino proteases (Leung, 2000). São encontrados, principalmente, em plantas das famílias Solanaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Poaceae e Curcunitaceae e, podem ser classificados em 4 principais grupos: Kunitz, Bowman-Birk; Batata I e Batata II. Entre esses, os mais frequentemente encontrados são os do tipo Kunitz e Bowman-Birk, principalmente em plantas da família Fabaceae (Fan e Wu, 2005; Haq et al., 2004; Cotabarren et al., 2020).

Os inibidores do tipo Bowman-Birk são proteínas que apresentam massa molecular entre 4 e 8 kDa, 14 resíduos de cisteína, 7 ligações dissulfeto e dois sítios de ligação a proteínas (Cotabarren et al., 2020). Os inibidores do tipo Kunitz geralmente apresentam massa molecular entre 18 e 24 kDa, até duas cadeias polipeptídicas, 4 resíduos de cisteína e formam duas pontes dissulfeto e um sítio de ligação as proteínas.

Na natureza, as principais funções desses inibidores são de regular proteases endógenas, atuar como proteínas de armazenamento, auxiliar na defesa contra pragas e patógenos, participar do desenvolvimento embrionário e crescimento, inibir a adesão de células tumorais, inibir proteases virais e manejar o estresse da planta (Bendre et al., 2018).

Em termos biotecnológicos, os inibidores de serino proteases podem figurar como um fator de resistência inserido por meio de recombinação genética de plantas transgênicas resistentes a injúrias causadas por lepidópteros pragas que possuem serino proteases (tripsina e quimotripsina) como principais fatores da digestão de proteínas (Cotabarren et al., 2020).

A maioria dos inibidores de serino proteases com atividade inseticida apresentam estabilidade em temperaturas e pH extremos e podem prejudicar o desenvolvimento de lepidópteros pragas imaturos por meio da inibição das proteases digestivas (Bakail e Ochsebein, 2016; Macedo et al., 2011; Tripathi et al., 2014; Abd El-latif, 2014; Ruan et al., 2017; Jamal et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Clonagem do inibidor de tripsina de soja (SBTI)

A sequência de aminoácidos do inibidor de tripsina do tipo Kunitz de soja (SBTI) foi obtida do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, número de acesso NP_001238611.2). A sequência de nucleotídeos codificante da forma madura de SBTI (peptídeo sinal removido conforme indicado pela análise usando SignalP 6.0 – Teufel et al., 2022) foi sintetizada com otimização de códons para expressão em *E. coli* e foi clonada no plasmídeo pET24a+ entre os sítios de restrição XhoI e NdeI (Genone, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O plasmídeo contendo a sequência de nucleotídeos do SBTI foi denominado pET24a+SBTI. Foi previsto que o SBTI maduro contendo a cauda de poli-histidina (His-tag) fosse expresso em *E. coli* como uma proteína de 22,5 kDa.

3.2. Produção do SBTI

pET24a+SBTI foi ressuspensa em água pura (2 ng/mL) e 2 µL foram transferidos para 40 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 [DE3] Codon Plus dentro de uma cubeta de eletroporação previamente mantida em gelo por 10 min. As células foram transformadas por pulso elétrico (1,8 kV/25 µF, 5 s) utilizando um eletroporador (Gene Pulse, BioRad, Hercules, CA, EUA). Após o pulso elétrico, 1 mL de meio LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl por litro) foi adicionado à cubeta e a suspensão celular foi transferida para um tubo Eppendorf (1,5 mL) e incubada a 37°C por 1,5 h sob agitação orbital de 180 rpm. A cultura foi plaqueada sobre uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio LB sólido (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 15 g de ágar bacteriológico por litro) contendo 50 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C durante 16-20 h.

Para expressão heteróloga de SBTI, uma colônia única de *E. coli* BL21 [DE3] Codon Plus transformada com pET24a+SBTI foi transferida para 50 mL de LB contendo 50 µg/mL de canamicina e mantida a 37°C sob agitação orbital de 200 rpm por 16 h para formação do pré-inóculo. O pré-inóculo foi diluído 20 vezes dentro de um frasco Erlenmeyer de 250 mL (5 mL do pré-inóculo mais 95 mL de LB corrigido com 50 µg/mL de canamicina) e incubado a 37°C sob agitação orbital de 200 rpm até atingir DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Neste ponto, a expressão de SBTI foi induzida pela adição de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) em concentração final de 100 µM na cultura. Amostras da cultura (500 µL) foram coletadas em 1, 2, 3 e 4 horas após a indução com IPTG. As amostras foram centrifugadas (10.000 g, 5 min, 4°C) e os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 80 µL de tampão SDS-PAGE 1x (TRIS-HCl 31,25 mM pH 6,8, SDS a 1%, glicerol a 12,5%, β-mercaptoetanol a 2,5%, azul de bromofenol a 0,005%), fervidos durante 10 min e 20 µL de cada amostra foram aplicados em gel de SDS-PAGE a 15% (Laemmli, 1970; Sambrook e Russel, 2001). A eletroforese dos géis foi realizada em voltagem constante de 100 V e as bandas de proteína foram reveladas usando 0,12% de Coomassie Blue R250 em uma solução de água/etanol/ácido acético (350/75/75).

3.3. Teste de solubilidade do SBTI

Após confirmação da expressão do SBTI, foi verificada a solubilidade do SBTI produzido. Para isso, pellets celulares foram obtidos após centrifugação (20.000g, 30 min, 4°C) de 50 mL de bactérias cultivadas a 37°C sob agitação orbital de 200 rpm e 4 h após a indução com IPTG 1 mM. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 10 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4). A lise celular foi realizada pela adição de 300 μL de lisozima de clara de ovo de galinha (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 μL de DNase I de pâncreas bovino (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich) seguida de incubação (37°C, 30 min) e manutenção em gelo.

As amostras (20 mL) foram sonicadas em banho ultrassônico (3 ciclos de 1 min a 40 kHz com intervalos de 10 segundos em temperatura ambiente) e centrifugadas (4.000 rpm, 30 min, 4°C). O sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) foram coletados em tubos diferentes. O sedimento contendo corpos de inclusão, proteínas insolúveis e restos celulares foi ressuspense em 10 mL de tampão de solubilização de restos celulares (Tris HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, ureia 1 M, Triton X-100 a 1%). Esta solução foi incubada em temperatura ambiente durante 5 min e centrifugada (9.000 rpm, 4°C, 30 min). O sobrenadante (parede celular e proteínas solubilizadas) foi descartado e o sedimento (corpos de inclusão e proteínas insolúveis) foi ressuspense em água deionizada (10 mL). Amostras de proteínas solúveis e proteínas insolúveis obtidas após a solubilização dos restos celulares foram mantidas a -20°C e o perfil proteico de cada fração foi observado em SDS-PAGE a 15% conforme descrito no item 3.2 utilizando 20 μL de cada amostra e 4 μL de tampão SDS-PAGE 6x.

3.4. Solubilização do SBTI

Após teste de solubilidade, o sedimento foi lavado com 10 mL de PBS para remoção de Triton X-100 por meio de centrifugação (9.000 rpm, 20 min, 4°C) e descarte do sobrenadante. O sedimento foi ressuspense em PBS contendo ureia 2 M e incubado durante 16 horas a -20°C. A solução foi descongelada em temperatura ambiente e centrifugada (9.000 rpm, 15 min, 4°C). O sobrenadante contendo as

proteínas solubilizadas foi coletado e o perfil proteico foi observado em SDS-PAGE a 15% como descrito no item 3.2.

