

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Estudo da antibiose e destino da faseolina (Globulina –
Phaseolus vulgaris) em larvas do caruncho *Callosobruchus
maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

Daniele Kunz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Carlos Peres Silva

Florianópolis 2014

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

Kunz, Daniele

Estudo da antibiose e destino da faseolina (Globulina ?
Phaseolus vulgaris) em larvas do caruncho Callosobruchus
maculatus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) / Daniele
Kunz ; orientador, Carlos Peres Silva - Florianópolis, SC,
2014.

60 p.

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

Inclui referências

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

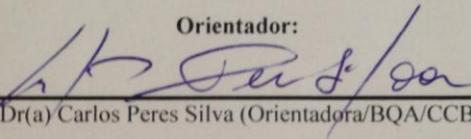
“O estudo da antibiose e destino da faseolina (Globulina – *Phaseolus vulgaris*) em larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)”

por

Daniele Kunz

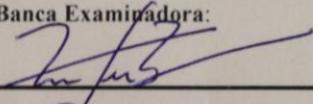
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 05/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

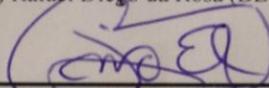


Prof(a) Dr(a) Carlos Peres Silva (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)

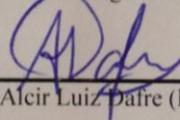
Banca Examinadora:



Prof(a) Dr(a) Rafael Diego da Rosa (BEG/CCB/UFSC)

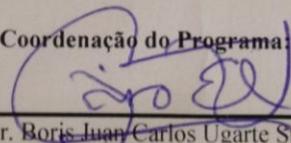


Prof(a) Dr(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Alcir Luiz Dafre (BQA/CCB/UFSC)

Coordenação do Programa:



Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Carlos Peres Silva pelo voto de confiança e pelo estímulo em todos os momentos deste trabalho, por ensinar-me o equilíbrio entre o profissionalismo e a ética e também por compartilhar sua criatividade e sensibilidade.

A todo corpo docente da pós – graduação em Bioquímica.

Ao CEBIME, pelo apoio e oportunidade de desenvolver esta pesquisa em suas dependências, em especial a técnica Martina Blank, que me proporcionou momentos de muita aprendizagem e amizade.

A todos os colegas de laboratório pela companhia e os momentos agradáveis.

Ao Gabriel Braga Oliveira que desde o primeiro dia que cheguei no laboratório me ofereceu sua amizade, carinho e conhecimentos.

Ao meu querido namorado Thiago Picolo, que amorosamente me suportou durante estes dois anos sempre com muito cuidado e zelo que temo, nem sempre, ter retribuído à altura.

À minha família que tanto amo, em especial as duas mulheres da minha vida, minha mãe meu anjo querido, minha irmã que é minha metade, sem vocês eu não sou eu.

Aos meus “pais emprestados” Anilvo Picolo e Olivia Picolo pelo apoio, carinho e confiança.

RESUMO

Neste trabalho foi confirmado o alto poder de toxicidade da proteína de reserva das sementes do feijão comum *Phaseolus vulgaris* (faseolina) sobre as larvas do caruncho praga *Callosobruchus maculatus*. Quando incorporada à dieta das larvas em concentrações fisiológicas (0,5%) a mortalidade das larvas de *C. maculatus* aumentou, tendo como principal fator o acúmulo de vesículas contendo faseolina nos enterócitos e o comprometimento do tráfego vesicular. O destino das globulinas de reservas das sementes de *Vigna unguiculata* (vicilina) e de *P. vulgaris* (faseolina) foi acompanhado por microscopia de fluorescência, através de cortes por congelamento (criostato). Ao se alimentar as larvas do caruncho com a vicilina/FITC e faseolina/FITC notou-se diferença no processo absorptivo das globulinas entre as dietas testadas. O epitélio intestinal das larvas alimentadas com faseolina/FITC apresentou maior fluorescência do que as larvas alimentadas com vicilina. Foi isolado a partir do epitélio intestinal das larvas do caruncho *C. maculatus* uma proteína, utilizou-se uma coluna de afinidade onde a vicilina foi mobilizada de forma covalente e esta proteína apresenta alta homologia com a proteína transportadora de α -tocoferol (precursor da vitamina E), evidenciando assim que as vicilinas se ligam aos receptores na membrana das microvilosidades e posteriormente, podem ser absorvidas em forma de vesículas no interior das células epiteliais do intestino médio das larvas, sendo possivelmente este processo um caso de endocitose mediada por receptor. Estes achados sugerem um novo mecanismo de antibiose, envolvendo acúmulo de vicilinas/faseolinas no epitélio intestinal das larvas do caruncho *C. maculatus* e o comprometimento dos processos endocíticos. Este mecanismo envolve provavelmente a ligação da vicilina/faseolina a uma proteína homóloga a proteína transportadora de α -tocoferol, causando assim a morte dos insetos pela falta da absorção de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento como a vitamina E.

Palavra- chave: *Callosobruchus maculatus*, faseolina, antibiose.

