

Gabriel Braga Oliveira

**COMPARAÇÃO ENTRE A ABSORÇÃO DE VICILINAS DE
SEMENTES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DO FEIJÃO-DE-
CORDA, *VIGNA UNGUICULATA* PELO EPITÉLIO INTESTINAL
DE LARVAS DO CARUNCHO *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*
E O PROCESSAMENTO DE VICILINAS NO CORPO
GORDUROSO APÓS ABSORÇÃO.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação de Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Oliveira, Gabriel Braga

COMPARAÇÃO ENTRE A ABSORÇÃO DE VICILINAS DE
SEMENTES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DO FEIJÃO-DE-CORDA,
VIGNA UNGUICULATA PELO EPITÉLIO INTESTINAL DE LARVAS
DO CARUNCHO CALLOSOBRUCHUS MACULATUS E O
PROCESSAMENTO DE VICILINAS NO CORPO GORDUROSO APÓS
ABSORÇÃO. / Gabriel Braga Oliveira ; orientador, Carlos Peres Silva -
Florianópolis, SC, 2013.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de PósGraduação em
Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Vicilinas. 3. Callosobruchus
maculatus. 4. Endocitose. 5. Resistência. I. Silva, Carlos
Peres. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Circe Helena Braga Oliveira; meu pai Paulo Sergio Vieira Oliveira; minha avó Annacir Pereira Braga; meu irmão Daniel Braga Oliveira e minha noiva Grazielly Cristine Silva. Sem estas pessoas não conseguiria chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Carlos Peres Silva, pela oportunidade dada, sempre confiando em minha capacidade. Agradeço também por sua paciência, quanto ao conteúdo repassado, sua simplicidade, e acima de tudo seu apoio e orientação. Estes foram muito importantes para que eu continuasse seguindo em frente.

Aos professores do programa de pós-graduação de Bioquímica, por disponibilizar espaço, tempo e conhecimento.

Aos colegas de laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos: Daniel Alexandre, Daniela Faria Florêncio, Daniele Kunz, Ricardo Thomé Linhares, Roseane Panini e Mychelle Carneiro Santana.

Também a Tanara Vieira Peres do laboratório de Neuroquímica 3 do CCB e Giordano Gubert Viola pertencente ao laboratório de Neurotoxicologia pela ajuda e repasse de seus conhecimentos. Gostaria ainda de enfatizar a grande participação das duas Dani's do laboratório, Daniela Faria Florêncio e Daniele Kunz, pela ajuda nos experimentos realizados. Também pela grande amizade, companhia e risadas. Vocês fizeram com que tudo isso tivesse um valor maior.

Aos meus pais por serem meus eternos conselheiros e apoiadores, dando sempre todo carinho e atenção. Obrigado por me entenderem e suportarem meus momentos difíceis.

A minha noiva, pela enorme paciência. Por me ajudar, e por todos os momentos difíceis em que precisei de seu carinho e atenção. Você é muito especial.

Ainda gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o período do mestrado.

RESUMO

Os animais pertencentes à subfamília Bruchinae são os principais predadores das sementes de leguminosas, destacando-se pela especificidade da dieta alimentar, ocorrendo ao nível de gênero ou família. A espécie *Callosobruchus maculatus* (caruncho do feijão-de-corda) é o principal predador das sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) tanto no campo, quanto em grãos armazenados. O feijão-de-corda apresenta em sua composição uma família de proteínas multifuncionais chamadas de vicilinas (globulina 7S), possuindo uma massa molecular de aproximadamente 190 kDa. Linhagens de vicilinas variantes expressas em sementes de *V. unguiculata* vêm sendo associadas diretamente aos efeitos tóxicos causados nas larvas dos bruchídeos. Aqui relata-se o valor adaptativo envolvido na absorção das vicilinas e o mecanismo da resistência associado ao *C. maculatus*. O genótipo (IT81D-1053) de *V. unguiculata* mostrou-se resistente ao bruchídeo, *C. maculatus*, não havendo emergência de adultos no período de 90 dias, enquanto sementes suscetíveis apresentaram emergência média de $36,42 \pm 0,59$ dias. O destino das vicilinas foi acompanhado por microscopia de fluorescência, através de cortes por congelamento (criostato), após o período de alimentação com vicilina suscetível/FITC, vicilina variante/FITC e com faseolina/FITC (*Phaseolus vulgaris*), nota-se diferença no processo absorptivo entre as dietas testadas. O epitélio intestinal das larvas alimentadas com vicilina variante/FITC e faseolina/FITC apresentou maior quantidade de vicilina, detectado por fluorescência. Por microscopia eletrônica foi possível verificar a presença da proteína suscetível no interior das células do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus*. Isto evidencia que as vicilinas se ligam aos receptores de membrana das microvilosidades e posteriormente, são absorvidas, possivelmente por endocitose, chegando ao interior das células epiteliais do intestino médio das larvas. As moléculas de vicilinas contidas nas vesículas do epitélio intestinal são encaminhadas ao corpo gorduroso das larvas, de onde foram isoladas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de sacarose. As vicilinas foram caracterizadas parcialmente através da clivagem da vicilina 0,1% (m/m) utilizada como substrato. A caracterização das proteases foi feita a partir da hidrólise da vicilina, utilizando inibidores de proteases como EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), pepstatina A, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e E-64 (trans-epoxisuccinil 4-guanidino butano), dos inibidores testados, a Pepsatina A e PMSF inibiram o processamento da vicilina, sugerindo que ocorra uma combinação de enzimas,

possivelmente proteinases serínicas e aspárticas, atuando na hidrólise da vicilina. Com os resultados obtidos, busca-se comprovar o processo de endocitose presente na absorção de proteínas através do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus*, bem como comprovar a proteólise da vicilina pelas proteases.

Palavras-chave: Proteínas, Resistência, IT81D-1053, Endocitose.

ABSTRACT

The animals of the Bruchinae subfamily are the main predators of legume seeds, which are distinguished by the food diet restriction, occurring specificity on genus or family level. The cowpea beetle (*Callosobruchus maculatus*) is the main predator of the *Vigna unguiculata* seeds (cowpea) in the field and stored grains. These beans present in their composition a family of multifunctional proteins called vicilins (7S globulin), with around 190 kDa as molecular weight. Variant vicilins expressed in the seeds of *V. unguiculata* have been directly associated to the toxic effects caused in bruchid larvae. Here we report the adaptive value involved in the uptake of vicilin and resistance mechanisms associated with *C. maculatus*. The genotype (IT81D-1053) of *V. unguiculata* was resistant to bruchid (*C. maculatus*) without adult emergence in a period of 90 days, while susceptible seeds (fradinho) presented emergency of 36.42 ± 0.59 days on average. The fate of vicilin was followed by fluorescence microscopy, cutting the gel (cryostate), where bruchid the larvae are fed with vicilin susceptible/FITC, vicilin variant/FITC and phaseolin/FITC (from *Phaseolus vulgaris*) noticing the difference in the absorptive process. The intestinal epithelium of larvae fed on vicilin variant / FITC and phaseolin / FITC fluorescence showed a greater amount of vicilin. By using electron microscopy, it was possible to verify the presence of the susceptible vicilin (fradinho) in the cells of the intestinal epithelium of larval *C. maculatus*. Vicilins seem to bind to receptors in the membrane of the microvilli and subsequently are absorbed in the form of vesicles inside the cells of the epithelium of the gut of the larvae, and optionally mediated endocytosis. The vicilin molecules present in the vesicles formed in the intestinal epithelium are transferred to the fat body larvae, where they could be isolated by discontinuous sucrose gradient after ultracentrifugation. They were partially characterized using 0.1% (w / w) vicilin as the substrate in the presence or not of following inhibitors EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid), pepstatin A, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and E-64 (trans epoxisuccinil -4 guanidino-butane), wherein pepstatin A and PMSF inhibited the processing of vicilin, suggesting that it is a combination of enzymes, perhaps aspartic and serine proteinases, acting on the hydrolysis of vicilin. However, it was not possible to identify the mechanistic class which is responsible for initiating the process.

Key words: Protein, resistents, IT81D-1053, endocytosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Imagem do dimorfismo sexual de <i>Callosobruchus maculatus</i>	30
Figura 1.2 - Representação esquemática do ciclo de vida de carunchos pragas de feijões mostrando eventos da postura dos ovos à emergência de adultos.....	32
Figura 1.3 - Esquema representativo da espécie <i>Vigna unguiculata</i> e suas sementes.....	34
Figura 1.4 - Representação da estrutura quaternária da vicilina, <i>Vigna radiata</i> , onde cada cor representa uma subunidade da proteína.....	36
Figura 4.1 - Gráfico com o número de embriões viáveis que eclodiram do ovo para o interior do grão do feijão.....	49
Figura 4.2 - Tempo de desenvolvimento larval de <i>Callosobruchus maculatus</i> submetido a crescimento em diferentes feijões, suscetível (fradinho) e resistente (IT81D-1053).....	50
Figura 4.3 - Larvas de 1º instar de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e variante.....	51
Figura 4.4 - Larvas de 1º instar de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e faseolina.....	52
Figura 4.5 - Larvas de 4º instar de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e variante.....	53
Figura 4.6 - Larvas de 4º instar de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e faseolina.....	54
Figura 4.7 - Larva de 4º instar de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentada com vicilina variante marcada com FITC.....	55
Figura 4.8 - Imunohistoquímica de microseções do epitélio intestinal de <i>Callosobruchus maculatus</i> para detecção de vicilinas suscetíveis e suscetíveis/FITC.....	56
Figura 4.9 - Imagem das vesículas do corpo gorduroso obtidas através fracionamento celular por centrifugação diferencial.....	57

Figura 4.10 - Detalhe da distribuição do gradiente de sacarose nos tubos de ultracentrifugação	58
Figura 4.11 - Ensaio de pH ótimo das vesículas isoladas em gradiente de sacarose por ultracentrifugação.....	59
Figura 4.12 - Análise do padrão de bandas obtidas a partir das frações de vesículas isoladas do corpo gorduroso de <i>Callosobruchus maculatus</i>	60
Figura 4.13 - Time course da hidrólise da vicilina a partir de vesículas isoladas do corpo gorduroso de <i>Callosobruchus maculatus</i>	61
Figura 4.14 - Inibição da atividade proteolítica das vesículas isoladas do corpo gorduroso de <i>Callosobruchus maculatus</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – Albumina Sérica Bovina

E-64 – Trans-Epoxisuccinil 4-Guanidino Butano

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

PEP – Pepstatina A

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

SDS – Lauril Sulfato de Sódio

TEMED – Tetrametiletilenediamina

Tris – Tris (Hidroximetil) Aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Considerações Iniciais.....	19
1.2	Ordem Coleoptera.....	20
1.3	A relação entre as leguminosas (Fabaceae) e a subfamília dos carunchos (Chrysomelidae: Bruchinae).....	20
1.4	<i>Callosobruchus maculatus</i> , a principal praga dos grãos armazenados de <i>Vigna unguiculata</i>	21
1.5	Ciclo de vida de <i>C. maculatus</i>	22
1.6	O feijão-de-corda, <i>Vigna unguiculata</i> , e a sua importância social e econômica	25
1.7	Vicilinas, proteínas multifuncionais, desde o armazenamento de aminoácidos à proteção contra o ataque de insetos	26
1.8	Absorção de proteínas em intestino de insetos	30
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo Geral.....	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Colônia de Insetos	34
3.2	Experimento de Resistência de <i>V. unguiculata</i> ao <i>C. maculatus</i>	34
3.3	Alimentação de Larvas Usando Sementes Artificiais	34
3.4	Marcação de Vicilina com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína).....	35
3.5	Preparações das Amostras de Insetos para Microtomia.....	35
3.6	Preparações das Amostras em Criostato para Microscopia de Fluorescência	36
3.7	Microscopia Confocal	36
3.8	Imunomarcação (imunogold) do epitélio intestinal de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> com anticorpo anti-vicilina IgG	36
3.9	Isolamento de Vesículas Presentes no Corpo Gorduroso dos Insetos.....	37
3.10	Determinações de Proteínas.....	38
3.11	Eletroforeses em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (Lauril sulfato de sódio)	38
3.12	Coloração por Precipitação com Nitrato de Prata	39
3.13	Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos	39
4	RESULTADOS.....	41

4.1 Experimento de resistência de <i>Vigna unguiculata</i> ao <i>C. maculatus</i>	41
4.2 Análise da distribuição de vicilinas em órgãos internos das larvas de <i>C. maculatus</i>	42
4.3 Detecção de vicilina por imunomarcção no epitélio intestinal de larvas de <i>C. maculatus</i>	47
4.4 Isolamento de Vesículas Presentes no Corpo Gorduroso dos Insetos	48
4.5 Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos	50
5 DISCUSSÃO.....	55
5.1 Determinação da resistência da semente de <i>V. unguiculata</i> ao caruncho <i>C. maculatus</i>	55
5.2 Criostato e microscopia de fluorescência.....	56
5.3 Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos	57
6 CONCLUSÃO	59
7 PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A utilização das sementes por animais e conseqüentemente sua predação, foi observada quando o homem foi obrigado a armazenar estas sementes para posterior cultivo, onde preservá-las dos seus predadores naturais era de extrema importância (HARRINGTON, 1972). Estas observações ajudaram a ganhar maior importância quando os agricultores começaram a realizar diversos estudos sobre os grãos. Assim, a predação de sementes passou a ser importante em termos econômicos.

A principal predação acontece no período pré-colheita, onde ocorre o ataque às sementes e posteriormente na colheita e durante seu armazenamento (JANZEN, 1971 e 1980). O processo de predação de sementes por coleópteros é comum e geralmente ocorre em frutos maduros (LISBOA, 1975). Raríssimas espécies vegetais não sofrem ataques de insetos, geralmente são causadas por estágios larvais formados após a postura dos ovos no fruto. Assim, as lavas de insetos desenvolvem-se em sementes consumindo parte ou todo seu material de reserva. Este tipo de predação pode não ser constatado no momento da colheita, mas na secagem e armazenamento das sementes (KAGEWAYA & PIÑA-RODRIGUES, 1993). Algumas espécies de insetos herbívoros podem atacar sementes em pleno desenvolvimento, enquanto outras são comumente encontradas apenas em armazenamento de grãos (HOWE, 1972).