3.5. Purificação do SBTI

A purificação do SBTI foi feita utilizando 5 mL de resina “Ni Sepharose 6 Fast Flow” equilibrada com 20 mL de tampão de lavagem (Tris 9,9 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 49,9 mM e NaCl 99,93 mM, pH 8,0). Uma alíquota (10 mL) de amostras solubilizadas de SBTI foi aplicada na coluna e o volume eluído foi coletado em duas frações de 5 mL. A coluna foi lavada com 15 mL de tampão de lavagem e três amostras de 5 mL foram coletadas. A eluição das proteínas adicionadas à resina foi feita utilizando 10 mL de cada solução de imidazol a 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM com coleta de frações de 5 mL. O perfil proteico das frações coletadas foi observado em SDS-PAGE a 15% conforme descrito no item 3.2.

A remoção do imidazol nas frações eluídas contendo SBTI foi feita utilizando membranas de diálise de celulose (12 MWCO, Sigma-Aldrich) contra água deionizada a 4°C. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas (JJ Científica, São Carlos, Brasil) e ressuspensas em água deionizada. A quantificação da proteína foi feita utilizando o Reagente de Bradford de acordo com as instruções do fabricante e albumina de soro bovino como padrão (Sigma-Aldrich). As proteínas totais foram quantificadas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e as soluções de trabalho foram ajustadas para 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.6. Insetos

Duas populações de *S. frugiperda* foram utilizadas neste trabalho. A população suscetível ao milho Bt (30A37PW, MON89034 x TC1507 x NK603, expressando as proteínas Bt Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) foi mantida em laboratório sem exposição a agrotóxicos ou plantas transgênicas por pelo menos 15 anos. A população resistente de milho Bt foi gentilmente cedida pelo Prof. Oderlei Bernardi da Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brasil correspondente à geração F₂₉ da população resistente (Bernardi et al., 2017, Garlet et al., 2022). Esta população resistente foi mantida sob pressão de seleção desde F₁ alimentando-se de milho Bt pelo menos a cada 2

gerações. No presente estudo, expusemos a população resistente ao milho Bt nas gerações F₅₃₋₅₉ e utilizamos a geração F₅₉ nos experimentos.

3.7. Extração do intestino médio e inibição de tripsinas digestivas de lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Para verificar a funcionalidade do SBTI recombinante produzido, ensaios de inibição de tripsina foram realizados utilizando o trato digestivo de lagartas de *S. frugiperda* de 5º ínstar suscetível ao milho Bt. Para isso, lagartas de *S. frugiperda* alimentando-se ativamente de dieta artificial à base de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*) (Truzzi et al., 2021) foram anestesiadas em gelo por 10 min. As lagartas foram inseridas em solução de NaCl 125 mM (4°C), suas cabeças e extremidades posteriores de seus corpos foram removidas e a dissecação do intestino médio foi feita após um corte longitudinal através dos tegumentos das lagartas. O intestino médio foi separado do intestino posterior por um corte transversal na inserção dos túbulos de Malpighi no intestino. O epitélio do intestino médio contendo a membrana peritrófica com seu conteúdo foi homogeneizado usando 3 movimentos de homogeneização em um homogeneizador Potter-Elvehjem em uma proporção de 3 intestinos médios por 600 µL de água deionizada. Os homogeneizados foram centrifugados (10.000xg, 10 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzimas digestivas (extrato enzimático).

A atividade da tripsina foi medida incubando-se 4 µL do extrato enzimático, 10 µL do inibidor (1 µg/µL, puro e diluído 10, 20, 30 e 50 vezes; 10 µL de água para reação de controle) e 36 µL de água a 37°C por 15 min em tubos Eppendorf. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e 160 µL de BApNA 1,0875 mM preparado em tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0 (Erlanger et al., 1961) foram adicionados a cada amostra. As placas foram incubadas a 30°C e as leituras espectrofotométricas foram feitas continuamente a 410 nm durante 1 h em intervalos de 30 s utilizando Multiskan Sky (ThermoScientific). Brancos de substrato e enzima foram incluídos para monitorar a formação de qualquer cor detectável em 410 nm não relacionada com os ensaios de tripsina. A atividade de tripsina foi calculada usando uma curva padrão de 4-nitroanilina (0 - 125 pmol/poço, $y = 0,0203x$, $R^2 = 0,9959$).

Uma unidade (U) de tripsina foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 pmol de 4-nitroanilina por minuto. Médias e erros padrão (EPM) foram obtidos a partir da atividade de tripsina calculada usando 3 extratos enzimáticos diferentes incubados com cada diluição de SBTI.

3.8. Mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt com ou sem SBTI

Milho Bt expressando proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 e seu híbrido de milho não Bt próximo de isogênico (híbrido Pioneer Brand 30A37RR, não Bt) foram plantados no campo (3 fileiras de 10 m de comprimento espaçadas por 90 cm de distância com 6 plantas por metro de cada híbrido de milho). As folhas foram coletadas nos estádios de crescimento V7-V9 e utilizadas para alimentação das lagartas de *S. frugiperda*. As folhas coletadas foram lavadas em banho de hipoclorito de sódio (0,025%) seguido de três lavagens com água deionizada. Após secagem superficial em temperatura ambiente, as folhas foram cortadas em discos (2 cm de diâmetro) colocados em recipientes cilíndricos de plástico (50 mL) contendo 1 mL de ágar 1% na base e um disco de papel filtro entre os discos foliares e o ágar. Cinco lagartas neonatas de *S. frugiperda* (menos de 24 horas após a eclosão) foram transferidas para cada recipiente e os recipientes foram tampados. Dois recipientes representaram uma repetição e 20 recipientes foram replicados para cada tratamento.

Para os tratamentos contendo SBTI, foram aplicados 10 µL de SBTI purificado (1 µg/µL) com pincel fino em cada lado do disco foliar (6,37 µg.cm⁻²). Os discos foliares tratados foram substituídos a cada 48 horas para evitar privação alimentar. Foram realizados os seguintes tratamentos:

- a) Lagartas resistentes + milho Bt + SBTI
- b) Lagartas resistentes + milho Bt
- c) Lagartas resistentes + milho não Bt
- d) Lagartas resistentes + milho não Bt + SBTI
- e) Lagartas suscetíveis + milho não Bt
- f) Lagartas suscetíveis + milho não Bt + SBTI
- g) Lagartas suscetíveis + milho Bt

A mortalidade e o peso larval das lagartas sobreviventes foram observados em 6 dias após o início da alimentação.

3.9. Atividade de tripsinas e fosfatases alcalinas digestivas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI

Para medição da atividade de tripsinas e fosfatases alcalinas digestivas, 30 neonatas de *S. frugiperda* resistentes e suscetíveis ao milho Bt foram transferidas individualmente para recipientes plásticos (70 mL) contendo 1 mL de ágar 1% no fundo, um disco de papel filtro sobre o ágar e os discos de folhas de milho Bt ou não Bt colocados acima dos discos de papel. As lagartas consumiram os tratamentos sem SBTI até atingirem o 5º ínstar. Neste estágio, as lagartas foram mantidas sem alimentação por 12 horas e a realimentação foi iniciada com os tratamentos contendo ou não SBTI conforme descrito anteriormente. As lagartas foram coletadas assim que os discos foliares foram consumidos e dissecadas para preparação dos extratos de enzimas digestivas conforme descrito no item 3.7.