ABSTRACT

This work confirmed the high toxicity of the storage protein from the seeds of the common bean *Phaseolus vulgaris* (phaseolin) on the larvae of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. When incorporated into the diet of the larvae at physiological concentrations (0.5 %) larval mortality of *C. maculatus* increased. The main factor involved seems to be the accumulation of vesicles containing phaseolin in the enterocytes leading to the impairment of vesicular traffic. The fate of the seed storage globulins from cowpea *Vigna unguiculata* (vicilin) and from *P. vulgaris* (phaseolin) was monitored by fluorescence microscopy after cryostat microtomy. By feeding bean beetle larvae with vicilin/ FITC and phaseolin/ FITC noticed a difference in the absorptive process of globulins among the tested diets. The intestinal epithelium of larvae fed phaseolin/ FITC showed higher fluorescence than larvae fed vicilin. A membrane bound protein has been isolated from the intestinal epithelium of larval *C. maculatus* by using an affinity column where the vicilin was covalently mobilized to sepharose. This protein has a high homology with the α -tocopherol (vitamin E precursor) transfer protein. These data suggest that the vicilin molecule binds to receptors in the microvillar membrane and subsequently it may be absorbed inside vesicles within the epithelial cells of the larval midgut. This process may be a case of receptor-mediated endocytosis. These findings suggest a new mechanism of antibiosis, involving accumulation of vicilin variants and phaseolin in the intestinal epithelium of the *C. maculatus* larvae and commitment of endocytic processes. This mechanism probably involves the binding of vicilin/phaseolin protein homologous to a α -tocopherol transfer protein, thereby killing the insect by the lack of absorption of important nutrients for development, such as the vitamin E.

Keyword: *Callosobruchus maculatus*, phaseolin, antibiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Insetos adultos da subfamília Bruchinae.....	24
Figura 2- Ciclo de desenvolvimento dos insetos da subfamília Bruchinae.	28
Figura 3- Ciclo de vida do inseto <i>C. maculatus</i> demonstrando as sementes atacadas o inseto adulto, larva e pupa.	29
Figura 4- Efeito da incorporação de faseolina e vicilina suscetível na sobrevivência de larvas do inseto <i>C. maculatus</i> . As larvas foram transferidas de sementes naturais de <i>V. unguiculata</i> (primeiro instar) para cápsulas de gelatina contendo misturas das proteínas purificadas faseolina e vicilina suscetível (0,5%, m/m) e farinha de cotilédones de <i>V. unguiculata</i> como excipiente nos tempos indicados.....	48
Figura 5- Corte do epitélio intestinal das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com as proteínas purificadas vicilina ou faseolina marcadas com FITC. A) Larva de 1 ^o instar alimentada com faseolina marcada; B) Larva do 1 ^o alimentada com vicilina suscetível marcada; C) Larva do 4 ^o instar alimentada com vicilina suscetível marcada D) Larva do 4 ^o alimentada com faseolina marcada. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen.	49
Figura 6- Corte do epitélio intestinal das larvas de 1 ^o instar de <i>C. maculatus</i> alimentadas com a proteína purificada faseolina marcada com FITC. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen; V- Vesículas.	49
Figura 7- Cortes do epitélio intestinal das larvas de 1 ^o instar de <i>C. maculatus</i> alimentadas com as proteínas purificadas vicilina suscetível (A) e faseolina (B) marcada com FITC. Após pulso de 24h com alimentação das proteínas purificadas e marcadas com FITC estas ficaram por 0h, 24h,48,72 e 96h em alimentação contendo apenas farinha de <i>V. unguiculata</i> sem marcação.....	50
Figura 8- Corte do epitélio intestinal das larvas de 4 ^o de <i>C. maculatus</i> alimentadas com as proteínas purificadas faseolina e vicilina suscetível marcada com FITC. Após pulso de 24h com alimentação com as proteínas purificadas e marcadas estas ficaram por 24h, 48h,72 e 96h em alimentação contendo apenas farinha de <i>V. unguiculata</i> sem marcação.....	51

Figura 9 A) Corte do epitélio intetinal da larva de 1º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentada com proteína purificada faseolina e marcada com FITC. B) Larva de 1º instar de *Callosobruchus maculatus*, seccionadas em criostato e coradas com a técnica HE. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen..... 53

Figura 10- Distribuição de fluorescência entre o intestino médio e o corpo gorduroso de larvas do 3º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas faseolina ou vicilina suscetível marcadas com FITC. As cores mostradas seguem o esquema onde o vermelho indica maior intensidade de fluorescência e a verde menor intensidade. 54

Figura 11 - Distribuição de fluoreescência em micro tubos das frações particuladas e solúveis obtidas a partir de homogeneizados do intestino médio e do corpo gorduroso de larvas do 3º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas faseolina ou vicilina suscetível marcadas com FITC..... 54

Figura 12 – Efeito do pH na dissociação de faseolina e vicilina marcadas entre as frações solúvel e particulada após pulso de alimentação seguido ou não de jejum. A) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas a membranas logo após pulso de alimentação; B) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas à fração solúvel logo após pulso de alimentação; C) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas a membranas após pulso de alimentação seguido de jejum por 24 h; D) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas à fração solúvel após pulso de alimentação seguido de jejum por 24 h..... 55