Por ser uma fonte concentrada de proteínas e minerais, as sementes, são utilizadas como recurso por uma ampla variedade de animais, em especial os insetos (JANZEN, 1971). Há amplo conhecimento da ocorrência de predação de sementes por insetos, principalmente por larvas de Diptera, Coleoptera e Lepidoptera, em várias famílias de plantas (CRAWLEY, 1992; SANTOS *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997). Dentre os principais predadores destas sementes estão algumas espécies de coleópteros pertencentes à subfamília Bruchinae, mais conhecidos como caruncho do feijão (MONTE, 1935; BONDAR, 1936; ARRUDA, 1950; VERNALHA, 1953; REGO, 1960; SANTOS *et al.*, 1985; SANTOS *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1996). Esta subfamília recebe maior destaque devido ao fato de seus representantes serem início da parte textual do trabalho. bastante restritivos quanto à dieta alimentar (BONDAR, 1936, HOWE, 1972; SOUTHGATE, 1979) podendo ocorrer especificidade nos níveis de gênero ou família de

plantas (JOHNSON, 1981). Desta forma, os carunchos assumem grande importância econômica, se reproduzindo apenas em sementes de leguminosas, tanto no campo como em armazenamento (HOWE, 1972; SOUTHGATE, 1979) e afetam profundamente a qualidade e a viabilidade das sementes chegando a comprometer sua germinação (SANTOS *et al.*, 1994; FIGUEIRA & CARVALHO, 2003).

1.2 Ordem Coleoptera

A ordem Coleoptera (LINNAEUS, 1758) é a maior das ordens de artrópodes, sendo considerada a maior do reino animal com $\frac{1}{4}$ de todas as espécies catalogadas (NAFRIA & DURANTE, 1985). Apresentando aproximadamente 330.000 espécies descritas (RICHARDS & DAVIES, 1984).

Segundo Pedrosa-Macedo (1989), num levantamento bibliográfico, constatou-se a existência de 435 espécies da Ordem Coleoptera, distribuídos em 24 famílias citadas como causadoras de danos em cerca de 190 espécies de árvores e arbustos nativos brasileiros e exóticos.

Os coleópteros são organismos polípagos apresentando uma relevante importância nos ecossistemas devido ao grande número de espécies fitófagas (LARA, 1991). Estes animais podem ocupar diversos habitats onde vivem em equilíbrio. Podem tanto ser utilizados como indicadores biológicos, sendo utilizados como predadores (GALLO *et al.*, 1988), ou causando perdas econômicas significativas em diversas culturas (FERRAZ *et al.*, 1998). Um grande número de espécies são considerados pragas agrícolas dos campos, enquanto outras atacam grãos armazenados.

1.3 A relação entre as leguminosas (Fabaceae) e a subfamília dos carunchos (Chrysomelidae: Bruchinae)

A subfamília Bruchinae abriga cerca de 1400 espécies de besouros, sendo agrupadas em 66 gêneros. Até recentemente os bruquídeos constituíam uma família a parte, dentro da superfamília Chrysomeloidea e os gêneros associados a este grupo ainda estão incluídos em subfamílias como: Amblycerinae, Eubaptinae, Kytorhininae, Pachymerinae e Rhaebinae (SOUTHGATE 1979; JOHNSON & ROMERO, 2004). Aproximadamente 80% das espécies de bruquídeos pertencem à subfamília Bruchinae, 10% na Amblycerinae, 9% na Pachymerinae, e os outros 1% distribuídas às outras três subfamílias,

Eubaptinae, Kytorhininae e Rhaebinae (JOHNSON & ROMERO, 2004).

A maioria das espécies desta subfamília vive em regiões tropicais da Ásia, África e Américas, Central e do Sul. Muitas espécies possuem status de praga na agricultura por colocarem seus ovos em grãos de importância econômica, consumindo valiosas proteínas. Já outras espécies destroem sementes de um imenso número de leguminosas silvestres (SOUTHGATE, 1979). Johnson em 1989 fez um levantamento das relações de infestações de bruquídeos e diferentes espécies de plantas no campo e constatou que os bruquídeos são importantes predadores de sementes de 35 famílias de plantas hospedeiras e, aproximadamente 85% das plantas hospedeiras registradas foram de leguminosas (Fabaceae).

As fêmeas da maioria das espécies da subfamília Bruchinae depositam seus ovos na superfície dos frutos e as larvas que eclodem penetram através do pericarpo e do tegumento das sementes até atingir os cotilédones. No entanto, larvas de muitos bruquídeos não escolhem seus hospedeiros, elas apenas se alimentam, crescem e emergem de sementes selecionadas pela fêmea para a postura (MITCHELL, 1975).

Esta subfamília é o maior exemplo de adaptação da vida em crescimento no interior de sementes. A maioria das espécies vive em sementes, especialmente de leguminosas e, na natureza, não há uma relação tão estreita entre um grupo de insetos e um grupo de plantas. (HOWE, 1972).

Como principal característica morfológica da subfamília de insetos Bruchinae, podemos citar a presença de élitros curtos que deixam desprotegida a extremidade do abdômen. O corpo é oval, com cabeça livre, rostro curto e achatado com antenas possuindo 11 segmentos (GALLO *et al.*, 1988). Indivíduos desta subfamília possuem olhos bem desenvolvidos, pernas posteriores mais robustas que as anteriores, tendo os fêmures espessos, às vezes as tíbias posteriores de algumas espécies apresentam-se com esporão distinto ou obsoleto (LIMA, 1955).

1.4 *Callosobruchus maculatus*, a principal praga dos grãos armazenados de *Vigna unguiculata*

O caruncho *C. maculatus*, conhecido em inglês como *cowpea weevil*, pertencente à ordem dos coleópteros, sendo considerado na agricultura um inseto praga. O *C. maculatus* é originário da África, porém, hoje é frequentemente encontrado nas regiões tropicais e

subtropicais do mundo, uma vez que a espécie foi propagada através do comércio (SOUTHGATE, 1979). Esta espécie, em particular, pertence à família Chrysomelidae e subfamília Bruchinae. Estes animais só se alimentam e crescem no interior das sementes de leguminosas (Fabaceae). Já os adultos desta espécie, não se alimentam ou necessitam de água, são chamados insetos áfagos. Seu tempo de vida, quando adulto, é relativamente curto, aproximadamente de duas a três semanas, dependendo das condições climáticas, passando boa parte desse tempo acasalando-se e realizando a postura de ovos nos feijões.

Esta espécie de besouro apresenta dimorfismo sexual, pois os indivíduos do sexo masculino e feminino apresentam características sexuais secundárias distintas (Figura 1.1). As fêmeas apresentam o abdômen maior e possuem uma cor mais escura em ambos os lados, enquanto os machos apresentam um abdômen menor e de cor clara (BROWN & DOWNHOWER, 1988). Além disso, as fêmeas possuem nos élitros uma marcação na forma de “x” de cor marrom.

Figura 1.1 Imagem do dimorfismo sexual de *Callosobruchus maculatus*. As fêmeas apresentam a região abdominal maior e uma cor mais escura, já os machos são menores mais claros e o abdômen é curto. a) inseto do sexo masculino. b) inseto do sexo feminino. Fonte: Pessoal



1.5 Ciclo de vida de *C. maculatus*

As fêmeas depois de fertilizadas ovopositam na superfície externa do feijão. Os ovos desta espécie são claros, possuem forma oval

e é firmemente aderida a superfície do feijão. Possuem aproximadamente 0,75 mm de comprimento. As larvas saem do ovo e passam para o cotilédone do feijão, com isso, a casca do ovo torna-se branco-opaco. Depois de se instalarem no cotilédone do feijão, as larvas se alimentam deste e sofrem uma série de ecdises, passando por quatro instares larvais, posicionando-se abaixo do tegumento do grão antes de tornarem-se pupas (pupação é a metamorfose completa do estágio larval para um adulto alado). Antes da pupação, as larvas formam a janela pupal erodindo a superfície interna do tegumento, de onde os adultos irão emergir ao final de sua metamorfose. Os adultos emergidos estão completamente maduros entre 24 e 36 horas após sua emergência. Assim, os machos procuram as fêmeas e as fecundam (EDVARDSSON & TREGENZARENZA, 2005). As fêmeas por sua vez, armazenam os espermatozoides dos machos em sua espermateca, estrutura do aparelho reprodutor feminino para armazenamento de esperma. A Figura 1.2 mostra um esquema geral do ciclo de vida dos carunchos que atacam leguminosas.

Figura 1.2 Representação esquemática do ciclo de vida de carunchos pragas de feijões mostrando eventos da postura dos ovos à emergência de adultos. Estes animais podem efetuar a postura dos ovos em grãos armazenados ou nas vagens de plantas que estão no campo, penetrando através do tegumento da semente até o cotilédone onde se desenvolvem, passando por quatro instar larvais, pré-pupa, pupa e emergindo como adulto alado. Fonte: Pessoaal

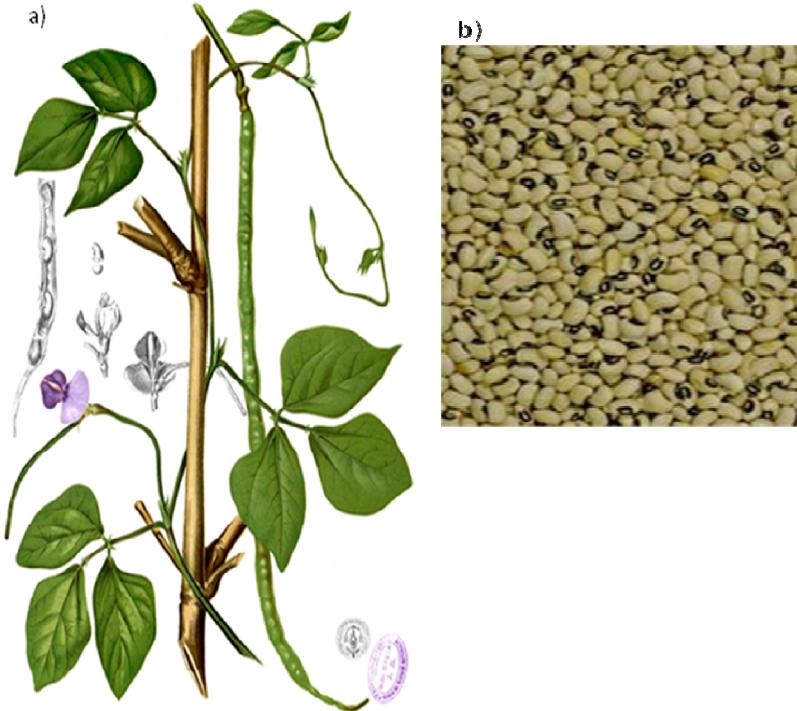


1.6 O feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*, e a sua importância social e econômica

A espécie *V. unguiculata*, também conhecida como feijão fradinho, feijão frade, feijão caupi, feijão macassar ou feijão-de-corda, pertence à família das leguminosas (Fabaceae). São plantas anuais que podem ser eretas ou trepadoras (Figura 1.3). Possuem caules estriados e glabrescentes, ou seja, tendem a perder os pelos que se dispõem em suas hastes. As folhas são trifolioladas, com apêndices nas bases dos pecíolos, sendo os dos laterais oblíquos em relação ao plano do folíolo central. As flores dispõem-se em pequenos grupos, semelhantes a cachos. O ovário é estrito e alongado, com os ovócitos distribuídos em linha, o que explica o comprimento da vagem. As flores se abrem apenas nas primeiras horas da manhã, não permitindo que a polinização por parte dos insetos ocorra frequentemente. Com isso, a autopolinização é frequente nesta espécie.

Originária da África onde teria se dispersado através do comércio para outras regiões de climas semelhantes. Hoje, junto com o arroz, constitui a dieta básica do brasileiro. Possui alto valor nutritivo (seja proteico ou energético) e também por ter uma fácil adaptação a solos de baixa fertilidade. O nordeste brasileiro é o maior produtor desta espécie no Brasil (SINGH et al., 2002), onde a colheita de suas vagens e seu consumo ocorre na época de plena maturação ou até mesmo antes, quando os grãos ainda estão verdes. As vagens são lisas e cilíndricas, com numerosas sementes. Estas podem ser encontradas desde a cor branca até uma cor amarelada. Possuem hilo de cor castanha ou negra, que permite a fácil identificação (Figura 1.3).

Figura 1.3 Esquema representativo da espécie *Vigna unguiculata* e suas sementes. a) características da planta como folhas trifolioladas, vagem e flor. b) grãos armazenados de *vigna unguiculata*. Fonte: pt.wikipedia.org. Acesso em 28/02/2013.



1.7 Vicilinas, proteínas multifuncionais, desde o armazenamento de aminoácidos à proteção contra o ataque de insetos

As proteínas mais abundantes em sementes de leguminosas são as globulinas, que compreendem as leguminas (11S) e as vicilinas (7S), que representam aproximadamente 80% das proteínas totais de sementes maduras. As globulinas de sementes, tipicamente classificadas como vicilinas consistem em uma combinação de subunidades com massa molecular que varia de 150 a 190 kDa (Figura 1.4). Nestas subunidades de vicilina, não há presença de pontes dissulfeto e a proteína é estabilizada por forças não covalentes.

Vicilinas são tradicionalmente conhecidas como proteínas de armazenamento de sementes, do tipo globulinas 7S, encontradas em sementes de leguminosas e várias outras plantas (SHUTOV *et al.*, 1995). Entretanto, desde os anos 90, funções adicionais foram inferidas a partir de suas relações filogenéticas ou propriedades químicas e experimentalmente confirmadas como atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 1993; MOTA *et al.*, 2003; PAES *et al.*, 2008), envolvimento em processos de dessecação/re-hidratação (BÄUMLEIN *et al.*, 1995; SHUTOV *et al.*, 1998), atividade de ligação de sacarose (BRAUN *et al.*, 1996) e atividade anti-microbiana (GOMES *et al.*, 1997; MARCUS *et al.*, 1999; NG, 2004; MANNERS, 2007). As vicilinas apresentam um alto grau de polimorfismo, no entanto, estas apresentam uma quantidade significativa de homologia em sua sequência e possuem semelhanças estruturais em suas conformações tridimensionais (LAWRENCE *et al.*, 1994; SHUTOV & KAKHOVSKAYA, 2011).

Essas proteínas possuem uma propriedade comum de armazenamento, são sintetizadas em níveis elevados e armazenadas em corpos proteicos, agindo como uma reserva de nitrogênio ou doando aminoácidos durante a germinação da planta. Algumas proteínas de armazenamento podem contribuir para mecanismos de defesa da semente, como verificado em cultivares resistentes de *V. unguiculata* a *C. maculatus* ou a ingestão de vicilinas por insetos não-adaptados (MACEDO *et al.*, 1993; YUNES *et al.*, 1998; MOTA *et al.*, 2003; PAES *et al.*, 2008).