A atividade da tripsina foi medida conforme descrito no item 3.7, trocando o volume de inibidor por água. A atividade da fosfatase alcalina foi medida usando 50 µL do extrato enzimático, 25 µL de 4-nitrofenil-fosfato 20 mM (pNPP) preparado em tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0 e 25 µL do mesmo tampão. As placas foram incubadas a 30°C e as leituras espectrofotométricas foram feitas continuamente a 405 nm durante 20 min em intervalos de 1 min utilizando Multiskan Sky (ThermoScientific). Brancos de substrato e enzima foram incluídos para monitorar a formação de qualquer cor detectável em 405 nm não relacionada com os ensaios de fosfatase alcalina. A atividade da fosfatase alcalina foi calculada utilizando uma curva padrão de 4-nitrofenol (0 - 32 nmol/poço, $y = 0,106x$, $R^2 = 0,9956$). Uma unidade (U) de fosfatase alcalina foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 nmol de 4-nitrofenol por minuto. A proteína total dos extratos enzimáticos foi estimada segundo Bradford (1976) conforme descrito no item 3.5. Médias e EPM foram obtidos de 10 réplicas independentes compostas pelo intestino médio de 3 lagartas expostas a cada tratamento alimentar.

3.10. Análises Estatísticas

Peso larval, mortalidade, atividade de tripsina e atividade de fosfatase alcalina foram testados para observação de distribuição normal e homocedasticidade utilizando, respectivamente, os testes de Cramer-von Mises e Bartlett ($\alpha = 0,05$). Os dados não enquadrados nessas premissas foram transformados pelo índice BoxCox. Os dados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e foram analisados por ANOVA ($\alpha = 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Todas as análises estatísticas foram feitas no software R (R Core Team, 2020).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão, solubilização e purificação do SBTI

A produção do SBTI foi alcançada usando *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. A expressão do SBTI foi observada de 1 a 4 horas de cultivo induzida por IPTG 100 μ M e a banda proteica do SBTI contendo a cauda de His apresentou o tamanho esperado de 22,49 kDa (Fig. 1A). O teste de solubilidade mostrou que a maior parte do SBTI foi produzida na forma insolúvel (Fig. 1B). Em função da necessidade de grandes quantidades de SBTI para bioensaios subsequentes, optou-se por solubilizar a proteína expressa de forma insolúvel utilizando um tampão de solubilização contendo 2 M de ureia e a solubilização foi bem sucedida (Fig. 1C). Após solubilização, o SBTI foi purificado utilizando resina “Ni Sepharose 6 Fast Flow” e eluído utilizando imidazol 100 e 250 mM (Fig. 1D).

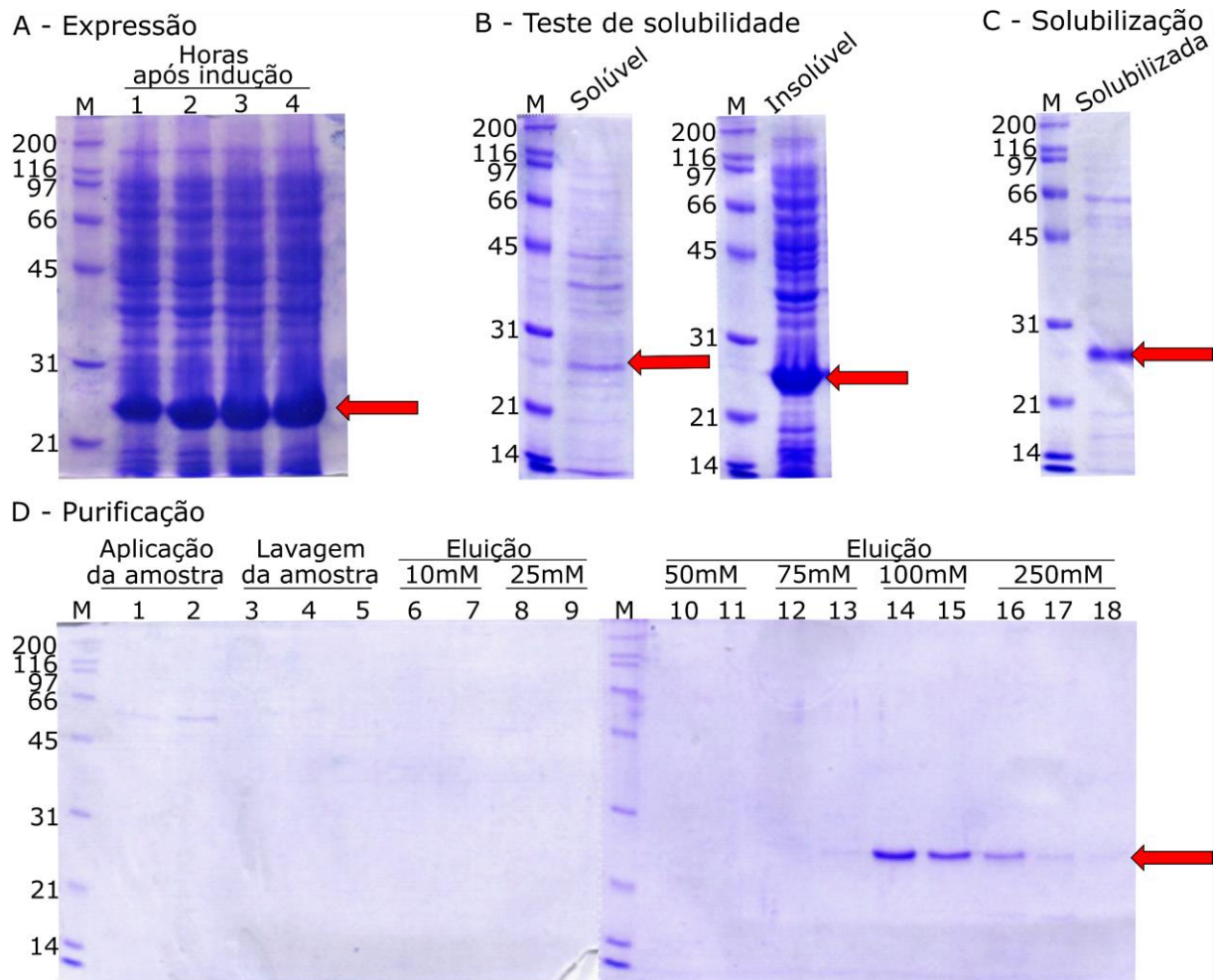


Figura 1 - Géis de SDS-PAGE 15% observados durante a produção do inibidor de tripsina de soja (SBTI) clonado no plasmídeo pET24a(+) utilizando expressão recombinante em *E. coli* BL21 DE(3) Codon Plus. **A** - Expressão de SBTI a 37°C em 1, 2, 3 e 4 h após a indução com 100 μ M IPTG. **B** - Teste de solubilidade para observar se o SBTI recombinante obtido em 4 h após a indução com 100 μ M de IPTG foi produzido nas formas solúvel ou insolúvel. **C** - Solubilização do SBTI insolúvel utilizando ureia 2 M. **D** - Purificação do SBTI solubilizado utilizando resina “Ni-Sepharose 6 Fast Flow” e eluição com imidazol 10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM. **M**: Padrões Biorad SDS-Page Broad Range (kDa). As setas vermelhas mostram a banda proteica do SBTI (22,49 kDa).