Figura 13- “Western blot” das larvas de *C. maculatus* alimentadas com faseolina e vicilina suscetível 1%. P) indica faseolina em 0h e 24h após alimentação V) indica vicilina susetível em 0h e 24h após alimentação a alimentação. 56

Figura 14 – Determinação através de ELISA da concentração de faseolina ou de vicilina nas frações de membrana e solúvel dos enterócitos após pulso de alimentação em dietas suplementadas com essas proteínas. Os dados mostrados são representativos de 3 determinações independentes contendo 15 animais em cada..... 57

Figura 15- Demonstrando o deslocamento das vicilinas (vicilina suscetível/ faseolina) marcada com FITC, incubadas com diferentes concentrações, os poço indicam a quantidade em µl de proteína. A) Faseolina sobrenadante e sedimento; B) Vicilina suscetível sobrenadante e sedimento. 58

Figura 16- Ligação da faseolina e vicilina suscetível em microvilosidades intestinais das larvas de *C. maculatus* com diferentes concentrações. 59

Figura 17 - Perfil de eluição de proteínas de microvilosidades intestinais das larvas *C. maculatus* obtidas a partir de cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-vicilina. 60

Figura 18- Amostras obtidas na cromatografia de afinidade sepharose-vicilina, no painel A, gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) corado com prata; B) As mesmas frações foram aplicadas em gel de eletroforese e posteriormente incubado em solução faseolina- FITC a uma concentração de 1%..... 61

Figura 19- Tabela com as anotações feitas a partir das diferentes sequências obtidas após espectrometria de massa (Maldi-Tof) dos picos 2 e 3 da cromatografia de afinidade sepharose-vicilina. 62

Figura 20- Estrutura do tocoferol, número e posições de radicais metila (-CH₃) na sua molécula..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA – Ácido bicinconínico

BSA – Albumina sérica bovina

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TEMED – Tetrametiletilenediamina

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Solução salina em tampão fosfato

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

HE- Hematoxilina eosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	21
1.2 INSETOS DA ORDEM COLEOPTERA	25
1.3 O BRUQUÍDEO <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)	26
1.4 MORFOLOGIA INTESTINAL E CORPO GORDUROSO – <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i>	29
1.5 VICILINAS E FASEOLINAS.....	30
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
2.2.1 Propor um mecanismo de ação da faseolina sobre o <i>C. maculatus</i>	35
2.2.2 Investigar o destino da faseolina nos insetos.	35
2.2.3 Purificar um receptor epitelial específico para vicilinas presente nas microvilosidades.	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 COLÔNIA DE INSETOS	37
3.2 MARCAÇÃO DE VICILINA COM FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA)	37
3.3 ALIMENTAÇÃO DE LARVAS USANDO SEMENTES ARTIFICIAIS.....	37
3.4 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE INSETOS PARA MICROATOMIA (CRIOSTATO)	38
3.5 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE CRIOSTATO PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	39
3.6 COLORAÇÃO DOS CORTES COM HEMATOXILINA E EOSINA	39
3.7 DETERMINAÇÕES DE PROTEÍNAS.....	39

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (LAURIL SULFATO DE SÓDIO)	39
3.9 COLORAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO COM NITRATO DE PRATA.....	40
3.10 “WESTERN BLOTTING”	41
3.11 PREPARAÇÕES DE MICROVILOSIDADES	41
3.12 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO ENTRE DIFERENTES VICILINAS PELA LIGAÇÃO ÀS MICROVILOSIDADES ISOLADAS	42
3.13 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICO (ELISA) .	42
3.14 PURIFICAÇÃO DE UM RECEPTOR DE VICILINAS PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES DOS ENTERÓCITOS DAS LARVAS DE <i>C. MACULATUS</i>	43
3.15 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DAS VICILINAS A PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS MICROVILOSIDADES DOS ENTERÓCITOS	43
3.16 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOFF)	44
3.17 ISOLAMENTOS DE MEMBRANAS INTERNAS DOS ENTERÓCITOS	44
3.18 VERIFICAÇÃO DO DESTINO DAS VICILINAS	Erro!
Indicador não definido.	
4 RESULTADOS.....	47
4.1 EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FASEOLINA NA DIETA DE LARVAS DE <i>C. MACULATUS</i>	47
4.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE FASEOLINA NOS ÓRGÃOS INTERNOS DAS LARVAS DE <i>C. MACULATUS</i>	48
4.3 DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO DE FASEOLINA E VICILINA ÀS MEMBRANAS MICROVILARES DOS ENTERÓCITOS.....	57
4.4 PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE VICILINAS PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE VICILINA-SEPHAROSE	59

5. DISCUSSÃO	63
5.1 RESISTÊNCIA DOS CARUNCHOS	63
5.2 RESISTÊNCIA DA VICILINA DE <i>P. VULGARIS</i> AO <i>C. MACULATUS</i>	65
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) estima-se que até 2040 a população mundial deva ter seu tamanho dobrado. Frente a isto, a produção de alimentos e produtos de agricultura deve aumentar proporcionalmente sendo importantes algumas estratégias para o aumento dessa produção como o avanço tecnológico e biotecnológico das espécies cultivadas buscando, assim, um melhoramento genético visando um menor consumo de inseticidas, fungicidas e fertilizantes, para que estas melhorias não se tornem um custo adicional para o agricultor.