Figura 1.4 Representação da estrutura quaternária da vicilina de *Vigna radiata*, apresentando três subunidades, onde a cor roxa representa duas subunidades idênticas e a cor amarela à subunidade diferente da proteína. Fonte: NCBI - PDB ID: 2CV6. Acesso em 28/02/2013.



Como sabemos, as sementes de feijão caupi são fortemente atacadas por *C. maculatus*, principalmente quando armazenados. Com isso, vem-se criando vários linhagens resistentes deste feijão ao inseto (SINGH, 1985). Podemos citar a linhagem TVu 2027, que deu origem a várias outras, como IT81D-1032, IT81D-1064 e IT81D-1045, mostrando diferentes níveis de resistência ao caruncho do feijão (SINGH & SINGH, 1990). A resistência conferida a estes feijões variantes foi atribuída a vários fatores, que na sua maioria, são de natureza química. Inicialmente Gatehouse e colaboradores (1979) propuseram que a resistência observada estava associada a altos

níveis de inibidores de tripsina nessas sementes. Entretanto, outros trabalhos não mostraram uma correlação entre os níveis de tripsina, de inibidores proteínases cisteínicas ou inibidores de α -amilases e a resistência a infestação destes insetos nas sementes (BAKER, 1989; XAVIER-FILHO *et al.*, 1989; FERNANDES *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1997). Posteriormente, estudos adicionais, sugeriram que a resistência observada nas sementes da linhagem variante IT81D-1045 está associada à forma variante da vicilina (proteína de armazenamento, globulina 7S) (MACEDO *et al.*, 1993), que é resistente à digestão das proteases intestinais, limitando a oferta de alimento às células (XAVIER-FILHO, 1991; SALES *et al.*, 1992; MACEDO *et al.*, 1993).

Estudos químicos e imunológicos posteriores mostraram que a vicilina variante IT81D-1045 tinha um grande poder de se ligar a estruturas do intestino médio que contém quitina (SALES *et al.*, 1996; FIRMINO *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1997; YUNES *et al.*, 1998), aderindo-se nos ápices epiteliais das células intestinais das larvas (SALES *et al.*, 2001), um mecanismo similar à ação das lectinas, que estão envolvidas nas defesas das plantas contra insetos e patógenos (CHRISPEELS & PAIKHEL, 1991). Sabe-se também que alguns epitélios intestinais de insetos e invertebrados apresentam quitina, formando uma estrutura chamada de membrana peritrófica, responsável por facilitar a reciclagem de enzimas digestivas, proteger o epitélio intestinal de abrasão de algumas partículas de alimentos, do ataque de microrganismos e outras funções (TERRA, 2001). Desta forma, as proteínas que se ligam aos domínios de quitina afetam a fisiologia normal da membrana peritrófica, alterando sua permeabilidade (EISEMANN *et al.*, 1994; TELLAM & EISEMANN, 1998; HARPER *et al.*, 1998; WANG & GRANADOS, 2001). Em duas espécies de insetos pragas, cujas larvas reconhecidamente possuem membrana peritrófica quitinosa, tiveram o seu desenvolvimento afetado pela ingestão de vicilinas de *V. unguiculata*. A lagarta do cartucho da cana (*Diatraea saccharalis*) (Lepidoptera) (MOTA *et al.*, 2003) e as larvas do besouro *Tenebrio molitor* (PAES *et al.*, 2008) quando alimentadas com vicilinas incorporadas na dieta não se desenvolveram bem. Os dados publicados nesses trabalhos mostraram que de fato a vicilina de feijão é capaz de se ligar na membrana peritrófica de insetos não adaptados levando à antibiose. Por outro lado, como carunchos não possuem membrana peritrófica definida (VATS, 1976), esta condição deve representar uma pré-adaptação para se alimentar de sementes de leguminosas. No caso dos efeitos associados às vicilinas variantes em *C. maculatus*, Sales *et al.* (2001) propuseram que essas proteínas se ligam na superfície das membranas microvilares intestinais, hipoteticamente

em moléculas de natureza quitinosa. Segundo esses autores, baseados em dados de imunocitocalização ao nível ultra-estrutural, as vicilinas variantes se concentram nas microvilosidades dos enterócitos, dessa forma interferindo na fisiologia digestiva das larvas. Posteriormente se obsejou que de fato as vicilinas de *V. unguiculata* são absorvidas intactas através do epitélio intestinal e são depositadas nas células do corpo gorduroso (UCHÔA *et al.*, 2006). Estes dados que apontam para uma rota inusitada das vicilinas no interior das larvas do caruncho, também abrem novas perspectivas para alvos de atuação das vicilinas variantes. É possível que as vicilinas possam desestabilizar os órgãos internos das larvas (FITCHES *et al.*, 2001).

1.8 Absorção de proteínas em intestino de insetos

Apesar de muitas proteínas tóxicas de origem vegetal poder exercer seus efeitos após a interação com enzimas digestivas ou constituintes na superfície do epitélio intestinal de insetos, a possibilidade de absorção dessas proteínas e ação em órgãos internos desses animais também pode ser importante, ainda que pouco seja conhecido sobre os possíveis efeitos sistêmicos de proteínas de defesas vegetais, uma vez atravessada à barreira do epitélio intestinal. Dados sobre a absorção de proteínas intactas que cruzam o epitélio do intestino médio de insetos têm recebido limitada atenção, apesar que esse fenômeno é conhecido desde a década de 40 do século passado (WIGGLESWORTH, 1943). No entanto, recentes estudos têm fornecido evidências que a absorção, interiorização e ação de proteínas exógenas em órgãos internos, além de se tratarem de processos importantes, são comuns nos insetos (ver revisão em JEFFERS & JOE, 2008). Nos mamíferos, o processo de absorção de proteínas inteiras através do epitélio intestinal já é bem conhecido (SUGIMURA *et al.*, 2001).

A capacidade de algumas proteínas e peptídeos para atingir o ambiente interno através do epitélio intestinal de insetos está sendo considerado como um método promissor para a interiorização de inseticidas na hemocele (CASARELLI *et al.*, 2005; JEFFERS & ROE, 2008; FIANDRA *et al.*, 2009).

Em carunchos pragas de feijão já foi mostrado que proteínas tóxicas, como por exemplo, as arcelinas, não somente se ligam à parede do intestino, mas são também encontradas nos órgãos internos das larvas de *Zabrotes subfasciatus* (PAES *et al.*, 2000). Em larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, uma urease de sua dieta é especificamente absorvida durante o último instar larval, e é encontrada circulando na hemolinfa

(SUGIMURA *et al.*, 2001; KURAHASHI *et al.*, 2005). Lectinas como, por exemplo, a GNA (aglutinina de *Galantus nivalis*), e PHA (fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*) se ligam ao tecido do intestino médio e foram detectadas em órgãos internos das larvas da mariposa do tomate *Lacanobia oleracea* (FITCHES *et al.*, 2001, 2002). Informações sobre a translocação de albumina do intestino médio da lagarta de *B. mori* indicam que esta proteína modelo cruza a barreira intestinal das larvas em uma forma não processada, através do mecanismo da transcitose (CASARELLI *et al.*, 2005).

A ocorrência de vicilinas variantes expressas em sementes de *V. unguiculata* tem sido relacionada diretamente ao efeito tóxico dessas globulinas ao caruncho *C. maculatus* (MACEDO *et al.*, 1993; MACEDO *et al.*, 1995). É conhecido que estas proteínas tóxicas não causam efeitos agudos sobre as larvas do bruquídeo, mas é considerado afetar cronicamente estes insetos, tal que as larvas de *C. maculatus* foram capazes de sobreviver em sementes resistentes por três meses após a postura dos ovos (MACEDO *et al.*, 1995). Sendo assim, se levantaram as razões de porque as larvas de carunchos estariam absorvendo essas proteínas, pois é sabido que vicilinas são capazes de interromper o desenvolvimento normal de insetos não adaptados (MOTA *et al.*, 2003; UCHÔA *et al.*, 2006; PAES *et al.*, 2008).

Cada vez mais estudos vêm revelando propriedades anti-fúngicas associadas a peptídeos liberados a partir de proteólise parcial de moléculas de vicilinas em plantas (CHUNG *et al.*, 1997; MARCUS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2001; MARCUS *et al.*, 2008). Evidências crescentes sugerem que durante a germinação, processos finamente regulados de proteólise geram peptídeos anti-fúngicos que são liberados para o meio circundante a fim de proteger a plântula durante os estágios precoces de seu estabelecimento (MARCUS *et al.*, 2008).

Tem sido mostrado que as vicilinas pertencem a uma superfamília funcionalmente relacionada à dessecação celular e a processos de hidratação durante a germinação de sementes e esporulação de alguns fungos (BÄUMLEIN *et al.*, 1995). No núcleo de embriões de ervilha dormente (*Pisum sativum*), foi descrito uma proteína (p16) que compartilha algumas propriedades com desidrinas, que se acredita protegem estruturas celulares contra a dessecação. Foi proposto por BÄUMLEIN e colaboradores, que o possível polipeptídeo precursor desta proteína (p54) pertence à superfamília de vicilinas, membros que exibem uma ampla variedade de funções (CASTILLO *et al.*, 2000).

Como os carunchos pragas de feijões se desenvolvem dentro de sementes secas, especula-se que as larvas destes insetos se adaptaram a esse ambiente acumulando vicilinas na hemolinfa e no corpo gorduroso de forma a evitar o estresse osmótico. De fato, larvas que se desenvolveram em sementes mais secas do que sementes controle absorvem mais vicilinas (SOUZA *et al.*, 2010).

Alguns experimentos mostraram que vicilinas absorvidas pelas larvas são mantidas nos adultos e proteolisadas no corpo gorduroso e os peptídeos liberados são posteriormente detectados nos ovos depositados pelas fêmeas de *C. maculatus*, presente, possivelmente, para compor a resistência humoral dos ovos, sendo uma barreira química ao ataque de microrganismos (SOUZA, 2009; SOUZA *et al.*, 2010).

Trabalhos demonstraram que as vicilinas em geral tinham capacidade de se ligar a membranas no interior do intestino médio das larvas (SALES *et al.*, 2001), por possuírem capacidade de se ligarem a quitina (SALES *et al.*, 1996, FIRMINO *et al.*, 1996). Dados publicados mostram que as larvas de bruquídeos não possuem membrana peritrófica, o que pode representar uma pré-adaptação para se alimentarem de vicilinas. A maioria dos insetos apresenta essa estrutura anatômica no trato intestinal e conseqüentemente a ingestão de vicilinas incorporada na dieta afeta a funcionalidade da membrana peritrófica em insetos não adaptados à ingestão de vicilinas, como observado nas larvas de *D. saccharalis* (MOTA *et al.*, 2003) e de *T. molitor* (PAES *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a presença de vicilina e o processo de absorção destas proteínas no trato digestório de *Callosobruchus maculatus* e qual mecanismo está associado à resistência associada à vicilinas ao caruncho *Callosobruchus maculatus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de vicilinas do feijão de corda no corpo gorduroso e epitélio intestinal durante todo o desenvolvimento larval de *C. maculatus*.
- Identificar qual rota de absorção está envolvido na passagem das vicilinas nas larvas de *C. maculatus* em diferentes períodos.
- Identificar e quantificar a vicilina encontrada no trato digestório das larvas.
- Isolar as vesículas contendo vicilina das células do corpo gorduroso para caracterizar as proteases envolvidas na hidrólise da proteína.
- Identificar as atividades proteolíticas presentes nas vesículas do corpo gorduroso de *C. maculatus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Colônia de Insetos

As colônias de *C. maculatus* foram mantidas em sementes de *V. unguiculata*, previamente desinfestadas por congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de qualquer infestação anterior de campo. Essas colônias permaneceram numa sala incubadora a temperatura de $29 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70%, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Bioquímica – CCB - UFSC. Para os experimentos foram usadas larvas de *C. maculatus* do primeiro ao quarto instar.

3.2 Experimento de Resistência de *V. unguiculata* ao *C. maculatus*

Neste experimento foram utilizados 10 viveiros. Destes viveiros, 5 possuíam 10 sementes de feijão suscetível (fradinho) e 5 viveiros possuíam 10 sementes de feijão da linhagem IT81D-1053. Em cada um destes viveiros as sementes foram infestadas com 2 fêmeas de *C. maculatus*, onde estas permaneceram por 24h para postura de ovos. Após este período, os grãos foram examinados e o excesso de ovos foi retirado com a ajuda de um bisturi. Desta forma foi possível deixar apenas 1 ovo por feijão. Com isso, foi possível acompanhar a média de distribuição da frequência dos dias de emergência de adultos, assim como a percentagem de sobrevivência. Os dados foram expressos com o índice de Howe log (S/T), onde S é a percentagem de sobrevivência e T a média dos dias de emergência (HOWE, 1971).

3.3 Alimentação de Larvas Usando Sementes Artificiais

Para acompanhar o destino das vicilinas de cultivares suscetível (fradinho), resistente (IT81D 1053) e *Phaseolus vulgaris* (feijão preto comum) em *C. maculatus* após ingestão das sementes pelas larvas, essas proteínas foram quimicamente marcadas com FITC (isotiocianato de fluoresceína, ver item 3.4). Ambos os complexos, vicilina suscetível/FITC, vicilina variante/FITC e faseolina/FITC, foram misturados com farinha de semente de *V. unguiculata* suscetível usada como excipiente na concentração de 0,5% (m/m). A mistura foi inserida e compactada no interior de cápsulas de gelatina com o auxílio de espátulas e bastões de vidro. As larvas retiradas das sementes de *V. unguiculata* suscetíveis foram transferidas para cápsulas de gelatina no início do

primeiro e do quarto instar, quando as larvas estão ativamente consumindo sua dieta. As larvas foram transferidas, uma para cada metade da cápsula, em uma cavidade produzida na massa compactada de farinha em cada metade da cápsula, perfazendo um número amostral de 10 indivíduos. Em seguida, as duas metades foram cuidadosamente encaixadas de forma a permitir os movimentos necessários para a alimentação das larvas.

As larvas utilizadas como controle (10 larvas) também foram alimentadas em cápsulas artificiais, mas na sua dieta encontrava-se apenas farinha de sementes de *V. unguiculata*, sem marcação com FITC.

Após alimentação por 24 horas com farinha marcada, as larvas foram retiradas das cápsulas e dissecadas imediatamente ou foram transferidas novamente para sementes artificiais contendo apenas farinha de sementes de *V. unguiculata* suscetível sem marcação (mesma dieta controle), onde permaneceram por mais 48 horas. Depois deste período, as larvas foram retiradas das cápsulas e dissecadas imediatamente ou processadas para microscopia.