4.2. Atividade das tripsinas digestivas de *Spodoptera frugiperda* na presença de SBTI

O SBTI solubilizado, purificado (utilização apenas as frações eluídas com imidazol 100 mM) e dessalinizado foi analisado quanto à redução da atividade das tripsinas digestivas das lagartas de *S. frugiperda*. O SBTI reduziu a atividade das

tripsinas de forma dose-dependente ($F = 26,442$; $gl = 5,12$; $p < 0,001$), sendo a concentração de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ responsável pela inibição de aproximadamente 82% da atividade total da tripsina e a concentração de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para aproximadamente 32% de inibição da tripsina (Fig. 2).

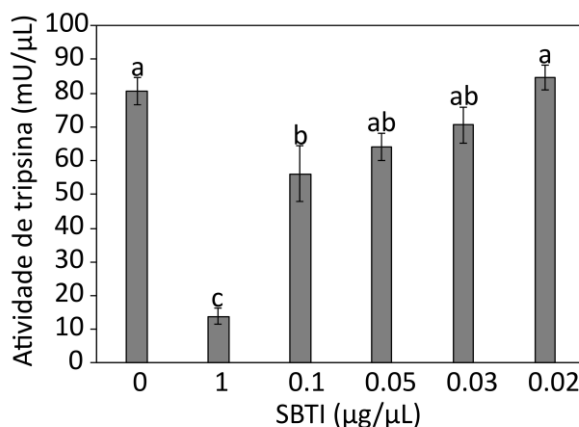


Figura 2 - Atividade de tripsinas digestivas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* na presença de diferentes concentrações de inibidor de tripsina de soja (SBTI). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3. Mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI

As taxas de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foram significativamente alteradas pela alimentação com os diferentes tratamentos ($F = 21,033$; $gl = 5,54$; $p < 0,001$). Todas as lagartas suscetíveis morreram ao serem alimentadas com milho Bt contendo SBTI ou não (100% de mortalidade, dados não apresentados). Lagartas resistentes alimentadas com milho Bt sem SBTI apresentaram uma taxa de mortalidade de cerca de 48%, valor similar ao observado para lagartas resistentes alimentadas com milho não Bt contendo SBTI (cerca de 30%). Independente da adição de SBTI, lagartas resistentes alimentadas com milho não Bt apresentaram uma taxa de mortalidade de cerca de 25%, valores semelhantes à mortalidade observada para lagartas suscetíveis alimentadas com milho não Bt contendo ou não o SBTI. Lagartas resistentes alimentadas com milho Bt foram impactadas pela adição de SBTI e apresentaram uma taxa de mortalidade mais elevada, ou seja, cerca de 85% (Fig. 3A).

O peso das lagartas sobreviventes medido aos 6 dias após o início da alimentação também diferiu entre os tratamentos ($F = 33,858$; $gl = 5,351$; $p < 0,001$). As lagartas resistentes sobreviventes alimentadas com milho Bt contendo SBTI apresentaram o peso mais baixo (cerca de 0,75 mg por lagarta), seguidas por lagartas resistentes alimentadas com milho Bt sem SBTI (cerca de 1,5 mg por lagarta). Quando alimentadas com milho não Bt com ou sem SBTI, as lagartas resistentes atingiram o maior peso (cerca de 3,5 mg por lagarta), peso superior ao observado para lagartas suscetíveis alimentadas com milho não Bt contendo ou não o SBTI (cerca de 2,5 mg por lagarta) (Fig. 3B).

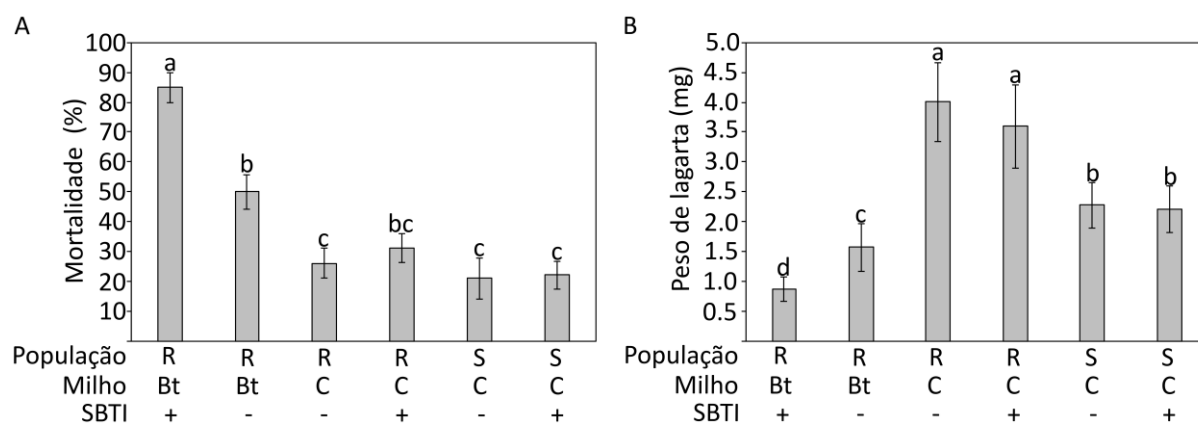


Figura 3 - Mortalidade (%) (A) e peso (mg por lagarta) (B) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes (R) ou suscetíveis (S) ao milho Bt alimentadas com milho Bt (Bt) ou milho não Bt (C) contendo (+) ou não (-) $6,37\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do inibidor de tripsina de soja (SBTI) aos 6 dias após o início da alimentação. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4. Efeitos do consumo de SBTI nas atividades de tripsinas e fosfatases alcalinas do intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistentes ou suscetíveis ao milho Bt alimentadas com milho Bt ou não Bt, com ou sem SBTI

A atividade das tripsinas do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* foi influenciada pelos tratamentos ($F = 17,092$; $gl = 5,50$; $p < 0,001$). A adição de SBTI às folhas de milho não Bt resultou no aumento da atividade de tripsinas digestivas de lagartas resistentes e suscetíveis ao milho Bt. O único caso em que a atividade da tripsina não aumentou após a adição de SBTI foi em lagartas resistentes alimentadas

com milho Bt. Lagartas resistentes alimentadas com milho Bt contendo SBTI apresentaram valores de atividade de tripsina semelhantes aos observados para lagartas resistentes alimentadas com milho não Bt sem SBTI e lagartas suscetíveis alimentadas com milho não Bt e sem SBTI (Fig. 4A).

A atividade das fosfatases alcalinas do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* foi influenciada pelos tratamentos ($F = 3,1434$; $gl = 5,53$; $p = 0,015$). A atividade da fosfatase alcalina em lagartas resistentes alimentadas com milho Bt contendo SBTI (cerca de 0,15 mU/ μ L) foi inferior à observada em lagartas resistentes alimentadas com milho Bt sem SBTI (cerca de 0,20 mU/ μ L) (Fig. 4B).