Atualmente, a importância do controle biotecnológico contra os insetos-praga tem alcançando uma escala bastante elevada nas pesquisas ao redor do mundo, visando uma redução no uso dos agrotóxicos, pois já é sabido que estes são extremamente prejudiciais ao meio ambiente. Biotecnologia é o uso e a manipulação de organismos vivos, ou substâncias obtidas destes organismos, para fazer produtos de valor para o homem, segundo BORÉM (2004) novas ferramentas de manipulação e transferência gênica permitem o desenvolvimento de plantas e animais modificados com grande vantagem, gerando grandes desafios nesta era de globalização. O melhoramento genético de plantas é uma das alternativas ecologicamente mais eficazes e de menor custo para o produtor sendo que este pode ter um aumento na produtividade de seus cultivares.

O melhoramento genético via biotecnologia é uma estratégia bastante promissora, podendo elevar a produção agrícola mundial reduzindo as perdas na colheita decorrentes de pragas e doenças e elevando a produtividade das lavouras (BORÉM et al., 2004). A introdução de genes específicos que conferem resistência a insetos pragas em variedades geneticamente modificadas reduz a necessidade do uso de agrotóxicos, contribuindo assim para uma menor poluição ambiental e a produção de alimentos a preços mais acessíveis para uma melhor qualidade de vida (JAMES 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

O feijão caupi (*Vigna unguiculata*), também conhecido como feijão de corda, feijão-macassar e feijão-fradinho é uma Fabacea de fundamental importância socioeconômica para a Região Nordeste brasileira. De fácil manejo, cultivada principalmente pelas comunidades do semiárido Nordestino, apresenta ciclo de desenvolvimento rápido e tolerante às condições de estresse hídrico em razão da frequência e distribuição pluviométrica irregulares, fenômeno bastante recorrente para a Região Nordeste. Outros países localizados nos trópicos e subtropicais, cujo clima favorece o desenvolvimento da espécie, também apresentam consumo considerável, em especial os do oeste da África (SINGH 1985). Grãos de plantas leguminosas possuem elevado valor nutricional e são amplamente consumidos por todas as classes, sendo, portanto, relevantes também sobre o ponto de vista econômico (GATEHOUSE, 1984). As perdas anuais resultantes dos ataques de insetos às plantações chegam à cifra de 30%, resultando em danos relativamente maiores para as populações carentes (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

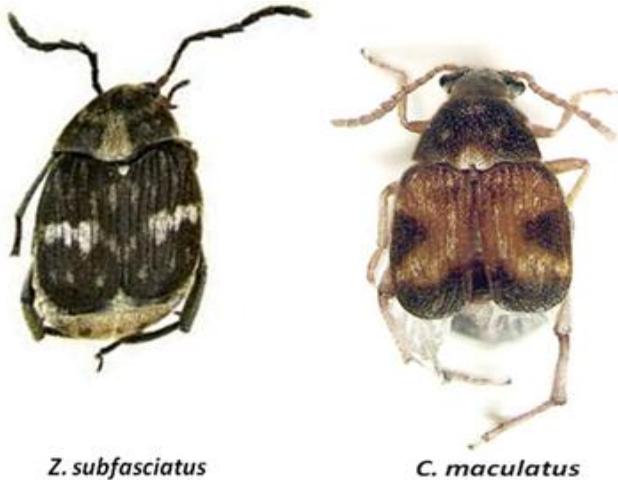
O agravamento da fome nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é um reflexo do crescimento exponencial da população, que não é acompanhado, na mesma escala, por aumento da produção de alimentos. Essas perdas em alimentos e energia em potencial podem ser reduzidas com o emprego em grande escala de inseticidas, mas essa estratégia tem se mostrado cada vez mais onerosa aos produtores e danosa ao meio ambiente. Além disto, raças resistentes têm sido selecionadas, o que gera um ciclo vicioso, no qual maiores doses de inseticidas se tornam necessárias. Meios de controle baseados na biologia dos insetos e das plantas, os chamados meios de controle biorracionalis, têm recebido cada vez mais atenção, tanto nos meios de entomologia médica quanto agrônômica. Semente de leguminosas (Fabaceae) como o feijão de corda (*V. unguiculata*) e o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) são importantes fontes de proteína na dieta, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

O feijão de corda (*V. unguiculata*) é um dos tipos de produtos de crescente demanda de produção e de grande importância econômica que pode ser atacado durante o armazenamento por diferentes pragas, tendo o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) como

sua principal praga em condições tropicais e subtropicais (LIMA et al., 2002). O feijão comum *P. vulgaris* é uma leguminosa que apresenta resistência ao caruncho *Callosobruchus maculatus* (figura 1), mas não está livre de todos os ataques por carunchos pragas. *Zabrotes subfasciatus* (figura 1) causa danos significativos onde quer que os feijões estejam crescidos ou armazenados (GIGA et al., 1990). Causando nas sementes tanto de *V. unguiculata* como *P. vulgaris* a perda do peso da semente atacada, redução no valor nutritivo danos decorrentes da penetração e a alimentação das larvas nas sementes geram perdas muito significativas na qualidade do produto, com diminuição da sua massa, valor nutritivo e viabilidade como semente. As imperfeições e insuficiência no grau de higiene são mal aceitos pelos consumidores, o que reduz também seu valor comercial (JACKAI & DAOUST, 1986).