3.4 Marcação de Vicilina com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)

O FITC foi covalentemente incorporado a vicilinas de *V. unguiculata* suscetíveis, *V. unguiculata* variante (genótipo IT81D-1053) e faseolina (*Phaseolus vulgaris*). O FITC (50 mg em 1 mL de dimetil sulfóxido anidro) foi imediatamente diluído em tampão bicarbonato 0,75 M, pH 9,5 antes do uso. Após a adição de FITC, para dar uma razão de 1 mg por mg de vicilina, o frasco usado foi revestido por papel alumínio e incubado constantemente sob movimento rotacional à temperatura ambiente por uma hora. O FITC não incorporado em vicilina e faseolina foi removido por diálise contra água destilada. A solução resultante foi liofilizada para posterior utilização.

3.5 Preparações das Amostras de Insetos para Microtomia

Após 48 horas de pulso de alimentação das larvas, estas foram transferidas para soluções de sacarose de diferentes concentrações crescentes. Nesta etapa as amostras passaram por três imersões de sacarose. A primeira imersão em 5% de sacarose (m/m) e a segunda imersão em 15% de sacarose (m/m) onde permaneceram por 3h em cada uma das imersões. Na terceira e última imersão, as amostras foram submetidas a sacarose 30% (m/m) onde permaneceram por 18h.

Após os banhos de sacarose, as amostras foram seccionadas ao

Criostato Leica (Modelo CM1850, localizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB - UFSC). As larvas foram colocadas em seus respectivos blocos e preenchidas com a resina Tissue-Tek por 1h, na proporção de 2 larvas por bloco. As amostras foram cortadas com uma espessura de 7 μ m e montadas em lâminas para visualização por microscopia de fluorescência.

3.6 Preparações das Amostras em Criostato para Microscopia de Fluorescência

As lâminas obtidas a partir dos cortes de criostato foram analisadas em microscopia de fluorescência, onde foi utilizado o microscópio Olympus (modelo BX-61). Para visualização das amostras foi utilizado um comprimento de onda de 495nm para excitação e 521nm para emissão. Desta forma foi possível obter imagens fluorescentes, tanto de epitélio intestinal quanto de corpo gorduroso das larvas.

3.7 Microscopia Confocal

Após o período de alimentação com vicilina marcada com FITC, as larvas foram dissecadas para obtenção do corpo gorduroso, que posteriormente foi utilizado para o isolamento das vesículas. Para visualização e documentação da presença de vicilinas marcadas as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Porções a fresco de corpo gorduroso ou frações de centrifugação isopícnicica foram imediatamente montadas em lâminas e lamínulas e observadas em microscópio confocal Leica DMI6000 B Microscope como descrito por UCHÔA *et al.*, (2006).

3.8 Imunomarcção (imunogold) do epitélio intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* com anticorpo anti-vicilina IgG

Com a intenção de identificar as vicilinas presente no epitélio do intestino médio das larvas de *C. maculatus* foi necessário realizar a técnica de imunomarcção em cortes ultrafinos utilizando anticorpo policlonal anti-vicilina, em uma proporção de 1:40.000. Para isso, larvas de 4º instar foram alimentadas com vicilina suscetível com e sem marcação com FITC. As larvas alimentadas com vicilina suscetível foram transferidas para furos nas próprias sementes de *Vigna unguiculata*, permanecendo lá por 24 horas. Já as larvas alimentadas

com vicilina suscetível/FITC foram transferidas para cápsulas artificiais contendo vicilina marcada, onde permaneceram por 24 horas. Após este período a alimentação sem marcação foi mantida por 48 horas. As larvas controle foram retiradas diretamente dos viveiros. O experimento foi realizado em triplicata.

As larvas de 4º instar foram dissecadas em fixador glutaraldeído 0,3% em tampão fosfato (Sorensen) 0,1 M pH 7,4 na presença de paraformaldeído 4%. O intestino médio das larvas foi removido de forma intacta e permaneceu por um período de duas horas no fixador. Após fixação as amostras passaram por 5 lavagens de 20 minutos cada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 a 4 °C. Os intestinos, depois de lavados, foram desidratados em banho de álcool, sendo 70% por 10 minutos, 95% por 15 minutos e dois banhos de álcool 100% por 10 minutos. Com as amostras fixadas e desidratadas, estas foram embebidas em resina LR White onde permaneceram por 12 horas e emblocadas em resina LR White recém-preparada e colocada no interior de cápsulas de gelatina por 72 horas a 58° C.

3.9 Isolamento de Vesículas Presentes no Corpo Gorduroso dos Insetos

Para obtenção das amostras de vesículas do corpo gorduroso, este último foi coletado com auxílio de pinças finas. Os corpos gordurosos foram diretamente para tubos contendo tampão Tris/HCl 5 mM na presença de 215 mM de KCl, pH 6,8 sob banho de gelo. Estes foram homogeneizados com o homogeneizador tipo Potter-Elvehjem munido de um pistilo de teflon, através de movimentos manuais, mantendo-se o material constantemente em banho de gelo. Estes movimentos foram mantidos por 5 minutos segundo o protocolo desenvolvido por SAMMOUR *et al.* (1984) com algumas modificações introduzidas por MACEDO *et al.* (1993; 1995).

Para obtenção das frações solúveis, o homogenato do corpo gorduroso foi submetido a fracionamento celular por centrifugação diferencial. O fracionamento consiste em realizar uma centrifugação a 600 x g por 10 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante e resuspensando o sedimento (P1). Esta amostra resuspensa (P1) foi encaminhada à ultracentrifugação, sendo aplicada gradiente de sacarose. As vicilinas absorvidas são depositadas em vesículas no citoplasma das células do corpo gorduroso (UCHÔA *et al.*, 2006). Para isolamento dessas vesículas foi necessário o uso de ultracentrifugação em gradientes de sacarose, onde 200 μ L de amostras suspensas de corpo

gorduroso (P1) foram aplicadas no topo dos gradientes de sacarose (10-40%, m/v) preparados em tampão imidazol 5 mM contendo KCl 40 mM, pH 7,0. Os gradientes foram preparados sobre um colchão de 2 mL feito de uma solução de sacarose 50% (m/v). Em seguida, os tubos foram centrifugados (4 °C) a 96.000 g por 4 horas. As frações contendo vicilinas foram coletadas a partir da interface de cada camada com o auxílio de pipeta Pasteur. As vesículas isoladas e coletadas foram submetidas a três congelamentos/descongelamentos seguidos para o rompimento da membrana celular. Após isso foram centrifugadas a 25.000 g por 30 minutos, separando-as em sedimento e sobrenadante, o qual continham as vesículas.

3.10 Determinações de Proteínas

As determinações de proteína foram feitas a partir de método de Bradford (1976), usando como padrão ovo albumina.

3.11 Eletroforeses em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (Lauril sulfato de sódio)

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (LÄEMMLI, 1970). Foram utilizadas placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm. O gel de separação de acrilamida 10 % foi preparado misturando-se: 3,34 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 4,01 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, 0,1 mL de SDS 10 %, 0,05 mL de persulfato de amônio 10 % (APS), 0,005 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 10,005 mL. O gel de aplicação (“stacking”) foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada, 0,5 mL de acrilamida-bisacrilamida 30 %, 0,38 mL de tampão Tris/HCl 1,0 M pH 6,8, 0,05 mL de SDS 10 %, 0,025 mL de persulfato de amônio 10 % (APS), e 0,005 mL de TEMED, perfazendo um volume final de 3,06 mL. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 %, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8 contendo água destilada, glicerol 10%, SDS 10 %, 2-β-mercapto-etanol e 1 % de azul de bromofênol). A eletroforese foi processada a uma voltagem constante de 50 V até a linha de frente do corante atingir o gel de separação, então foi elevada até 150 V e mantida constantes durante aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue R ou com nitrato de prata como descrito no item abaixo.

Foram utilizados como marcadores de massa molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa) e lisozima (14 kDa).

3.12 Coloração por Precipitação com Nitrato de Prata

As proteínas dos géis foram submetidas à revelação por precipitação com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). Os géis foram fixados em 50% de metanol + 5% de ácido acético (20 minutos). Após a fixação, os géis foram incubados em 5% de metanol (10 minutos). Em seguida foram lavados em água ultrapura (2 horas ou overnight). Após este período os géis foram sensibilizados com 0,02% de tiosulfato de sódio (1 minuto), lavado com água ultrapura (1 minuto), e precipitados com 200 mg de AgNO_3 / 100 mL (20 minutos). Após a precipitação os géis foram lavados com água ultrapura (1 minuto). A revelação foi feita com carbonato de sódio 2% + 1,08% de formaldeído 100%. A produção de cor foi parada com ácido acético 5% (20 minutos). Os géis foram armazenados em ácido acético 2%, para posterior análise e documentação.

3.13 Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos

A caracterização parcial das proteases envolvidas no processamento das vicilinas no corpo gorduroso foi feita a partir da homogeneização das vesículas obtidas do corpo gorduroso após ingestão de suas dietas, onde estas vesículas foram isoladas por ultracentrifugação. Para caracterização da classe mecanística das proteases foram usadas combinações de inibidores e substratos como descrito por Silva *et al.*, (2001). Com o intuito de caracterizar qual classe mecanística das proteases envolvidas na hidrólise da vicilina, foram utilizados alguns inibidores, como EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), pepstatina A, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e E-64 (trans-epoxisuccinil 4-guanidino butano). Estes foram incubados juntamente com a vicilina 0,1% (m/m).

Nos ensaios de proteases usando como substrato vicilina 0,1 % (m/v), alíquotas de 0,05 mL de fonte de enzima foram incubadas com 0,05 mL de solução de vicilina 0,1% em tubos de ensaio. Após os diferentes intervalos de tempo de incubação (1-24h), foram retiradas alíquotas de 0,03 mL de cada tubo, onde foram transferidos para banho de gelo e a reação foi imediatamente interrompida pela adição de 0,01

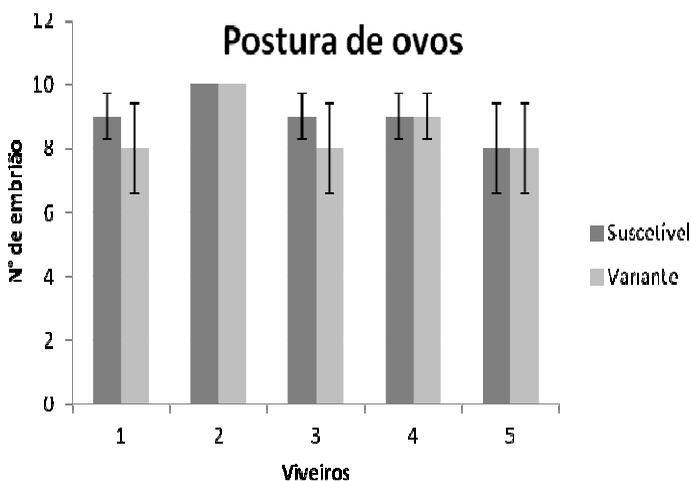
mL de tampão de amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6,8 contendo água destilada, glicerol 10%, SDS 10 %, 2-β-mercapto-etanol e 1 % de azul de bromofenol).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento de resistência de *Vigna unguiculata* ao *C. maculatus*

Os resultados obtidos mostram a resistência da linhagem ITB1D-1053 sobre o *C. maculatus*. Após 10 (dez) dias da ovoposição, os viveiros foram conferidos a fim de verificar a entrada do embrião no grão. Os resultados mostrados indicam que não há diferença estatística quanto à ovo posição, ou seja, os embriões se desenvolvem naturalmente, eclodindo e se dirigindo ao interior do grão. Os viveiro 1 e 3 de sementes variantes (IT81D-1053) apresentaram eclosão de 8 embriões viáveis, sendo dois a menos que o total de 10 (Figura 4.1). Estes mesmos viveiros, em sementes suscetíveis (fradinho), apresentaram um total de eclosão de 9 embriões viáveis, um a menos que o total de 10 (Figura 4.1). Mesmo com um N de eclosão menor em sementes variantes, a estatística mostra que não há diferença significativa entre as duas linhagens.

Figura 4.1 Distribuição do número de embriões viáveis que eclodiram na superfície para o interior do grão do feijão. As sementes suscetíveis (fradinho) e variantes (IT81D-1053) foram infestadas com apenas um ovo de *Callosobruchus maculatus* por feijão, sendo um total de 10 feijões por viveiro.



A partir deste passo, entrada do embrião nos cotilédones, as larvas que se desenvolvem em sementes variantes começaram a sofrer um atraso no seu desenvolvimento e posteriormente as leva à morte. Nossos resultados também mostram que os ovos postos em sementes resistentes (IT81D-1053) não chegam a emergir como adultos, morrendo entre o 2° e o 3° instar, mesmo depois de 90 dias após a ovoposição. Quanto à emergência dos adultos na semente controle suscetível, verificaram-se uma sobrevivência de 100% e uma média dos dias de emergência de $36,42 \pm 0,59$ dias, o que resulta em um índice de Howe de 0,054. Este valor indica que a linhagem IT81D-1053 é resistente ao inseto *C. maculatus*.

A partir deste experimento foi possível verificar que as larvas que se desenvolvem em sementes suscetíveis seguem seu crescimento normalmente, seguindo seu estágio de pupa até emergir como adulto. Já as larvas submetidas a desenvolvimento em sementes variantes (IT81D-1053) cessam seu crescimento a partir do 15° dia de ovoposição (Figura 4.28), permanecendo no mesmo tamanho até sua morte.

Figura 4.2 Desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus* submetido a crescimento em diferentes feijões suscetível (fradinho) e resistente (IT81D-1053) entre o 15 e 20° dia. Barra – 0,5 cm.



4.2 Análise da distribuição de vicilinas em órgãos internos das larvas de *C. maculatus*

Os resultados morfológicos obtidos através da microscopia de fluorescência mostraram que as larvas submetidas à alimentação artificial de sementes, apresentaram características diferentes, conforme

sua dieta e idade das larvas. As larvas de 1º instar (11 dias de desenvolvimento), alimentadas com as diferentes dietas (suscetível e IT81D-1053) não mostraram diferença significativa em relação à fluorescência emitida na porção apical das células do epitélio intestinal (Figura 4.3). Enquanto que as larvas alimentadas com dieta rica em faseolina apresentaram uma maior fluorescência no epitélio intestinal, quando comparado com as outras dietas, suscetível e variante (Figura 4.4). Entretanto, nas duas dietas testadas, as larvas mostravam-se ativas quanto a sua alimentação e desenvolvimento. Em geral as larvas de 1º instar apresentaram uma grande intensidade de fluorescência no epitélio intestinal e pouca quantidade no corpo gorduroso.