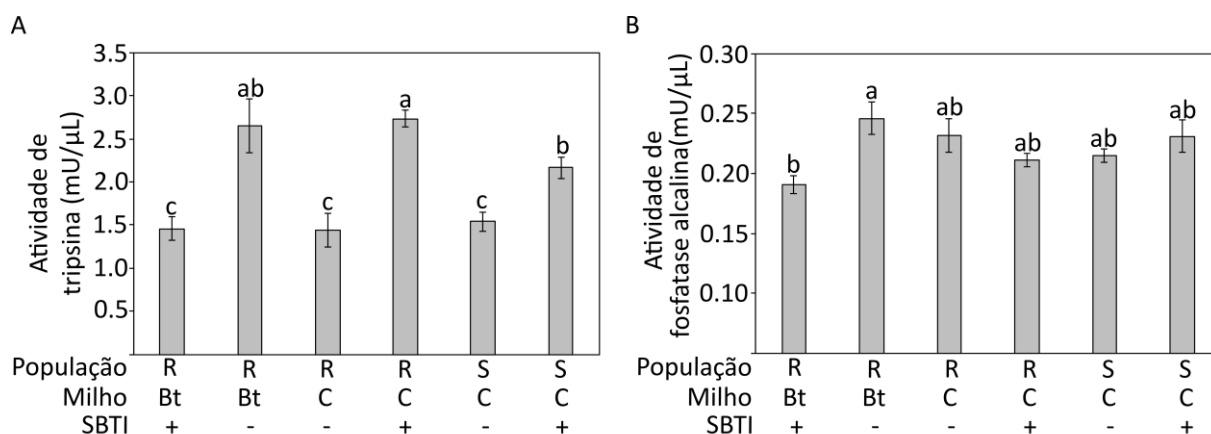


Figura 4 - Atividade de tripsina (A) e fosfatase alcalina (B) no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de 5^o ínstar resistente (R) ou suscetível (S) ao milho Bt alimentadas com milho Bt (Bt) ou milho não Bt (C) contendo (+) ou não (-) 6,37 μ g/cm² de inibidor de tripsina de soja (SBTI). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Semelhante ao observado no presente trabalho para a população de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt, lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, [1808]) (Lepidoptera: Noctuidae) apresentaram taxas reduzidas de crescimento e sobrevivência ao ingerir uma dieta artificial contendo tecido foliar de soja Cry1Ac combinado com um inibidor de tripsinas (Lomate e Hivrale, 2013). As tripsinas são proteases chave envolvidas na digestão de lagartas de lepidópteros, tendo um papel significativo na digestão primária de proteínas (Srinivasan et al., 2006; Lima et al.,

2020). O bloqueio da atividade da tripsina utilizando inibidores de tripsina, como o SBTI, pode resultar em efeitos negativos na nutrição de aminoácidos e, consequentemente, no desenvolvimento de insetos (Macedo et al., 2010; Macedo e Freire, 2011; Zhu-Salzman e Zeng, 2015; Meriño-Cabrera et al., 2020).

No entanto, o uso de inibidores de tripsina para o manejo de pragas deve ser avaliado caso a caso, visto que alguns insetos pragas, como as lagartas de *S. frugiperda*, podem superar a ingestão de inibidores de tripsina aumentando a atividade da tripsina (Oliveira et al., 2013) ou expressando tripsinas insensíveis ao inibidor de tripsina (Souza et al., 2016). De maneira similar à ingestão de SBTI, a ingestão de proteínas Cry presentes no milho Bt pela população resistente de *S. frugiperda* resultou no aumento da atividade de tripsinas no intestino das lagartas resistentes. Esse aumento na atividade de tripsinas pode resultar em hidrólise excessiva e inativação das proteínas Cry, mas esta hipótese necessita de novas investigações.

Em termos da redução da resistência observada para lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao milho Bt que ingeriram milho Bt contendo SBTI, sugere-se que os efeitos de desnutrição conferidos pelo SBTI podem estar dificultando as respostas de resistência desta população de *S. frugiperda* ao milho Bt. Um possível mecanismo de resistência observado em insetos resistentes a proteínas Cry é uma rápida regeneração dos tecidos do intestino médio, uma resposta que consome nutrientes (Castagnola and Jurat Fuentes, 2016; Jurat-Fuentes et al., 2021). Embora insetos resistentes bem nutridos possam consumir e desenvolver-se corretamente quando alimentados com plantas Bt, os insetos resistentes desnutridos que consomem SBTI podem não ter reservas nutritivas suficientes para responder ao consumo de plantas Bt.

Outro papel das proteases digestivas pode ser a desintoxicação através da hidrólise excessiva de proteínas inseticidas como Cry1 e Cry2 pelos insetos resistentes (Keller et al., 1996; Abdelgaffar et al., 2019; Pinos et al., 2021). Neste caso, o SBTI pode estar contribuindo para a redução da suposta desintoxicação. Táticas para redução na atividade de proteases no intestino médio de insetos pragas utilizando inibidores (Kirouac et al., 2006; Yang et al., 2021) ou RNAi para reduzir a expressão de uma protease digestiva (Guan et al., 2017) resultaram na prevenção da

proteólise excessiva e consequente redução da desintoxicação de proteínas inseticidas Cry.

O aumento da atividade da tripsina em lagartas de lepidópteros como resposta à ingestão da proteína inseticida Cry foi observado anteriormente (Lomate e Hivrale, 2013). No presente trabalho, lagartas suscetíveis e resistentes ao milho Bt responderam à ingestão de SBTI aumentando a atividade da tripsina de forma semelhante ao observado por Oliveira et al. (2013). Um aumento semelhante na atividade da tripsina também foi observado em lagartas resistentes ao milho Bt respondendo à ingestão de milho Bt sem SBTI, sugerindo que o aumento na atividade da tripsina é uma resposta comum destas lagartas à ingestão de xenobióticos. No entanto, ao consumir as proteínas SBTI e Cry do milho Bt em combinação, a atividade da tripsina não aumentou e as taxas de mortalidade da população resistente de *S. frugiperda* atingiram aproximadamente 85%, com insetos sobreviventes com uma redução pronunciada no peso. Em conjunto, estes dados sugerem que a falta de resposta na atividade de tripsina das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt contendo com SBTI está envolvida com altas taxas de mortalidade da população resistente.

As fosfatases alcalinas ligadas à membrana das células do epitélio são conhecidas como receptores para proteínas Cry durante as etapas de intoxicação em insetos suscetíveis (Bravo et al., 2013) e a redução na atividade da fosfatase alcalina ligada à membrana das células do epitélio em insetos resistentes a Cry foi associada a mecanismos de resistência (Jurat-Fuentes et al., 2011; Guo et al., 2015). Além disso, insetos pragas resistentes às proteínas Cry podem apresentar alterações no posicionamento das fosfatases alcalinas, passando de ligadas à membrana das células do epitélio para formas solúveis (Hernández-Martínez et al., 2010; Caccia et al., 2012). No presente trabalho não foram observadas alterações significativas na atividade das fosfatases alcalinas solúveis nos insetos resistentes quando comparados com insetos suscetíveis, sugerindo que a alteração da forma ligada à membrana para a forma solúvel da fosfatase alcalina não é um mecanismo de resistência da população de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt avaliada no presente estudo.

A combinação de SBTI com proteínas Cry poderia resultar em um efeito antagônico na mortalidade larval, visto que as proteínas inseticidas Cry requerem a ativação por tripsinas (Bravo et al., 2007). No entanto, este efeito antagônico dado por uma redução das taxas de ativação de pro-proteínas Cry não foi observado provavelmente porque a proteína Cry1F expressa no milho Bt utilizado no presente trabalho é expressa em uma forma truncada já ativada (Baktavachalam et al., 2015). Este fato reforça a sugestão de que as deficiências nutricionais causadas pelo SBTI podem ter sido responsáveis pela redução da resistência observada na população resistente ao milho Bt.