A principal predação pelas pragas acontece no período pré-colheita, onde ocorre o ataque às sementes e posteriormente à colheita e durante o seu armazenamento (JANZEN, 1971 e 1980). Este processo de predação de sementes por coleópteros é comum, geralmente ocorrendo em frutos maduros (LISBOA, 1975). Dificilmente é possível identificar a infestação a tempo, pois, esse tipo de ataque pode não ser constatado no momento da colheita, mas na secagem e armazenamento das sementes sendo que, as larvas se desenvolvem em seu interior consumindo parte ou todo seu material de reserva (KAGEWAYA & PINA-RODRIGUES, 1993). A infestação das sementes e das vagens pode ocorrer no campo ou em grãos estocados sob condições precárias. Aspectos da biologia do inseto, como o fato de serem áfagos (não se alimentam e nem bebem água na idade adulta), favorecem a expansão da espécie em ambientes secos, como é característico no local de estocagem de sementes.

Figura 1- Insetos adultos da subfamília Bruchinae



Fonte: www.zin.ru/animalia/coleoptera/eng/calmacdk.htm.

Estudos na área de interação inseto-plantas têm revelado que as plantas defendem-se dos insetos produzindo substâncias químicas que os repelem ou intoxicam, muitas vezes através da desorganização das suas funções digestivas (MOSOLOV ET AL., 2001; TERRA & FERREIRA, 2005).

Sabe-se nos dias de hoje da existência de um grande número de estratégias de defesa natural que são utilizadas pelas plantas quando atacadas por patógenos herbívoros ou quando submetidas a condições ambientais diversas. Atualmente, essas proteínas de defesa são macromoléculas encontradas nos diferentes tecidos vegetais, na forma de componentes constitutivos, fazendo parte da planta ou então sendo sintetizados em resposta ao ataque de pragas e patógenos (MELLO & SILVA FILHO, 2002). Dentro deste enfoque, genes que levam à expressão de proteínas potencialmente tóxicas já foram inseridos em plantas de interesse econômico, que se tornaram resistentes aos insetos, como é o caso dos inibidores protéicos de tripsina e de α -amilases de origem vegetal, entre outros (HILDER et al., 1987; MOSOLOV et al., 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

O maior desenvolvimento de meios de controle biorracionais, no entanto, requer um melhor conhecimento do sistema digestório dos insetos, uma vez que a tecnologia de transferência de genes

entre diferentes organismos já se encontra bem avançada, porém, o conhecimento de alvos para serem explorados ainda é reduzido. Provavelmente por este motivo as últimas décadas do século passado mostraram um desenvolvimento das pesquisas em digestão de insetos sem paralelo nas décadas anteriores. Isto pode ser explicado pelo fato de que as funções digestivas em insetos representam um modelo riquíssimo de informações, seja do ponto de vista da fisiologia comparada, uma vez que a classe Insecta possui representantes adaptados a uma multiplicidade enorme de habitats e hábitos alimentares, seja porque o sistema digestório representa uma das principais interfaces entre o meio interno do inseto e seu meio ambiente, e que por isto, se torne uma das mais promissoras fontes de alvos para serem explorados em técnicas de controle biorracional (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; TERRA & FERREIRA, 2005).

1.2 INSETOS DA ORDEM COLEOPTERA

O grupo dos bruquídeos (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae), é constituído por besouros que se alimentam de sementes principalmente de leguminosas (Fabaceae), por isso a importância das diferentes culturas de feijões, ervilhas e soja só reforçando a importância do estudo nesse grupo.

Com o número estimado de 350.000 a 375.000 espécies descritas, Coleoptera é a maior ordem dos insetos. Corpo altamente esclerotizado; asas anteriores esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas (élitros) que cobrem as asas posteriores e o corpo; asas posteriores membranosas, frequentemente reduzidas ou ausentes; peças bucais mastigadoras; antenas geralmente com oito a 11 "artículos"; protórax grande e móvel; mesotórax reduzido; abdômen tipicamente com cinco (ou até oito) segmentos; sem ovipositor; genitália masculina retrátil (BRUSCA & BRUSCA, 2007).

A espécie *Callosobruchus maculatus* (figura 1) do bem sucedido gênero *Callosobruchus* de brocas de sementes do velho mundo, originalmente restrita aos continentes africano e asiático está sempre presente em regiões tropicais e subtropicais de todo mundo pelo comércio de grãos (SOUTGHATE, 1979). Estes pequenos coleópteros foram primeiramente descritos em 1775 por Fabricius e recentemente foram reclassificados, deixando a antiga família dos bruquídeos e passando a compor a

família Chrysomelidae, mais especificamente a subfamília Bruchinae. Sua origem atribuída ao velho mundo, provavelmente no continente africano, acredita-se que sua distribuição extensa e descontínua se deu através do transporte comercial dos grãos que a espécie ataca (CREDLAND, 1987).