Figura 4.3 Larvas de 1º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e variante. a) Larvas alimentadas com vicilina suscetível por 24hs. b) Larvas alimentadas com vicilina variante (IT81D-1053) por 24hs. Após o pulso de alimentação, as larvas foram transferidas para alimentação controle por 48hs e depois deste período elas foram preparadas para microscopia. Ep – Epitélio intestinal; CG – Corpo gorduroso. Aumento de 10x.

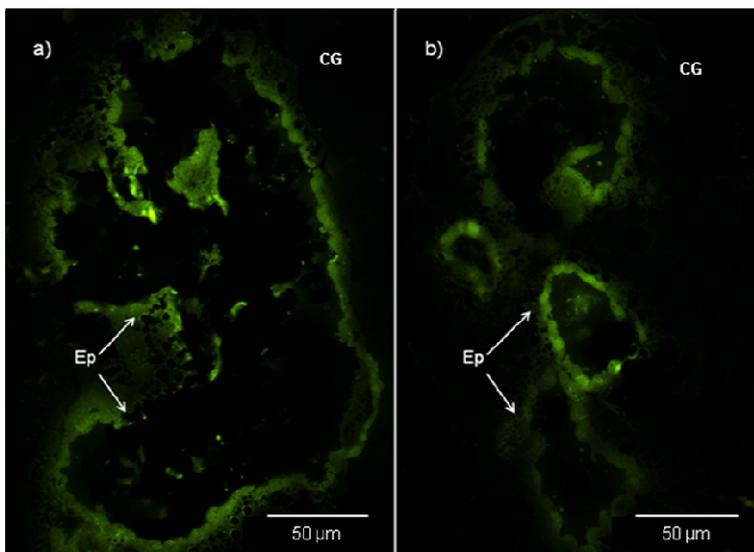
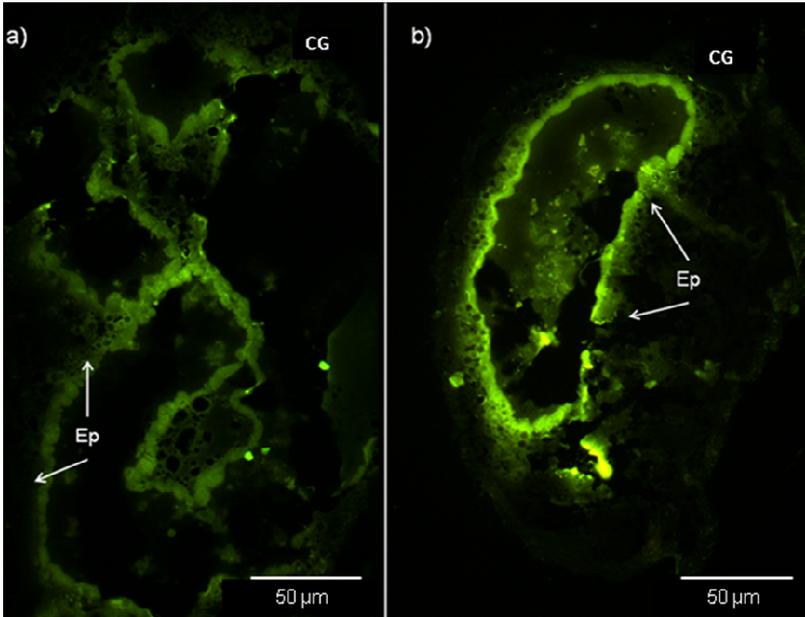


Figura 4.4 Larvas de 1º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e faseolina. a) Larvas alimentadas com vicilina suscetível por 24hs. b) Larvas alimentadas com faseolina – *Phaseolus vulgaris* (pertence à família das vicilinas) por 24hs. Após o pulso de alimentação, as larvas foram transferidas para alimentação controle por 48hs e depois deste período elas foram preparadas para microscopia. Ep – Epitélio intestinal; CG – Corpo gorduroso. Aumento de 10x.



Já as larvas de 4º instar de animais alimentados com vicilina/FITC suscetível apresentaram maior fluorescência em seu corpo gorduroso. No 4º instar o epitélio do intestino médio não foi tão aparente (Figura 4.5), indicando ausência de vicilina marcada neste tecido. Por outro lado, as larvas alimentadas com vicilina/FITC da linhagem variante (IT81D-1053) e faseolina/FITC (pertencente à família das vicilinas – *Phaseolus vulgaris*) apresentaram pouca fluorescência em seu corpo gorduroso. Ao contrário dos animais alimentados com vicilina/FITC suscetível, a maior fluorescência observada foi no epitélio intestinal, acumulando-se no ápice das células, apresentando comportamento muito semelhante (Figura 4.6), ao seu modo de interiorização nas células do intestino médio.

Figura 4.5 Larvas de 4º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e variante. a) Larvas alimentadas com vicilina suscetível por 24hs. b) Larvas alimentadas com vicilina variante (IT81D-1053) por 24hs. Após o pulso de alimentação, as larvas foram transferidas para alimentação controle por 48hs e depois deste período elas foram preparadas para microscopia. Ep – Epitélio intestinal; CG – Corpo gorduroso. Aumento de 10x.

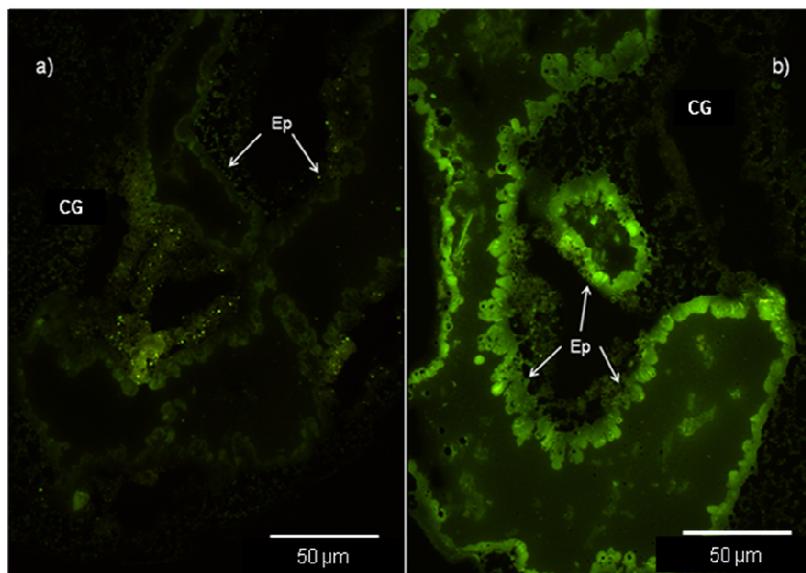
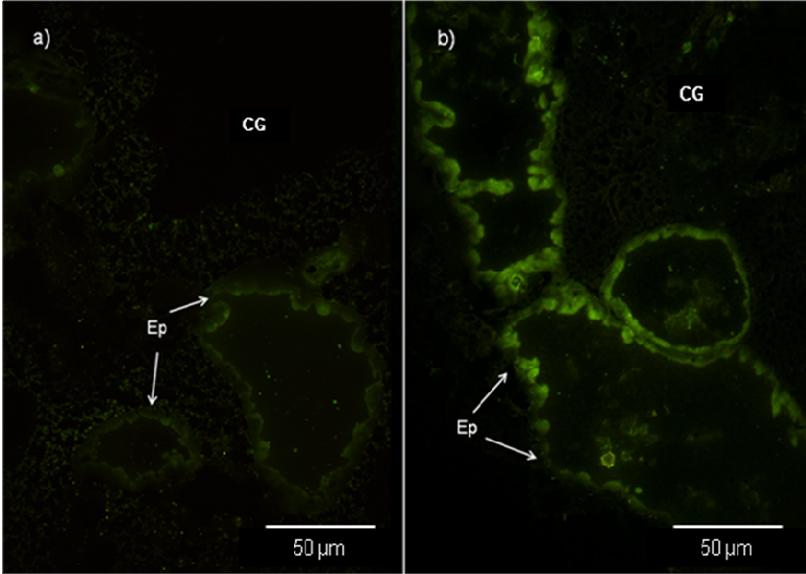
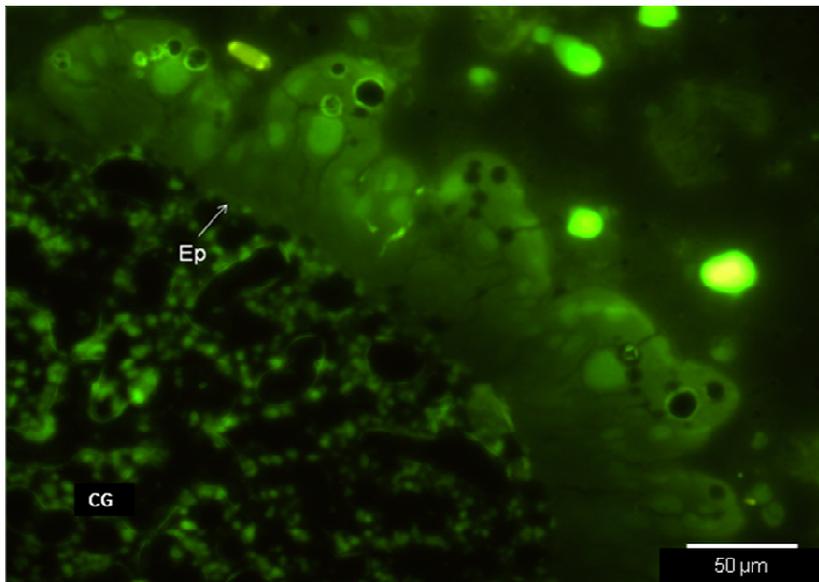


Figura 4.6 Larvas de 4º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilinas marcadas com FITC, suscetível e faseolina. a) Larvas alimentadas com vicilina suscetível por 24hs. b) Larvas alimentadas com faseolina – *Phaseolus vulgaris* (pertence à família das vicilinas) por 24hs. Após o pulso de alimentação, as larvas não foram transferidas para alimentação controle por 48hs Ep – Epitélio intestinal; CG – Corpo gorduroso. Aumento de 10x.



Outro experimento realizado foi a alimentação das larvas com vicilina/FITC por 24 horas sem o retorno da mesma para alimentação controle, a qual não possuía marcação. Os animais submetidos a este tratamento apresentaram vesículas no interior das células epiteliais e no seu corpo gorduroso (Figura 4.7).

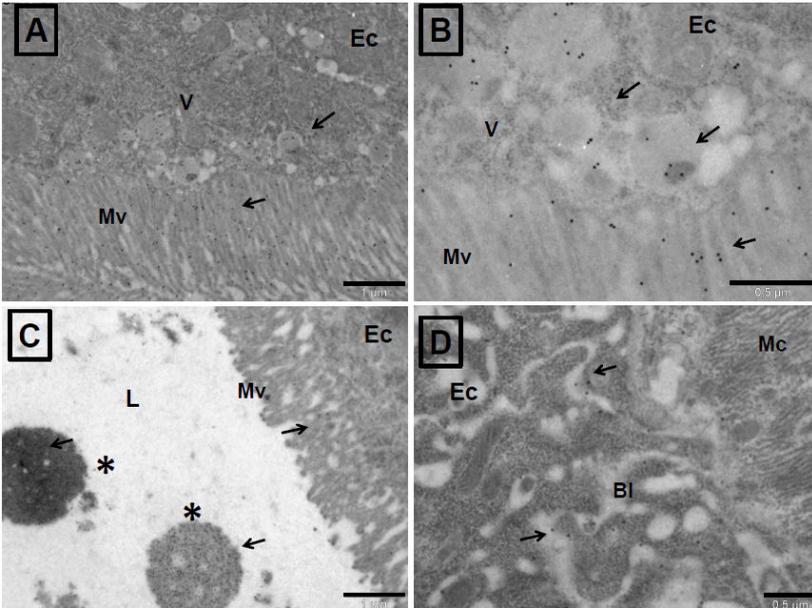
Figura 4.7 Larva de 4º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentada com vicilina variante marcada com FITC. Após o pulso de alimentação de 24 horas, as larvas foram preparadas para microscopia de criostato. Ep – Epitélio intestinal; CG – Corpo gorduroso. Aumento de 40x.



4.3 Detecção de vicilina por imunomarcação no epitélio intestinal de larvas de *C. maculatus*

A partir dos resultados obtidos por microscopia de fluorescência, foi possível observar a formação de vesículas no corpo gorduroso e no epitélio intestinal das larvas alimentadas com vicilina suscetível e vicilina suscetível marcada com FITC. Com isso, realizamos imunomarcação (imuno-gold) com anticorpo anti-vicilina IgG para obter imagens em ultraestrutura do epitélio intestinal das larvas. Os resultados mostram que há o reconhecimento da presença de vicilina no conteúdo luminal, nas microvilosidades, no interior das células do epitélio intestinal e principalmente em vesículas formadas no interior celular (Figura 4.8). As vesículas formadas no interior das células epiteliais podem ser vistas em toda a extensão das células, desde a região próxima as microvilosidades até a lâmina basal e músculos.

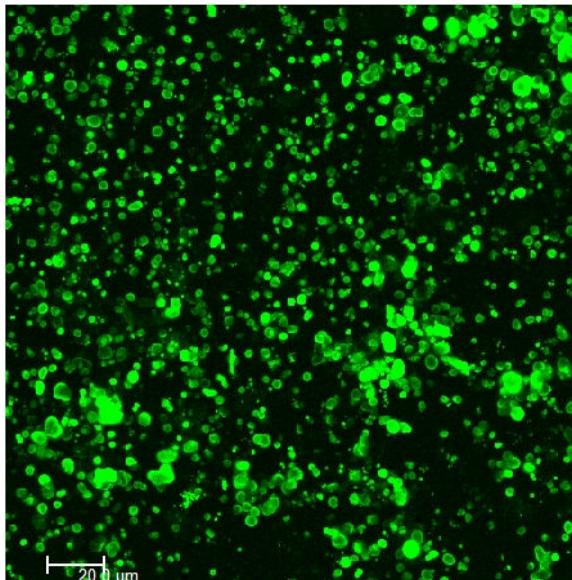
Figura 4.8 Imunohistoquímica de microseções do epitélio intestinal de *Callosobruchus maculatus* para detecção de vicilinas suscetíveis e suscetíveis/FITC. Imunomarcação (imunogold) com anticorpo anti-vicilina IgG. A e B imagens em ultraestrutura do epitélio intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilina suscetível sem marcação; C e D imagens em ultraestrutura do epitélio intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com vicilina suscetível/FITC. L: lúmen; Mv: microvilosidades; V: vesículas; Setas: Vicilinas reconhecidas pelo anticorpo.