Eventos transgênicos comerciais desenvolvidos com a combinação de proteínas inseticidas Cry1Ac e um inibidor de tripsina do feijão-caupi foram desenvolvidos para arroz (Han et al., 2006) e algodão com melhorias na eficácia de controle de pragas (Cui et al., 2011). Os efeitos do SBTI sobre o aumento da suscetibilidade de uma população de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt são apresentados no presente trabalho e as informações produzidas podem contribuir para o desenvolvimento de novas plantas transgênicas com atividade inseticida bem como no manejo da resistência de insetos a plantas transgênicas.

6. CONCLUSÃO

O inibidor de tripsina da soja SBTI quando associado com a planta transgênica que expressa as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 reduz a resistência da população resistente de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

Abd El-latif AO (2014) In vivo and in vitro inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 116:40-48.

Abdelgaffar HM, Oppert C, Sun X, Monserrate J, Jurat-Fuentes JL. Differential heliothine susceptibility to Cry1Ac associated with gut proteolytic activity (2019) **Pesticide Biochemistry and Physiology** 153:1-8.

Aljbory Z, Chen MS (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science** 25:2-23.

Angus TA (1964) The biochemistry and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Berliner and its varieties. **Entomophaga** 7:165–173.

Areal FJ, Riesgo L, Rodriguez-Cerezo E (2013) Economic and agronomic impact of commercialized GM crops: A meta-analysis. **The Journal of Agricultural Science** 151:7-33.

Bakail M, Ochsenbein F (2016) Targeting protein-protein interactions, a wide open field for drug design. **Comptes Rendus Chimie** 19(1-2):19-27.

Baktavachalam GB, Delaney B, Fisher TL, Ladics GS, Layton RJ, Locke ME, Schmidt J, Anderson JA, Weber NN, Herman RA, Evans SL (2015) Transgenic maize event TC1507: Global status of food, feed, and environmental safety. **GM Crop Food** 6(2):80-102.

Barros EM, Torres JB, Bueno AF (2010) Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology** 39(6):996-1001.

Bendre AD, Ramasamy S, Suresh CG (2018) Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. **International Journal of Biological Macromolecules** 113:933-943.

Bernardi D, Bernardi O, Horikoshi RJ, Salmeron E, Okuma DM, Farias JR, Nascimento ARB, Omoto C (2017) Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize technology. **Crop Protection** 94:64-68.

Blanco CA, Chiaravalle W, Dalla-Rizza M, Farias JR, García-Degano M, Gastaminza G, Mota-Sánchez D, Múrua MG, Omoto C, Pieralisi BK, Rodríguez J, Rodríguez-Maciel JC, Terán-Santofimio H, Terán-Vargas AP, Valencia SJ, Willink E (2016) Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion Insect Science** 15:131-138.

Boaventura D, Ulrich J, Lueke B, Bolzan A, Okuma D, Gutbrod O, Geibel S, Zeng Q, Dourado PM, Martinelli S, Flagel L, Head G, Nauen R (2020) Molecular characterization of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* from Brazil. **Insect Biochemistry Molecular Biology** 116:103280

Boddupalli P, Suresh LM, Mwatuni F, Beyene Y, Makumbi D, Gowda M, Olsen M, Hodson D, Worku M, Mezzalama M, Molnar T, Dhugga KS, Wangai A, Gichuru L, Angwenyi S, Alemayehu Y, Grønbech-Hansen J, Lassen P (2020) Maize lethal necrosis (MLN): Efforts toward containing the spread and impact of a devastating transboundary disease in sub-Saharan Africa. **Virus Research** 282:197943.

Bode W, Huber R (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry** 204(2):433-451.

Bolognesi R, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C (2001) The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 43:62-75.

Bolognesi R, Terra WR, Ferreira C (2008) Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: Theoretical and experimental models. **Journal of Insect Physiology** 54:1413-1422.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72(1-2):248-254.

Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49(4):423-435.

Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M (2013) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology** 6(1):17-26.

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 41(7):423-431.

Brix K, Stöcker W (Eds.) (2013) **Proteases**: structure and function. Vienna: Springer, 568p.

Brookes G, Barfoot P (2020).GM crop technology use 1996–2018: Farm income and production impacts. **GM Crops & Food** 11:242-261.

Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology** 12:168-180.

Brunelle F, Cloutier C, Michaud D (2004) Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 55(3):103-113.

Burdon JJ, Zhan J (2020) Climate change and disease in plant communities. **PLoS Biology** 18:e3000949.

Caccia S, Moar WJ, Chandrashekhar J, Oppert C, Anilkumar KJ, Jurat-Fuentes JL, Ferré J (2012) Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. **Applied Environmental Microbiology** 78(16):5690-5698.

Castagnola A, Jurat-Fuentes JL (2016) Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. **Current Opinion Insect Science** 15:104-110.

Chae H, Wen Z, Hootman T, Himes J, Duan Q, McMath J, Ditillo J, Sessler R, Conville J, Niu Y, Matthews P, Francischini F, Huang F, Bramlett M (2022) eCry1Gb.1lg, a novel chimeric Cry protein with high efficacy against multiple fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) strains resistant to different GM traits. **Toxins** 14(12): 852.

Cingel A, Savić J, Lazarević J, Ćosić T, Raspor M, Smigocki A, Ninković S (2017) Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development. **Insect Science** 24(5):768-780.

CONAB 2023 - Companhia nacional de abastecimento. Brasília: Acompanhamento de safra brasileira de grãos, v. 10 - Safra 2022/2023: décimo segundo levantamento, 2023. p. 110.

Cotabarren J, Lufrano D, Parisi MG, Obregón WD (2020) Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science** 292:110398.

Cui J, Luo J, Van Der Werf W, Ma Y, Xia J (2011) Effect of pyramiding Bt and CpTI genes on resistance of cotton to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology** 104(2): 673-684.

Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 186: 107438.

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean D (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews** 62(3): 807-813.

De Groote H, Kimenju SC, Munyua B, Palmas S, Kassie M, Bruce A (2020) Spread and impact of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) in maize production areas of Kenya. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 292:106804.

DEPARTAMENTO DO AGRONEGÓCIO DA FIESP. Safra mundial do milho 2022/2023, 1º levantamento do USDA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), 2023. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/>> Acesso em: 09 outubro 2023.

Emani C (Ed.) (2018) The biology of plant-insect interactions: a compendium for the plant biotechnologist. CRC Press, 236p.

Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, Mottaleb K, Prasanna BM (2022) Global maize production, consumption and trade: Trends and R&D implications. **Food Security** 14(5):1295-1319.

Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 95(2):271-278.

Fan SG, Guo-Jiang WU (2005) Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** 46:273-292.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150-158.

Fatoretto JC, Michel AP, Silva Filho MC, Silva N (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management** 8(1):17.

Fescemyer HW, Sandoya GV, Gill TA, Ozkan S, Marden JH, Luthe DS (2013) Maize toxin degrades peritrophic matrix proteins and stimulates compensatory transcriptome responses in fall armyworm midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43(3):280-291.

Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR (1994) Digestive enzymes in midgut cells, endo-and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 26(4), 299-313.

Fuzita FJ, Palmisano G, Pimenta DC, Terra WR, Ferreira C (2022) A proteomic approach to identify digestive enzymes, their exocytic and microapocrine secretory routes and their compartmentalization in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology** 257: 110670.

García-Lara S, Serna-Saldivar SO (2019) Corn history and culture. **Corn**, 3:1-18.