A espécie ataca preferencialmente sementes secas e maduras de feijões azuki (*Vigna angularis*), mungo (*Vigna radiata*) e, preferencialmente o feijão de corda (*Vigna unguiculata*) tendo pouco ou nenhum sucesso em outras sementes de leguminosas (JAZEN, 1971). O que mostra a complexidade da interação inseto – planta, dado que as sementes de leguminosas estão entre outros grãos mais bem defendidos quimicamente (ALEXANDRE et al., 2011).

Os coleópteros da família Chrysomelidae são as maiores pragas de legumes cultivados pelo fato de se desenvolverem no interior das sementes e consumirem as mesmas que são destinadas ao consumo humano (SOUTGHATE, 1979). Os crisomelídeos estão associados com as sementes de plantas leguminosas através de processos co-evolutivos. Estes processos têm permitido aos carunchos se desenvolverem no interior destas sementes repletas de compostos tóxicos, em contraste à maioria dos outros agressores potenciais. A associação entre os bruquídeos e as sementes de leguminosas é altamente específica (SALES et al., 2000).

1.3 O BRUQUÍDEO *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)

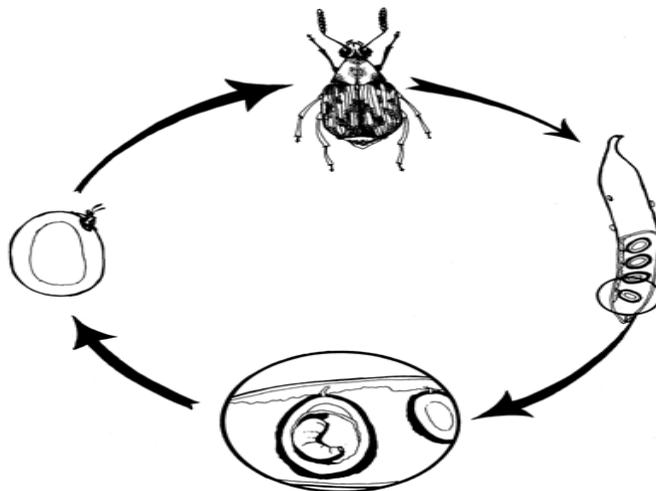
Nas zonas tropicais do Oeste da África, o *C. maculatus* se desenvolve em sementes de espécies selvagens e cultivadas do feijão de corda, (*V. unguiculata*). Este inseto é a principal praga das sementes de *Vigna* (SINGH et al., 2000), no entanto, não ataca sementes do feijão-comum, *Phaseolus vulgaris*, devido à presença de inibidores de α -amilases (XAVIER-FILHO, 1993). São insetos de aproximadamente 3 mm de comprimento, cabeça preta com antenas contendo 11 segmentos ligeiramente serrilhados, tórax preto com pubescências douradas, apresentando nos élitros manchas amarronzadas que em repouso formam um "X". Para o desenvolvimento do inseto, a condição ideal é referida como temperatura de 29 °C e 65 % de

umidade relativa, sendo o período médio de desenvolvimento de 23 dias (QUINTELA et al., 1991).

O enquadramento taxonômico do *C. maculatus* conforme (TRIPLEHORN et. al. 2001) pode ser descrito como: Reino Animalia; Filo Arthropoda; Classe Insecta; Ordem Coleoptera; Família: Chrysomelidae; Subfamília: Bruchinae; Gênero *Callosobruchus*; Espécie *Callosobruchus maculatus*. O ciclo biológico destes besouros se inicia quando a fêmea deposita individualmente os ovos sobre a superfície das sementes, ou mais raramente na vagem da leguminosa. Em ambos os casos a larva eclode do ovo em até 24 horas e atravessa o tegumento da semente em direção ao interior do grão (figura 2). Já dentro do cotilédone do feijão, o animal se alimenta de seu conteúdo para suprir suas necessidades nutricionais e desse modo forma galerias por onde se movimenta. Neste ambiente o animal realiza metamorfose completa, passando por quatro instares larvais e pelas fases de pré-pupa, pupa e adulto. A forma adulta tem duração média de sete a nove dias (Figura 3) e apresenta-se na proporção de uma fêmea para um macho, sendo, portanto, a razão sexual apresentada de 1:1 (GALLO et al., 2002). Nesta fase adulta é comum o dimorfismo sexual, onde as fêmeas são maiores que os machos as quais põem em média 80 ovos (QUINTELA et al., 1991) nas superfícies das sementes. O ovo é branco de forma subelíptica, com comprimento de aproximadamente 0,5 mm e largura de 0,3 mm. Ao eclodirem, liberam larvas de forma curva e cor branca, que penetram nas sementes consumindo apenas o seu conteúdo interno (SOUTHGATE, 1979; CREDLAND & DENDY, 1992).

Durante os estágios finais as larvas possuem cor marrom, apresentam vestígios de asas, patas e olhos (BASTOS, 1981). Completado o desenvolvimento, os insetos emergem preparando um orifício circular conhecido como janela pupal, por onde emergirá facilmente quando estiver na forma adulta deixando galerias nas sementes (WILLIAMS, 1980). Quando no interior de sementes que se encontram em estocagem, os adultos ao emergirem destas podem produzir muitas gerações, sem se alimentarem (JOHNSON, 1989).

Figura 2- Ciclo de desenvolvimento dos insetos da subfamília Bruchinae.