4.4 Isolamento de Vesículas Presentes no Corpo Gorduroso dos Insetos

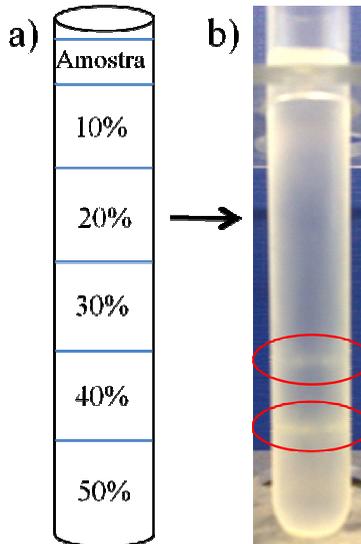
A fim de se obter frações enriquecidas das vesículas isoladas do corpo gorduroso onde as vicilinas são depositadas, as amostras de corpos gordurosos foram submetidas a um fracionamento celular por centrifugação diferencial. A partir desta etapa, estas foram submetidas à microscopia confocal. Desta forma, viu-se que as vicilinas absorvidas pelo epitélio intestinal das larvas são internalizadas em vesículas do citoplasma das células do corpo gorduroso. Com esta fração de vesículas do corpo gorduroso (Figura 4.9), foi possível isolá-las por meio de ultracentrifugação em gradiente de sacarose (Figura 4.10).

Figura 4.9 Imagem das vesículas do corpo gorduroso obtidas através fracionamento celular por centrifugação diferencial. As amostras homogeneizadas de corpo gorduroso foram submetidas a fracionamento celular por centrifugação diferencial, 600g x 10 minutos (P1), onde foi desprezado o sobrenadante e ressuspenso o sedimento. Imagem de microscopia confocal. Aumento 40x.



A partir deste isolamento de vesículas por ultracentrifugação foi possível verificar a atividade proteolítica e caracterizar parcialmente as proteases envolvidas na hidrólise da vicilina.

Figura 4.10 Detalhe da distribuição do gradiente de sacarose nos tubos de ultracentrifugação. Gradiente de sacarose de 10 a 50% obtidas a partir de ultracentrifugação. a) Detalhe da distribuição dos gradientes de sacarose 10 – 50% (m/m) b) Vesículas isoladas entre as interfaces de 30 – 40% e 40 – 50% de sacarose.



4.5 Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos

As proteases, depois de isoladas, foram ensaiadas com tampão 0,1 mM citrato/fosfato a fim de se verificar qual o pH mais apropriado para as enzimas. Com a utilização do substrato vicilina 0,1% (m/m), foi possível determinar qual pH ótimo (pH ótimo 6,8) das vesículas isoladas a partir da ultracentrifugação (Figura 4.11).

Através da ultracentrifugação foi possível ensaiar as duas frações obtidas no gradiente de sacarose e o sedimento formado durante o processo (Figura 4.12). Notou-se que estas duas frações de vesículas obtidas da ultracentrifugação possuíam as mesmas propriedades, variando apenas em sua densidade. As vesículas são compartimentos subcelulares contornados por membrana, desta forma algumas podem apresentar um maior conteúdo interno, diferenciando sua densidade no gradiente de sacarose.

Figura 4.11 Ensaio de pH ótimo das vesículas isoladas em gradiente de sacarose por ultracentrifugação. As vesículas foram ensaiadas por 24 hs em tampão citrato/fosfato 0,1M com os respectivos pH em vicilina 0,1% como substrato.

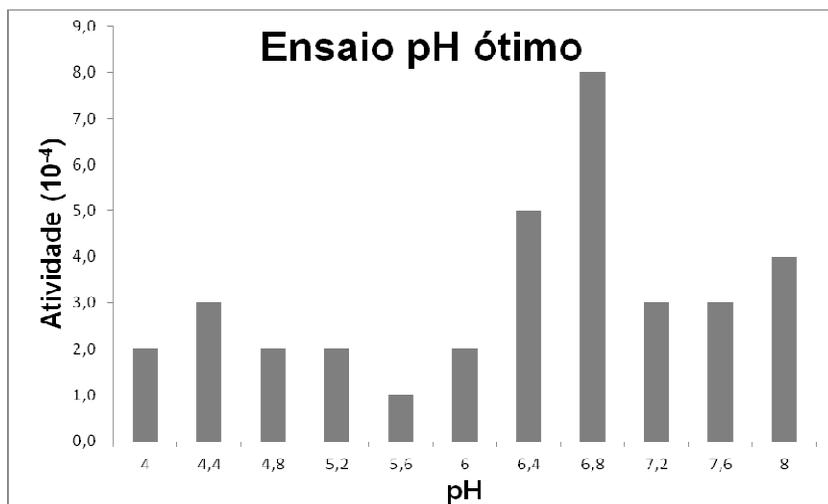
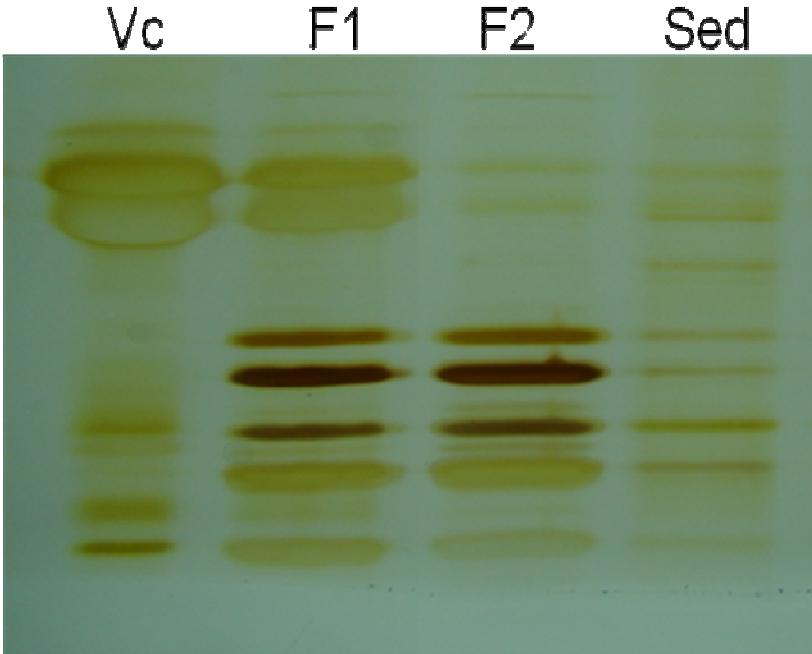
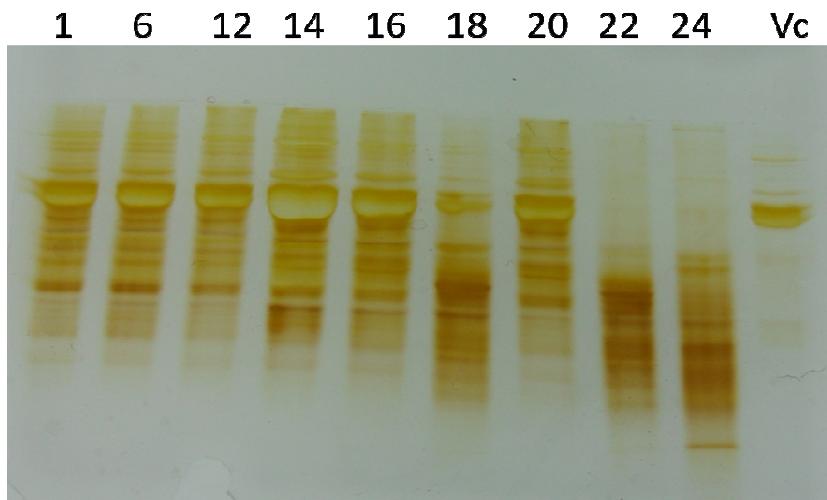


Figura 4.12 Análise do padrão de bandas obtidas a partir das frações de vesículas isoladas do corpo gorduroso de *Callosobruchus maculatus*. Gel de eletroforese (SDS-Page 10%). Vc - vicilina controle; F1 – Fração de vesículas coletadas com baixa densidade; F2 – Fração de vesículas coletadas com alta densidade; Sed – Sedimento formado durante ultracentrifugação.



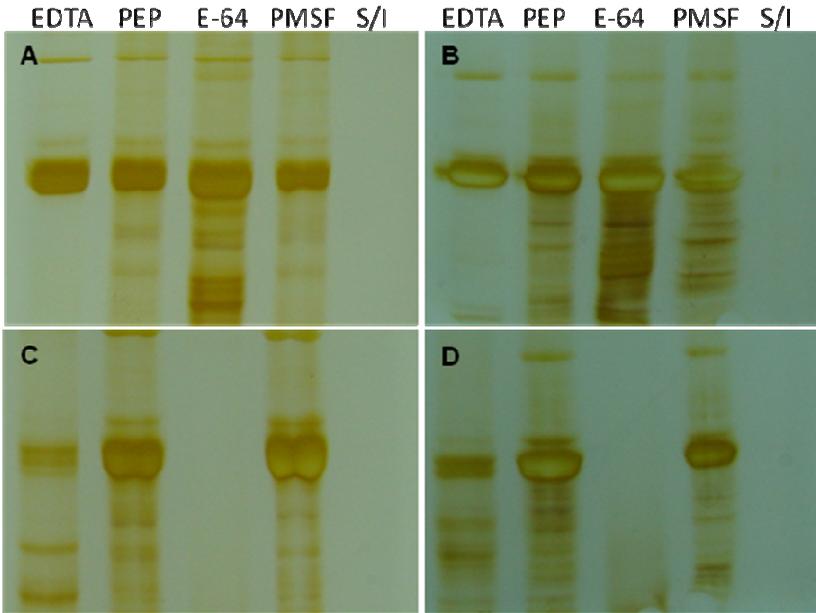
Outro experimento realizado foi o perfil temporal destas vesículas, para que pudéssemos observar qual peptídeo ou proteína estaria sendo hidrolisado primeiro, e conseqüentemente ter uma ideia de qual classe mecanística de proteases estão envolvidas neste processo. Com isso, realizamos incubações com diferentes intervalos de tempo, variando entre 1 - 24 horas (Figura 4.13), onde podemos ver que as vesículas possuem atividade proteolítica sobre a vicilina, perceptível principalmente após 18 horas de incubação. Nos tempos de 22 e 24 horas, as bandas com maior massa molecular foram completamente degradadas. Nestes tempos a intensidade de cor migra para posições de menor massa molecular.

Figura 4.13 Time course da hidrólise da vicilina a partir de vesículas isoladas do corpo gorduroso de *Callosobruchus maculatus*. Gel de eletroforese (SDS-Page 10%). Incubado com as frações de vesículas isoladas do corpo gorduroso com vicilina 0,1% (m/m) em tampão 0,1mM citrato/fosfato pH 6,8. Vc - vicilina controle; 1 -24 – tempo de incubação em horas. Revelado com nitrato de prata.



Com o intuito de caracterizar qual classe mecanística das proteases está envolvida na hidrólise da vicilina, foram utilizados alguns inibidores, como EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), pepstatina A, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e E-64 (trans-epoxisuccinil 4-guanidino butano). Estes inibidores foram incubados juntamente com a vicilina 0,1% (m/m). Em 12 horas de incubação o EDTA atua inibindo completamente a ação das proteases presentes em vesículas isoladas, tanto do sobrenadante quanto sedimento. Enquanto os outros inibidores agem de forma parcial (Figura 4.14). Entretanto, quando amostras de sedimentos são incubadas por 24 horas os inibidores perdem sua capacidade de inibição, atuando de forma parcial ou não apresentando capacidade inibitória como o composto E-64 (Figura 4.14).

Figura 4.14 Inibição da atividade proteolítica das vesículas isoladas do corpo gorduroso de *Callosobruchus maculatus*. Gel de eletroforese (SDS – Page 10%) realizado após incubação dos inibidores com as frações de vesículas isoladas do corpo gorduroso com vicilina 0,1% (m/m) em tampão 0,1mM citrato/fosfato pH 6,8. S/I – amostra incubada com vicilina 0,1% (m/m) sem a presença de inibidor. Amostras incubadas com vicilina 0,1% (m/m) e os inibidores. A: amostras de sobrenadantes de vesículas incubadas por 12 horas; B: amostras de sedimentos de vesículas incubadas por 12 horas; C: amostras de sedimentos de vesículas incubadas por 24 horas; D: amostras de sedimentos de vesículas incubadas por 24 horas.



5 DISCUSSÃO

5.1 Determinação da resistência da semente de *V. unguiculata* ao caruncho *C. maculatus*

Os insetos, atualmente, vêm sendo amplamente estudados por apresentarem um grande espectro de enzimas digestivas expressas em seu intestino médio. Desta forma, pode-se buscar novos mecanismos associados a esta enorme capacidade de adaptação dos insetos. Como consequência disso, tem-se procurado introduzir múltiplos genes de resistência às plantas, melhorando o desenvolvimento das gerações futuras das plantas. Há estudos que demonstram um sinergismo quando uma combinação de inibidores de proteases, de diferentes classes, são utilizados sobre enzimas digestivas de insetos (CARLINI & GROSSI-de-SÁ, 2002; AMIRHUSTIN *et. al.*, 2007). Com isso, a busca por novas proteínas tóxicas, que afetem insetos-pragas, está se tornando cada vez mais criteriosa. Sendo necessário entender algumas propriedades moleculares e seus mecanismos de ação, a fim de realizar as modificações estruturais necessárias.

Estudos publicados por Gatehouse e colaboradores em 1979 e 1985 (GATEHOUSE *et. al.*, 1979, 1985; GATEHOUSE & BOULTER, 1983; REDDEN *et. al.*, (1983) levaram a crer que os inibidores de tripsina eram total ou parcialmente responsáveis pela resistência da variedade de feijão africana TVu 2027 a *C. maculatus*. Entretanto, em trabalho publicado posteriormente, ficou claro que larvas de bruquídeos utilizam proteinases cisteínicas para digestão de proteínas desta variedade (KITCH & MURDOCK, 1986; LEMOS *et al*, 1987; WIEMAN & NIELSEN, 1988;. CAMPOS *et al*, 1989; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991). Além disso, algumas sementes de *V. unguiculata* já se mostravam sensíveis ao *C. maculatus*, mesmo possuindo uma grande quantidade de inibidores de tripsina. A resistência de cepas/linhagens contra o *C. maculatus* foi depois comprovada ser associada à ocorrência de formas variantes das proteínas de reserva conhecidas como vicilinas (MACEDO *et al.*, 1993).