Garlet CG, Muraro DS, Godoy DN, Cossa GE, Hanich MR, Stacke RF, Bernardi O (2022) Assessing fitness costs of the resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to pyramided Cry1 and Cry2 insecticidal proteins on different host plants. **Bulletin of Entomological Research** 112(5):575-583.

Ge L, Xu Y, Jiang X, Xia W, Jiang Q (2016) Broad-spectrum inhibition of proteolytic enzymes by allicin and application in mitigating textural deterioration of ice-stored grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets. **International Journal of Food Science & Technology** 51:902-910.

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M (2016) First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. **PLoS ONE** 11:e0165632.

Gog L, Vogel H, Hum-Musser SM, Tuter J, Musser RO (2014). Larval *Helicoverpa zea* transcriptional, growth and behavioral responses to nicotine and *Nicotiana tabacum*. **Insects** 5(3):668-688.

Gomes, MTR, Oliva, ML, Lopes, MTP, Salas, CE (2011) Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. **Current Protein and Peptide Science** 12(5):417-436.

González-Cabrera J, García M, Hernández-Crespo P, Farinós GP, Ortego F, Castañera P (2013) Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1Ab protein activation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43:635-643.

Govind G, Mittapalli O, Griebel T, Allmann S, Böcker S, Baldwin IT (2010) Unbiased transcriptional comparisons of generalist and specialist herbivores feeding on progressively defenseless *Nicotiana attenuata* plants. **PLoS One** 5(1):e8735.

Grote U, Fasse A, Nguyen TT, Erenstein O (2021) Food security and the dynamics of wheat and maize value chains in Africa and Asia. **Frontiers in Sustainable Food Systems** 4:617009.

Guan R, Li H, Miao X (2017) RNAi pest control and enhanced BT insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*. **Journal of Pest Science** 90(2):745-757.

Gullan PJ, Cranston OS (Eds.) (2014) The Insects: An Outline of Entomology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 624p.

Guo Z, Kang S, Chen D, Wu Q, Wang S, Xie W, Zhu X, Baxter SW, Zhou X, Jurat-Fuentes JL, Zhang Y (2015) MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. **PLoS Genetics** 11(4):e1005124.

Hafeez M, Li XW, Zhang JM, Zhang ZJ, Huang J, Wang LK, Khan MM, Shah S, Fernández-Grandon GM, Lu YB (2021) Role of digestive protease enzymes and related genes in host plant adaptation of a polyphagous pest, *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science** 28(3):611-626.

Han LZ, Wu KM, Peng YF, Wang F, Guo YY (2006) Evaluation of transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI against *Chilo suppressalis* and intrapopulation variation in susceptibility to Cry1Ac. **Environmental Entomology** 35(5):1453-1459.

Hannay CL (1953) Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. **Nature** 172(4387):1004-1004.

Haq SK, Atif SM, Khan RH (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 431(1):145-159.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology** 54:285-302.

Hellinger R, Gruber CW (2019) Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today** 24(9):1877-1889.

Herde M, Howe GA (2014) Host plant-specific remodeling of midgut physiology in the generalist insect herbivore *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 50:58-67.

Hernández-Martínez P, Navarro-Cerrillo G, Caccia S, Maagd RA, Moar WJ, Ferré J, Escrache B, Herrero S (2010) Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS One** 5(9):e12795.

Hughes J, Vogler AP (2006) Gene expression in the gut of keratin-feeding clothes moths (*Tineola*) and keratin beetles (*Trox*) revealed by subtracted cDNA libraries. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 36:584-592.

ISAAA. 2019. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019**: Biotech Crops Drive SocioEconomic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. ISAAA Brief No. 55. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA. 2021. **Breaking Barriers with Breeding**: A Primer on New Breeding Innovations for Food security. ISAAA Brief No. 56. ISAAA: Ithaca, NY.

Jamal F, Pandey PK, Singh D, Ahmed W (2015) A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. **Process Biochemistry** 50(2):311-316.

Joanitti GA, Freitas SM, Silva LP (2006) Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition** 2:199-217.

Jongsma MA, Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology** 43(10):885-895.

Jurat-Fuentes JL, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10.

Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J (2021) Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 66:121-140.

Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning C, Liu C, Wu K, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, Perera O, Adang M (2011) Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One** 6(3):e17606.

Kaysser L (2019) Built to bind: biosynthetic strategies for the formation of small-molecule protease inhibitors. **Natural Product Reports** 36(12):1654-1686.

Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prudovsky E, Regev A, Koncz C, Schell J, Zilberstein A (1996) Digestion of δ -entotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26(4):365-373.

Kirouac M, Vachon V, Quievy D, Schwartz JL, Laprade R (2006) Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. **Applied Environmental Microbiology** 72(1):506-515.

Krishna VV, Lantican MA, Prasanna BM, Pixley K, Abdoulaye T, Menkir A, Bänziger M, Erenstein O (2021) **Impacts of CGIAR Maize Improvement in sub-Saharan Africa, 1995-2015**. México: CIMMYT 44p.

Lacey LA (2017) Entomopathogens used as microbial control agents. In.: Lacey LA (Ed.) **Microbial control of insect and mite pests**. London: Academic Press, p. 3–12.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.

Lawrence PK, Koundal KR (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology** 5(1):5-6.

Lei Y, Zhu X, Xie W, Wu Q, Wang S, Guo Z, Xu B, Li X, Zhou X, Zhang Y (2014) Midgut transcriptome response to a Cry toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Gene** 533(1):180-187.

Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry** 43(3):305-341.

Lima LR, Dias RO, Fuzita FJ, Ferreira C, Terra WR, Silva-Filho MC (2020) The evolution, gene expression profile, and secretion of digestive peptidases in lepidoptera species. **Catalysts** 10(2):217.

Lomate PR, Hivrale VK (2013) Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin and protease inhibitor on growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) **Pesticide Biochemistry and Physiology** 105(2):77-83.

Macedo MLR, Diz Filho EB, Freire MGM, Oliva MLV, Sumikawa JT, Toyama MH, Marangoni S (2011) A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. **The Protein Journal** 30, 9-19.

Macedo MLR, Durigan RA, Silva DS, Marangoni S, Machado MF, Parra JRP (2010) *Adenanthra pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 73(4):213-231.

Macedo MLR, Freire MGM (2011) Insect digestive enzymes as a target for pest control. **Invertebrate Survival Journal** 8:190-198.

Mazumdar-Leighton S, Babu CR, Bennett J (2000) Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30:57-68

McFarlane JE (1985) Nutrition and digestive organs. In.: Blum MS (Ed.) *Fundamentals of Insect Physiology*. New York: John Wiley and Sons, p. 59–89.

Mekonnen MM, Gerbens-Leenes W (2020) The water footprint of global food production. **Water** 12:2696.

Meriño-Cabrera Y, Mendes TAO, Castro JG, Barbosa SL, Macedo ML, Oliveira MGA (2020) Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatilis* trypsins by *Adenanthra pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. **Archives of Insect Biochemistry Physiology** 104(3):e21687

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JÁ, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology** 26(2):286-300.

Morris ML (Ed) (1998) *Maize Seed Industries in Developing Countries*. Colorado: Lynne Rienner Publishers, 401p.

Muhlia-Almazán A, Sánchez-Paz A, García-Carreño FL (2008) Invertebrate trypsins: a review. **Journal of Comparative Physiology B** 178:655-672.

Murdock LL, Brookhart G, Dunn PE, Foard DE, Kelley S, Kitch L, Shade RE, Shukle RH, Wolfson JL (1987) Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** 87(4):783-787.