Fonte: www.fao.org/DOCREP/006/Q2585E/Q2585E08.gif

Figura 3- Ciclo de vida do inseto *C. maculatus* demonstrando as sementes atacadas o inseto adulto, larva e pupa.



Infestação – Oviposição pelas fêmeas



Callosobruchus maculatus - Adulto



Pupa



Larva 4^o instar

Fonte: www.wikipedia.org/wiki/Callosobruchus_maculatus

1.4 MORFOLOGIA INTESTINAL E CORPO GORDUROSO – *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*

Nos carunchos a morfologia intestinal é simples, onde se observa o intestino anterior bem reduzido, incluindo apenas a boca com glândulas salivares, a faringe e o esôfago. O aparelho digestivo é basicamente formado por um longo tubo que percorre o corpo do animal no sentido longitudinal e está dividido em três compartimentos: anterior ou estomodeu (onde ocorre o processamento inicial do alimento), médio ou mesêntero (realiza secreção de enzimas, hidrólise e absorção dos produtos da hidrólise) e posterior ou proctodeu (onde se dá a formação e o

armazenamento das fezes e a recuperação da água) (RUPPERT et al., 2005).

As estruturas apresentam revestimento cuticular para impedir absorção de moléculas hidrofílicas nesta região. Já o ventrículo, cuja função é manter simbioses e ampliar a área de secreção e absorção, é parte do intestino médio. Com abundância de enzimas proteolíticas, possui seu epitélio composto por uma única camada de células e ao contrário da maioria dos insetos, os carunchos não apresentam membrana peritétrica, uma estrutura anatômica quitina-proteica que reveste o bolo alimentar em vários outros artrópodes. Também na parte terminal desta região se estabelecem os túbulos de Malpighi, órgãos envolvidos na excreção, que se ramificam ao redor do tubo alimentar filtrando os fluídos do organismo e levando as excretas nitrogenadas até o intestino para serem eliminadas junto às fezes. (VATS, 1976; MICHAUD et al., 1995; PANIZZI, 2012).

O corpo gorduroso é geralmente descrito como um tecido uniforme de origem mesodérmica (SNODGRASS, 1956; CHAPMAN, 1998; JENSEN & BORGESSEN, 2000) bastante evidente na cavidade do corpo dos insetos. Distribui-se dentro desta cavidade e apresenta uma ampla variedade de arranjos (cordas, grupos, ou lóbulos) (SMITH, 1968; CHAPMAN, 1998), revestidos de uma delicada membrana de tecido conjuntivo, a fim de aumentar a superfície de contato com o sangue (WIGGELESWORTH, 1974). É capaz de responder a necessidades fisiológicas e bioquímicas de várias maneiras, incluindo as altas taxas de biossíntese de proteínas, formação e liberação de trealose, liberação de lipídeos, detoxificação de excretas, e biossíntese de hormônios (STANLEY & BEDICK, 1997).

1.5 VICILINAS E FASEOLINAS

No início dos anos 70 foram analisadas cerca de 6.000 linhagens do feijão de corda do banco de germoplasma do IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical) na Nigéria para verificar quais apontariam resistência a *C. maculatus*. Somente uma dessas linhagens apontou resistência TVu 2027, coletada no Vale do Rima, Estado de Sokoto, na Nigéria (SINGH & RACHIE, 1985). Tempos mais tarde conseguiu-se totalizar um

número de 8.000 espécies analisadas encontrado assim mais dois exemplares apontando semelhança na resistência (TVu 11952 e TVu11953). Mostrou-se que a resistência estava ligada a dois genes recessivos sendo estes os mesmos nas três espécies. Pesquisadores do IITA incorporaram à resistência ao *C. maculatus* em diferentes cultivares (SINGH & SINGH, 1982). GATEHOUSE et al. (1979) mostraram que a resistência nas sementes de *V. unguiculata* era devido aos altos níveis de inibidores de tripsina encontrados nestas sementes. No entanto, Xavier Filho et al. (1989) mostraram que a resistência ao bruquídeo era devido à fração globulínica. Posteriormente, foi provado que as vicilinas, globulinas 7S de reserva das sementes eram responsáveis pela toxicidade a *C. maculatus* (MACEDO et al., 1993).

Vicilinas são proteínas de reserva com massa molecular variando entre 150 e 190 kDa geralmente formada por trímeros (DERBYSHIRE et al., 1976; KHAN et al., 1980). Sendo estas proteínas em sua maioria alterada por proteólise durante o processo pós - tradução por isto originam um grande número de pequenos polipeptídeos (HIGGINS, 1984). Esta característica pode também ser resultado da adição incompleta ou degradação parcial da ligação dos oligossacarídeos nas cadeias laterais dos peptídeos tornando difícil sua digestão por insetos (MACEDO et al., 1995). Estudos recentes mostraram que vicilinas podem ligar-se a células absorptivas presentes como constituintes do tecido do intestino médio de *C. maculatus*, podendo também ser internalizada no corpo gorduroso ou até mesmo permanecer na hemolinfa tanto em insetos adultos como larvas. A absorção de vicilina e sua presença em tecidos de bruquídeo são similares ao um sequestro de compostos secundários, causando danos para o inseto (UCHÔA et al., 2006).