A toxicidade das vicilinas variantes também foi relacionada à resistência a sua proteólise e com sua afinidade de ligação ao intestino médio das larvas de *C. maculatus* (SALES *et. al.*, 1992; MACEDO *et. al.*, 1993). A existência de algumas linhagens de vicilinas variantes expressas em sementes de *V. unguiculata* vem sendo associadas ao efeito tóxico das globulinas sobre seus predadores (MACEDO *et. al.*, 1993; MACEDO *et. al.*, 1995). Nossos dados

demonstram que a resistência associada à linhagem de *V. unguiculata* IT81D-1053 é muito maior que nas vistas anteriormente, onde Xavier-Filho (1998) mostrou a resistência da linhagem IT81D-1045, porém, nesta última, ainda havia emergência de *C. maculatus*, mesmo com baixo percentual de sobrevivência e uma alta média dos dias de emergência. Assim as vicilinas oriundas de feijões resistentes vêm apresentando baixas taxas de digestibilidade, apresentando efeitos antimetabólicos (SALES *et. al.*, 2001).

5.2 Criostato e microscopia de fluorescência

As vicilinas variantes afetam o desenvolvimento das larvas do caruncho *C. maculatus* por ligarem-se na superfície das células epiteliais do intestino médio, ligando-se especificamente ao glicocálix (MACEDO *et. al.*, 1993; SALES *et. al.*, 2001), porém não há evidências de danos causados as células (SALES *et. al.*, 2001). Estas formas variantes das vicilinas também vêm sendo relacionadas à interação com quitina ou então com estruturas quitinosas (SALES *et. al.*, 1996; FIRMINO *et. al.*, 1996; MOTA *et. al.*, 2003). Este modo de ação é muito semelhante à forma com que certas lectinas se ligam as microvilosidades do intestino médio de insetos (ZHU-SALZMAN *et. al.*, 1998; FITCHES *et. al.*, 2001). Em 2009, Souza demonstrou que larvas de *C. maculatus* absorvem as vicilinas de forma intacta, sendo proteolisadas no corpo gorduroso e mantidas nos adultos. Além disso, os peptídeos liberados são posteriormente detectados nos ovos depositados pelas fêmeas de *C. maculatus* (SOUZA, 2009; SOUZA *et. al.*, 2010). Esses dados vão de encontro com os resultados obtidos por Sugimura e colaboradores (2001), onde mostram que a urease da folha da amoreira é absorvida intacta através do epitélio intestinal e hemolinfa de larvas de *Bombyx mori*. Isto indica que o processo de transporte da vicilina pode ser similar ao da uréase.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as larvas de 1° e 4° instar submetidas à alimentação artificial com vicilina suscetível/FITC (fradinho), apresentaram características semelhantes (Figuras 4.3 - 4.6), onde o epitélio intestinal apresentou visivelmente menos intensidade de fluorescência, quando comparamos com larvas alimentadas com vicilinas variantes e de faseolina (*Phaseolus vulgaris*), demonstrando que a proteína está sendo internalizada normalmente e posteriormente proteolisada no corpo gorduroso das larvas. Já as larvas de 1° e 4° instar alimentadas com vicilinas variantes/FITC e faseolina/FITC, apresentaram o mesmo padrão de fluorescência no

epitélio intestinal, mostrando que o modo de interação com as células pode ser o mesmo. Apesar desta diferença visual, todas as larvas testadas estavam em plena atividade de desenvolvimento, ou seja, se alimentando ativamente.

Sales e colaboradores, em 2001, propuseram que o mecanismo de resistência associado à vicilina é a presença de quitina nas células do intestino médio das larvas. Onde ficou demonstrado, através de imunomarcção, a presença de quitina e vicilina, principalmente na área apical das células do intestino médio das larvas. Uma inspeção nas micrografias publicadas nesse artigo (SALES *et. al.*, 2001), entretanto, permite se observar marcação também no interior dos enterócitos e no corpo gorduroso. Mais tarde descobriu-se que o transporte de vicilinas para a hemolinfa de larvas de *C. maculatus* poderia ser mediada por receptores encontrados em microvilosidades do epitélio intestinal, similar aos eventos de transcitose nos mamíferos neonatos (SUGIMURA *et. al.*, 2001).

Resultados de imunomarcção obtidos após a alimentação de larvas com vicilinas suscetíveis de sementes (sem marcação) e vicilinas suscetíveis marcadas com FITC, mostram que a proteína é internalizada através do epitélio intestinal das larvas. Estas proteínas estão presentes no conteúdo luminal das larvas, em microvilosidades do epitélio intestinal e no interior das células epiteliais, com formato muito semelhante a vesículas endocíticas, sendo facilmente encontradas em toda a extensão das células do epitélio intestinal (Figura 4.8). Revendo dados e analisando os resultados publicados em 2001 por Sales e colaboradores, podemos concluir que as marcações encontradas por eles no ápice das células do intestino médio das larvas, eram vicilinas ligadas aos receptores presentes nas membranas das microvilosidades como descrito por Uchôa e colaboradores em 2006. Neste contexto, nossos resultados vêm a acrescentar que o transporte de vicilinas do intestino médio para órgãos internos das larvas pode ser mediado por endocitose e que formas variantes de vicilina podem afetar a transcitose, se acumulando no citoplasma dos enterócitos e, assim, afetando a fisiologia digestiva das larvas.

5.3 Caracterização das Proteases Presentes nas Vesículas do Corpo Gorduroso dos Insetos

Os insetos apresentam uma gama variada de enzimas digestivas, que são encontradas e expressas nos compartimentos do intestino médio do animal. O reconhecimento das classes mecanísticas responsáveis pela

atividade proteolítica dos insetos é extremamente importante para o desenvolvimento de produtos com eficiência no controle de pragas, baseando-se em agentes biológicos como inibidores de proteinases (CARLINI & GROSSI-de-SÁ, 2002). Atualmente, há poucos trabalhos voltados à caracterização dos diferentes grupos de enzimas digestivas proteolíticas secretadas no interior do tubo digestivo dos insetos (TERRA & FERREIRA, 2005; VINOKUROV *et. al.*, 2006). Estudos anteriores serviram como base para a compreensão do mecanismo de ação da digestão em insetos, apresentando detalhes como a variação do pH nos diferentes compartimentos do tubo digestivo (TERRA *et al.*, 1985; VINOKUROV *et al.*, 2006) e mostrando a distribuição das diferentes classes mecanísticas de proteinases. As proteinases diferenciam-se em sua localização no intestino médio das larvas e no pH onde apresentam melhor atividade proteolítica. As proteinases cisteínicas, por exemplo, estão localizadas na porção anterior do intestino médio, onde o pH é mais ácido. Já as proteinases serínicas estão localizadas em uma região mais distal, onde o pH no interior do lúmen passa a ser mais alcalino (TSYBINA *et. al.*, 2005).

Nossos dados mostram que o pH ótimo das vesículas isoladas é 6,8 e até o período de incubação de 12 horas os inibidores atuam de forma semelhante, inibindo totalmente ou parcialmente a atividade proteolítica. Porém, ao incubarmos a vesícula com seu substrato por 24 horas, vimos que os inibidores EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e E-64 (trans-epoxisuccinil 4-guanidino butano) perderam totalmente sua capacidade de bloquear a reação, enquanto os inibidores PEP (pepstatina A) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) continuaram atuando, mesmo que parcialmente. Estes dados nos levam a crer que há uma combinação de enzimas atuando na hidrólise da vicilina. Desta forma, ao inibirmos a protease responsável pelo início do processo, estaremos reprimindo a ação da segunda protease no processo de digestão. Assim, possivelmente, as proteases envolvidas na hidrólise deste substrato no interior das vesículas são proteinases aspárticas e serínicas, uma vez que foram inibidas por Pepstatina A e PMSF que são tipicamente inibidores destas proteases. Apesar de não conseguir estabelecer aqui qual ordem de classe mecanística é responsável pelo início do processo de hidrólise da vicilina, estes dados vêm a acrescentar a importância dessas enzimas na digestão dos insetos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que é possível acompanhar o destino das vicilinas absorvidas através do intestino médio das larvas de *Callosobruchus maculatus*. Com isso, podemos concluir que as vicilinas são consumidas pelas larvas e absorvida através das células epiteliais do intestino médio. Assim elas se mostram presentes desde o início de sua alimentação quando o embrião passa para o interior da semente do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), alimentando-se durante todo o período até emergirem como adultos. Ao longo do desenvolvimento larval é possível identificar a presença da proteína no interior das células do epitélio intestinal, bem como em seu corpo gorduroso.

As vicilinas encontradas nas sementes do feijão formam aglomerados, chamados de corpos proteicos. Esses corpos proteicos são digeridos no intestino médio das larvas e as vicilinas liberadas no interior do conteúdo luminal das larvas de *C. maculatus*. A partir das imagens obtidas por imunomarcção, fica evidente que vesículas são formadas no interior das células epiteliais do intestino médio das larvas, absorvendo a vicilina que está ligada ao seu receptor na membrana das microvilosidades. Sugerindo que a rota de absorção dessa proteína até os órgãos internos das larvas seja mediada por endocitose.

As vesículas presentes no corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* foram isoladas através ultracentrifugação, na qual o gradiente descontínuo de sacarose mostrou-se eficiente. A partir do isolamento dessas vesículas foi possível caracterizar parcialmente as classes mecanísticas das proteases envolvidas na hidrólise da vicilina. Com os dados obtidos, acreditamos que a atividade proteolítica no interior dessas vesículas é realizada por pelo menos duas classes de proteases, as aspárticas e as serínicas. Porém, não foi possível identificar qual classe mecanística é responsável pelo início do processo de hidrólise da vicilina, necessitando de estudos adicionais para sua total compreensão.

A forma variante da vicilina (IT18D-1053) se mostrou muito tóxica as larvas de *C. maculatus*, corroborando com dados já publicados, onde a resistência vem sendo atribuída as formas variantes das proteínas globulinas presentes em sementes, principalmente em leguminosas.

7 PERSPECTIVAS

Em relação aos trabalhos futuros, estes visão esclarecer alguns dados já abordados nesta dissertação como o envolvimento das proteases intestinais na digestão de proteínas, principalmente de vicilinas. Desta forma, pretende-se aprofundar no entendimento e nas formas de ação das proteases intestinais.

A partir dos dados encontrados nesta dissertação, quanto ao processo de endocitose, são necessários estudos aprofundados sobre quais processos endocíticos ou quais mecanismos mediados por endocitose são responsáveis por realizar a absorção das vicilinas. Com isso, é necessário a utilização de alguns inibidores visando o entendimento e a identificação das classes de receptores responsáveis por esta internalização.

Outro ponto importante é a verificação da interação dos ligantes aos receptores, calculando as constantes de dissociação das diferentes vicilinas aos seus receptores.

Também pretende-se isolar os receptores presentes nas membranas das microvilosidades, e posteriormente sequencia-los. Da mesma forma, pretende-se sequenciar as vicilinas suscetíveis (fradinho) e variantes (IT81D-1053), identificando os pontos de glicosilação presentes nas estruturas das proteínas.

REFERÊNCIAS

- AMIRHUSIN, B., SHADE, R. E., KOIWA, H., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A., MURDOCK, L. L., ZHU-SALZMAN, K., (2007). Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology* 53, 734-740.
- APPLEBAUM, S. W. (1985). Biochemistry of Digestion. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology*, eds., Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. New York, 4, 279- 311.
- BAKER T. A., NIELSEN, S. S., SHADE, R. E. & SINGH, B. B. (1989). Physical and chemical attributes of cowpea lines resistant and susceptible to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 25: 1-8.
- BAÜMLEIN, H., BRAUN, H., KAKHOVSKAYA, I. A. & SHUTOV, A. D. (1995). Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *Journal of Molecular Evolution* 41, 1070-1075.
- BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, volume 8, 93-99.
- BONDAR, G. (1936). Notas biológicas sobre bruquídeos observados no Brasil. *Arquivos do Instituto de Biologia Vegetal* 3: 7-44.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BRAUN, H., HORSTMANN, C., BÄUMLEIN, H. (1996). A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. *Plant Molecular Biology* 31, 35-44.
- BROWN, L.; DOWNHOWER, J., F. (1988). *Analyses in Behavioral Ecology: A Manual for Lab and Field*. Sinauer Associates, pg 194
- CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. (1989). Resolution and partial characterization of proteinases and

amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp. Biochem. Physiol* ,92B, 51-57.

CARLINI, C. R., GROSSI-de-SÁ, M. F., (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.

CASARELLI, M., CORTI, P., LEONADI, M. G., FIANDRA, L., BURLINI, N., PENNACCHIO, F., GIORDANA, B. (2005). Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *Journal of Insect Physiology* 51, 933–940.

CASTILLO, J., RODRIGO, M. I., MÁRQUEZ, J. A., ZÚÑIGA, A. & FRANCO, L. (2000). A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *Eur. J. Biochem.* 267, 2156-2165.

CRAWLEY, M. J. (1992). Population dynamics. In.: *Natural Enemies: the Population Biology of Predators, Parasites and Diseases.* (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. p.40-89.

CHRISPEELS, M.J., GROSSI de SÁ, M. F. & HIGGINS, T. J. V. (1998). *Seed Science Research*, 8, 257-263.

CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL N. V. (1991). Lectin, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell*, 3: 1-9.

Da SILVA, M. C. M., GROSSI de SÁ, M. F., CHRISPEELS, M. J., TOGAWA, R. C. & NESHICH, G. (1999). *Protein Engenniring*.

EDVARDSSON, M., TREGENZA, T. (2005). Why do male *Callosobruchus maculatus* harm their mates. *Behavioural Ecology*, 16(4): 788-793.

EISEMANN, C. H., DONALDSON, R. A., PEARSON, R. D., CADOGAN, L. C., VUOCOLO, T., TELLAM, R. L., 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucila cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72, 1–10.

FERNANDES, K. V. S., SABELLI, P. A., BARRAT, D. H. P., RICHARDSON, M., XAVIER-FILHO, J. & SHEWRY, P. R. (1993).

The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 23: 215-219.

FERRAZ, F. C.; CARVALHO, A.G., SOUSA, N, J. Eficiência de armadilhas de impacto para levantamento de coleopteros em vegetação ciliar em Pinheiral, RJ. IN: *IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros, Águas de Lindóias, SP, Anais...* Vol. II, P. 142 - 145, 1998.

FIANDRA, L., CASARTELLI, M., CERMENATI, G., BURLINI, N., GIORDANA, B. (2009). The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. *Journal of Insect Physiology* 55, 10-18.