Nascimento J, Goncalves KC, Dias NP, de Oliveira JL, Bravo A, Polanczyk RA (2022) Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control** 165:104792.

Navon A (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection-reality and prospects. **Crop Protection** 19(8-10):669-676.

Oliveira CFR, Souza TP, Parra JRP, Marangoni S, Silva-Filho MC, Macedo MLR (2013) Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 165(1):19-25.

Oliveira-Neto OB, Batista JAN, Rigden DJ, Fragoso RR, Silva RO, Gomes EA, Franco OL, Dias SC, Cordeiro CMT, Monnerat RG, Grossi-de-Sá MF (2004) A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:903-918.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72(9):1727-1736.

Pérez-Hedo M, López C, Albajes R, Eizaguirre M (2012) Low susceptibility of non-target Lepidopteran maize pests to the Bt protein Cry1Ab. **Bulletin of Entomological Research** 102:737-743.

Pinos D, Andrés-Garrido A, Ferré J, Hernández-Martínez P (2021) Response mechanisms of invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 85(1): e00007-20.

Polya GM (2003) Protein and non-protein protease inhibitors from plants. **Studies in Natural Products Chemistry** 29:567-641.

Poole N, Donovan J, Erenstein O (2021) Agri-nutrition research: Revisiting the contribution of maize and wheat to human nutrition and health. **Food Policy** 100:101976.

Pym A, Singh KS, Nordgren Å, Davies TGE, Zimmer CT, Elias J, Slater R, Bass C (2019) Host plant adaptation in the polyphagous whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, is associated with transcriptional plasticity and altered sensitivity to insecticides. **BMC Genomics** 20:996.

R Core Team (2020) **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research** 42(D1):D503-D509.

Ribeiro JM, Genta FA, Sorgine MH, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-Silva GO, Majerowicz D, Medeiros M, Koerich L, Terra WR, Ferreira C, Pimentel AC, Bisch PM, Leite DC, Diniz MMP, Junior JLSGV, Da Silva ML, Araujo RN, Gandara ACP, Brosnon S, Salmon D, Bousbata S, González-Caballero N, Silber AM, Alves-Bezerra M, Gonsim KC, Silva-Neto MAC, Atella GC, Araujo H, Dias FA, Polycarpo C, Vionette-Amaral RJ, Fampa P, Melo ACA, Tanaka AS, Balczun C, Oliveira JHM, Gonçalves RLS, Lazoski C, Rivera-Pomar R, Diambra L, Schaub GA, Garcia ES, Azambuja P, Braz GRC, Oliveira PL (2014) An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 8(1):e2594.

Roy A, Walker WB, Vogel H, Chattington S, Larsson MC, Anderson P, Heckel DG, Schlyter F (2016) Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 71:91-105.

Ruan J, Yan J, Chen H, Jianping C, Sun W, Zhao G (2017) Purification and properties of the chymotrypsin inhibitor from wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) of Israel and its toxic effect on beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 142:141-147.

Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 28(1):425-449.

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344p.

Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal** 9(3):283-300.

Sena Jr DG, Pinto FAC, Queiroz DM, Viana PA (2003) Fall armyworm damaged maize plant identification using digital images. **Biosystems Engineering** 85(4):449-454.

Shamsi TN, Parveen R, Afreen S, Azam M, Sen P, Sharma Y, Haque QMR, Fatme T, Manzoor N, Fatima S (2018) Trypsin inhibitors from *Cajanus cajan* and *Phaseolus limensis* possess antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activity. **Journal of Dietary Supplements** 15(6):939-950.

Shiferaw B, Prasanna B, Hellin J, Banziger M (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security** 3:307-327.

Shu Y, Du Y, Wang J (2019) Presence of Cry1Ab in the Bt maize-aphid (*Rhopalosiphum maidis*)-ladybeetle (*Propylea japonica*) system has no adverse effects on insect biological parameters. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 167:553-560.

Simon JC, d'Alençon E, Guy E, Jacquin-Joly E, Jaquiery J, Nouhaud P, Peccoud J, Sugio A, Streiff, R (2015) Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. **Briefings in Functional Genomics** 14(6):413-423.

Singh S, Singh A, Kumar S, Mittal P, Singh IK (2020) Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science** 27(2):186-201.

Sisodiya DB, Raghunandan BL, Bhatt NA, Verma HS, Shewale CP, Timbadiya BG, Borad PK (2018) The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae); first report of new invasive pest in maize fields of Gujarat, India. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 6(5):2089-2091.

Souza TP, Dias RO, Castelhana EC, Brandao MM, Moura DS, Silva-Filho MC (2016) Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 196-197:67-73.

Sparks AN (1979) A review of the biology of the fall armyworm. **The Florida Entomologist** 62:82-87.

Sparks TC, Storer N, Porter A, Slater R, Nauen R (2021) Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance

Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. **Pest Management Science** 77(6):2609-2619.

Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS (2006) Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters** 11(1):132-154.

Stevens J, Dunse K, Fox J, Evans S, Anderson M (2012) Biotechnological approaches for the control of insect pests in crop plants. In.: Soundararajan RP (Ed.) **Pesticides: Advances in Chemical and Botanical Pesticides**. BoD – Books on Demand, p. 269-308.

Sun XX, Hu CX, Jia HR, Wu QL, Shen XJ, Zhao SY, Jiang YY, Wu KM (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture** 20(3):664-672.

Svobodová Z, Shu Y, Skoková HO, Romeis J, Meissle M (2017). Stacked Bt maize and arthropod predators: exposure to insecticidal Cry proteins and potential hazards. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 284:1-9.

Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology** 31:510-521.

Tabashnik BE, Carrière Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 35:926-925.

Telang MA, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS (2005) Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology** 51(5):513-522.

Terra WR (1996) Evolution and function of insect peritrophic membrane. **Ciência e Cultura** 48:317-332.

Terra WR, Ferreira C (2020) Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. **Arthropod Structure and Development** 56:100931.

Terra WR, Ferreira C (2009) Digestive system. In: Resh VH, Cardé RT (Eds.) **Encyclopedia of Insects**. San Diego, CA: Academic Press, p. 273-281.

Teufel F, Armenteros JJA, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology** 40:1023-1025.

Tripathi VR, Sahasrabuddhe AA, Kumar S, Garg SK (2014) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer. **Process Biochemistry** 49(2):347-355.

Truzzi CC, Vieira NF, Souza JM, De Bortoli SA. (2021) Artificial diets with different protein levels for rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science** 21(4):2.

Tyndall JDA, Nall T, Fairlie DP (2005) Proteases universally recognize beta strands in their active sites. **Chemical Reviews** 105:973-999.

Valueva TA, Mosolov VV (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry** 69:1305-1309.

Walsh KA, Wilcox PE (1970) Serine proteases. **Methods in Enzymology** 19:31-41

Yang YJ, Xu HX, Wu ZH, Lu ZX (2021) Effects of inhibitors on the protease profiles and degradation of activated Cry toxins in larval midgut juices of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Integrative Agriculture** 20(8):2195-2203.

Yaqoob A, Shahid AA, Samiullah TR, Rao AQ, Khan MAU, Tahir S, Mirza AS, Husnain T (2016) Risk assessment of Bt crops on the non-target plant-associated insects and soil organisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 96:2613-2619.

Zhu-Salzman K, Zeng R (2015) Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology** 60:233-252.