FIGUEIRA, L. K. & CARVALHO, A. G. Avaliação de frutos de *Albizzia lebbek* e danos causados por *Merobruchus paquetae*. *Revista de Agricultura*. Piracicaba, SP, 78(1): 67-76. 2003.

FIRMINO, F., FERNANDES, K. V. S., SALES, M. P., GOMES, V. M, MIRANDA, M. R. A., DOMINGUES, S. J. S. & XAVIER-FILHO, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 749-756.

FITCHES, E., AUDSLEY, N., GATEHOUSE, J. A. & EDWARD, J. P. (2002). Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1653-1661.

GALLO, D.; NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. R. A.; ALVES, S. B. VENDRAMIM, J. D.(1988). *Manual de Entomologia Agrícola*. São Paulo: CERES, 649 p.

GATEHOUSE, A. M. R.(1984). Antinutritional proteins in plants. In "Developments in Food Proteins", Vol. 3, pp. 245-293, Hudson, B. J. F. ed., Elsevier, Londres.

GATEHOUSE, J. A. (2001). The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology* 47, 1389-1398.

GATEHOUSE, A. M. R. & BOUTER, D. (1983). Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on the development of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34: 345-350.

GATEHOUSE, A. M. R.; BUTLER, K. J.; FENTON, A. A.;
GATEHOUSE, J. A. (1985). Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 39, 279-286.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A.; DOBIE, P.;
KILMINSTER, A. M.; BOUTER, D. (1979). Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* 30, 948-958.

GOMES, V. M., BLANCO-LABRA, A., SALES, M. P., FERNANDES, K. V. S., CORDEIRO, R. A. & XAVIER-FILHO, J. (1997). Vicilin storage proteins from cowpea (legume) seeds inhibit fungal development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4110-4115.

GROSSI de SÁ, M. F. & CHRISPEELS, M. J. (1997). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27(4), 271-281.

HARPER, M. S., HOPKINS, T. L., CZAPLA, T. H., (1998). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue and Cell* 30, 166-176.

HARRINGTON, J. F. (1972). Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. (Ed). *Seed Biology: Insects, and Seed collection, Storage, Testing, and Certification*. Vol. III, Academic Press. New York and London. p.145-245.

HOLTZ, A. M.; OLIVEIRA, H. G.; PALLINI, A.; VENZON, M.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, C. L.; MARINHO, J. S. & ROSADO, M. C. Desempenho de *Thyriniteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em Eucalipto e Goiaba: o Hospedeiro Nativo Não é um Bom Hospedeiro? Neotropical Entomology 32(3):427-431 (2003).

HOWE, R. W. (1971). A parameter for expressing the suitability of an environment for insect development. J. Stored Prod. Res. 7, 63-65.

HOWE, R. W. (1972). Insects attacking seeds during storage. In.: KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) Seed Biology: Insects, and Seed collection, Storage, Testing, and Certification. Vol. III, Academic Press. New York and London. p.247-300.

JANZEN, D.H. (1971). Escape of *Cassia grandis* L. beans from predators in time and space. Journal of Ecology 52: 964-979.

JANZEN, D. H. (1980). Specificity of seed-attacking beetles in a Costa Rican deciduous forest. Journal of Ecology, 68: 929-952.

JEFFERS, L. A., ROE, R. M. (2008). The movement of proteins across the insect and tick digestive system. Journal of Insect Physiology 54, 319-332.

JOHNSON, C. D. (1981). Interactions between bruchid (Coleoptera) feeding guilds and behavioral patterns of fruits of the Leguminosae. Environment Entomologic 10: 249-253.

JOHNSON, C. D. & ROMERO, J. (2004). A review of evolution of oviposition guilds in the Bruchidae (Coleoptera). Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba, 48 (3): 404-408.

KAGEYAMA, P. Y. & PINÃO-RODRIGUES, F. C. M. (1993). Fatores que afetam a produção de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PINÃO-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.). Sementes Florestais Tropicais. Brasília: ABRATES, p.19-46.

KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L. (1986). Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* (F.). Arch. Insect Biochem. Physiol, 3, 561-576.

- LÄEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LARA, F. M. (1991). Princípios de resistência de plantas a insetos. 2 ed., São Paulo: Ícone, 336 p.
- LAWRENCE, M. C., IZARD, T., BEUCHAT, M., BLAGROVE, R. J., COLMAN, P. M. (1994). Structure of phaseolin in 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 238, 748-776.
- LIMA, C. A. M. (1955). Insetos do Brasil. Coleopteros. 3ª parte - Escola Nacional de Agronomia . Rio de Janeiro, série didática.
- LINNAEUS, C. (1758). *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Editio Decima, Reformata. Vol. I.* Salvii, Holmiae, 824 + iii p.
- LISBOA, P. L. B. (1975). Predação em sementes de *Oenocarpus bacaba* Mart. (Palmae). *Ciência e Cultura*, 28(7): 764-767.
- LEMOS, F. J. A.; XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. (1987). Proteinases of the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae. *Arq. Biol. Tecnol.*, 30, 46.
- MACEDO, M. L. R., ANDRADE, L. B. S., MORAES, R. A., XAVIER-FILHO, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 105C, 89-94.
- MACEDO, M. L. R., FERNANDES, K. V. S., SALES, M. P., XAVIER-FILHO J. (1995). Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible and resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research Brasil* 28, 183-190.
- MANNERS, J. M. (2007). Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome Biology* 8:225.
- MARCUS, J. P., GREEN, J. L., GOUITER, K. C., MANNERS, J. M.

(1999). A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia*. The Plant Journal 19, 699-710.

MARCUS, J. P.; GOUITER, K. C.; MANNERS, J. M. (2008). Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity *in vitro*. Plant Molecular Biology Reporter 26, 75–87.

MITCHELL, R. (1975). The evolution of oviposition tactics in the bean weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.). Journal of Ecology, vol.56, p.696-702.

MONTE, O. (1935). Breve notícia sobre uma praga de canafístula. Chácaras e Quintais, São Paulo vol.52, n.4, p.481.

MORTON, R. E. & EVANS, T. A. (1992). Modifications of the bicinchoninic acid proteins assay to eliminate lipid interference in determining protein content. Analytical Biochem 204, 332-334.

MOTA, A. C., DaMATTA, R. A., LIMA-FILHO, M., SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. (2003). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). Journal of Insect Physiology 49, 873-880.

NAFRIA, J. M. N. & DURANTE, M. P. M. (1985). Tratado de Entomologia. Barcelona: Ediciones Omega S. A, 599p.

NG, T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins. Peptides 25, 1215-1222.

NOGUEIRA, E. M. L. & ARRUDA, V. L. V.. (2006). Frutificação e danos em frutos e sementes de *Sophora tomentosa* L. (Leguminosae, Papilionoideae) em restinga da praia da Joaquina, Florianópolis, SC. Biotemas, 19 (4): 41-48.

PAES, N. S., GERHARDT, I. R., COUTINHO, M. V., YOKOYAMA, M., SANTANA, E., HARRIS, N., CHRISPEELS, M. J., GROSSI-de-SÁ, M. F. (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of the bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. Journal of Insect Physiology 46, 393-402.

PAES, E. V., UCHÔA, A. F., PINTO, M. S. T., SILVA, C. P., FERNANDES, K. V. S., OLIVEIRA A. E. A., XAVIER-FILHO, J. (2008). Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 129, 11-17.

PEDROSA-MACEDO, J. H. (1989). Os coleópteros nos reflorestamentos brasileiros. (Mimeografado). Curso sobre atualização em Proteção Florestal, realizado pela FUPEF. Curitiba. 13p.

REDDEN, R. J.; DOBIE, P.; GATEHOUSE, A. M. R. (1983). The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. I. Analyses of parental, F₁, F₂, D₃ and backcross seed generations. *Aust. J. Agric. Res.*, 34, 681-695.

REIS C. M., CALVET M. M., SALES M. P., FERNANDES, K. V. S., GOMES, V. M., XAVIER-FILHO, J. (1997). α -Amylase inhibitors of legume seeds and their involvement in the resistance to the bruchid beetles. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40: 413-418.

RICHARDS, O. W. & DAVIES, R. G. (1984). Tratado de Entomologia IMMS. 10^o Ed., Vol. II, Barcelona: Ediciones Omega S.A., 998p.

RYAN, C. A. (1990). *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425- 449.

SAMMOUR, R. H., GATEHOUSE, J. A., GILROY, J., BOULTER, D. (1984). The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformes*) to pea vicilin and its separation from α -mannosidase. *Planta* 161, 61-70.

SALES, M. P., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V. S., XAVIER-FILHO, J. (1996). Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 319–326.

SALES M. P., MACEDO M. R. L., XAVIER-FILHO, J. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103: 945-950.

SALES, M.P., PIMENTA, P. P., PAES, N. S., GROSSI-de-SÁ, M. F., XAVIER-FILHO, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 27–34.

SANTOS, G. P.; ANJOS, N., ZANUNCO, J. C. (1985). Bionomia de *Merobruchus paquetae* Kingsolver, 1980 (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de *Albizia lebbek* Benth (Leguminosae: Mimosoideae). *Revista Árvore*, v.9, n.1, p.87-99.

SANTOS, G. P.; ARAÚJO, F. S.; MONTEIRO, A. J. A.; NETO, H. F. (1994). Danos causados por *Plocetes sp.* (Coleoptera; curculionidae) e lepidoptera em sementes de guiné-do-mato, *Coutareae hexandra* (Rubiaceae). *Revista Ceres*, Viçosa, v. 41, n. 238, p. 608-613.

SANTOS, G. P.; ARAÚJO, F. da S.; NETO, H. F.; MONTEIRO, A. J. A. (1994). Danos em sementes de *Cassia ferruginea* causados por *Zabrotes interstitialis*, *Pygiopachymerus lineola* (Coleoptera: Bruchidae) e um Lepidoptera (Pyralidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 54 (2): 311-316. 70.

SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, T. V.; LÉO, E. A.; DUARTE, N. F. (1996). Notas preliminares sobre danos causados por *Hexachaeta sp.* (Diptera:Tephritidae) em sementes de papagaio- *Aegiphila sellowiana* Cham., 1832 (Verbenaceae). Viçosa-MG, *Revista Cerne*, v.2, n.2, p. 152-160.

SINGH, B. B., SINGH, S. R. (1990). Breeding for bruchid resistance in cowpea. In: Fuji K, Gatehouse AMR & Yoshida T (Editors), *Bruchids and Legumes: Economy, Ecology and Coevolution*. Kluwer, Dordrecht, 219-228.

SINGH, B. B., SINGH, S. R., ADAJI, O. (1985). Bruchid resistance in cowpea. *Crop Science*, 25: 736-739.

SHUTOV, A. D., BRAUN, H., CHESNOKOV, Y. V., BÄUMLEIN, H. (1998). A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. *European Journal of Biochemistry* 252, 79-89.

- SHUTOV, A. D., KAKHOVSKAYA, I. A. (2011) Evolution of seed storage globulins and cupin superfamily. *Molecular Biology* 45, 529–535.
- SHUTOV, A. D., KAKHOVSKAYA, I. A., BRAUN, H., BÄUMLEIN, H., MÜNTZ, K. (1995). Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *Journal of Molecular Evolution* 41, 1057–1069.
- SILVA, C. P., Terra, W. R., LIMA, R. M. (2001). Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 18-28.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- SOUTHGATE, B. J. (1979). Biology of Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, v. 24, p. 449-473.
- SOUZA, S. M. (2009). Absorção e compartimentalização de vicilinas de *Vigna unguiculata* em *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- SOUZA, S. M., UCHÔA, A. F., SILVA, J. R., SAMUELS R. I., OLIVEIRA, A. E. A., OLIVEIRA, E. M., LINHARES, R. T., ALEXANDRE, D., SILVA, C. P. (2010). The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Journal of Insect Physiology*, doi:10.1016/j.jinsphys.03.009.
- SUGIMURA, M., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M. (2001). Selective transport of the mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 47, 1133-1138.
- TELLAM, R. L., EISEMANN, C. H. (1998). Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-

instar larval antigens. *International Journal for Parasitology* 28, 439–450.

TERRA, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., (2005). Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4, Elsevier, Oxford, p. 171-224. Editado por Gilbert L.I., Latrou K. & Gill S.S.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., BASTOS, F., (1985). Phylogenetic consideration of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 15, 443–449.

TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, G. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, volume 76, 4330-4335.

TSYBINA, T. A., DUNAEVSKY, Y. E., BELOZERSKY, M. A., ZHUZHNIKOV, D. P., OPPERT, B., ELPIDINA, E. N., (2005). Digestive proteinases of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Larvae: purification and Characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, p. 300-305.

UCHÔA, A. F., DaMATTA, R. A., RETAMALI, C. A., ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., SOUZA, S. M. de, SAMUELS, R. I., SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology* 52, 169-178.

VATS, L. K. (1976). Alimentary canal in bruchid larvae (Bruchidae: Coleoptera). *Research Bulletin Punjab University* 27, 103–106.

VINOKUROV, K. S., ELPIDINA, E. N., OPPERT, B., PRABHAKAR, S., ZHUZHNIKOV, D. P., DUNAEVSKY, Y. E., BELOZERSKY, M. A., (2006). Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 145, 126–137

WANG, P., GRANADOS, R. R. (2001). Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 110–118.

WIEMAN, K. F.; NIELSEN, S. S. (1988). Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoecslides obtectus* say (Coleoptera:Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 419-426.

WIGGLESWORTH, V.B. (1943). The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* 131, 313–339.

XAVIER-FILHO J., (1991). The resistance of seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 75-77.

XAVIER-FILHO, J. (1992). *R. Bras. Fisiol. Veg.* 4(1):1-6

XAVIER-FILHO J, CAMPOS, F. A. P., ARY, M. B., SILVA, C. P., CARVALHO, M. M. M., MACEDO, N. L. R., LEMOS, F. J. A., GRANT, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J Agric Food Chem* 37. 1139-1143

YUNES, A. N. A., ANDRADE, M. T., SALES, M. P., MORAES, R. A., FERNANDES, K. V. S., GOMES, V. M., XAVIER-FILHO, J. (1998). Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *Science of Food and Agriculture*, 76: 111-116.

ZHANG, J., DRUMMOND, F. A., LIEBMAN, M., HARTKE, A. (1997). Insect Predation of Seeds and Plant Population Dynamics - Department of Applied Ecology and Environmental Sciences, University of Maine, Orono, Maine. *Technical Bulletin* 163, 32p.

ZHU-SALZMAN, K., SHADE, R. E., KOIWA, H., SALZMAN, R. A., NARASHIMHAN, M., BRESSAN, .A., HASEGAWA, P. M., MURDOCK, L. L., (1998). Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of Griffonia simplicifolia lectin II. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 15123–15128.