A faseolina é uma proteína de reserva, assim como a vicilina, mas está presente apenas nas sementes do feijoeiro *P. vulgaris*. Também pertencente à família de proteínas globulinas 7S, consiste numa estrutura trimérica mista, contendo domínios em α -hélice e β -barril. Sementes do gênero *Phaseolus* se caracterizam por apresentar uma superfamília de proteínas potencialmente tóxicas que englobam inibidores de α -amilases, lectinas e arcelinas. Trabalhos clássicos demonstraram que inibidores de α -amilases são particularmente tóxicos para

bruquídeos pragas do velho mundo, como o já citado *C. maculatus*, além das espécies *C. chinensis* e *Bruchus pisorum* (ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996).

No feijão comum (*P. vulgaris*), foi demonstrada a presença de quatro inibidores de α -amilase, chamados α AI-0, α AI-1, α AI-2 e α AI-3, distinguidos cada um quando comparamos às ligações de glicopeptídeos na faixa de 14 a 20 kDa (ISHIMOTO et al., 1995). O inibidor de α -amilase (α AI-1), encontrado no feijão comum na quantidade aproximada de 1% (m/m) (SHADE et al., 1994), é ativo contra a amilase digestiva do bruquídeo que ataca o feijão de corda impedindo assim que o inseto degrade os carboidratos que constituem a semente. Quando observado a nível microscópico o conteúdo luminal do intestino do inseto que se alimentou com uma dieta rica em α AI-1 revelou-se uma grande acumulação de grânulos de amido não digeridos (GATEHOUSE et al., 1996). No trabalho realizado por ISHIMOTO e colaboradores (1996) observou-se que o inibidor α AI-1 prevenia o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *C. maculatus*, relacionando com a privação que ele impõe ao inseto por este não possuir maquinaria enzimática eficiente para digerir a fonte de carboidrato da semente. Existem evidências para indicar que os inibidores de α -amilase do gênero *Phaseolus* possam ter evoluído de uma proteína ancestral que compartilha semelhança estrutural com a lectina do feijão (ISHIMOTO et al., 1999). Sabe-se também que uma proteína similar ao inibidor de α -amilase (α -amylase inhibitor-like, AIL) pode causar antibiose contra os bruquídeos não adaptados (ISHIMOTO et al., 1999).

Dentre os componentes de reserva presentes nas sementes *P. vulgaris* estão as fitohemaglutininas A (PHA). Esta substância apresenta, dentre outras funções, a capacidade de proteger as plantas contra ataques de patógenos, como fungos e bactérias, auxiliar o transporte de açúcares e mediar relações de simbiose. Segundo JANSEN (1979) tanto as fitohemaglutininas, como os inibidores de tripsina, podem ser responsáveis por conferir resistência à planta contra ataques de insetos herbívoros, como o *C. maculatus*.

Dados obtidos em nosso laboratório confirmam nossas suspeitas que a faseolina tem poder de toxicidade sobre o inseto *C. maculatus*, o que pode complementar o entendimento dos mecanismos de resistência de sementes de leguminosas a

bruquídeos e a adaptação destes animais a essas proteínas potencialmente tóxicas. Estes resultados são bastante animadores, pois, um dos primeiros exemplos de plantas transgênicas que codificam proteínas heterólogas foi descrita no ano de 1987 por HILDER e colaboradores, onde foi expresso o inibidor de tripsina do feijão de corda nas folhas de tabaco conferindo resistência contra as larvas de lepidópteros. Então, de encontro com exposto acima, e para contrapor-se à enorme capacidade adaptativa dos insetos pragas, é necessário preconizar a introdução de múltiplos genes de resistência para a geração de plantas transgênicas futuras a serem desenvolvidas. É dentro deste contexto que nosso trabalho foi inspirado, onde o objetivo final foi de fornecer mais informações a respeito do potencial adaptativo dos insetos pragas a proteínas potencialmente tóxicas e, assim, desenvolver melhores estratégias de controle.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial inseticida da proteína faseolina encontrada na semente do feijão comum *P. vulgaris* sobre o caruncho *C. maculatus*, bem como identificar os mecanismos de resistência associados às diferentes vicilinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Propor um mecanismo de ação da faseolina sobre o *C. maculatus*

2.2.2 Investigar o destino da faseolina nos insetos.

2.2.3 Purificar um receptor epitelial específico para vicilinas presente nas microvilosidades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLÔNIA DE INSETOS

A colônia de *Callosobruchus maculatus* foi mantida em sementes de *Vigna unguiculata*, previamente desinfestadas por congelamento a -20°C de qualquer infestação anterior de campo. Essas colônias permaneceram numa sala incubadora a temperatura de 29°C e umidade relativa de 20-30%, no laboratório de Bioquímica de Insetos do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Para os experimentos foram usadas larvas de *C. maculatus* do primeiro ao quarto instar.

3.2 MARCAÇÃO DE VICILINA COM FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA)

O FITC foi covalentemente incorporado a vicilinas de *V. unguiculata* suscetíveis, e faseolina (vicilina de *Phaseolus vulgaris*). O FITC (50 mg em 1 mL de dimetil sulfoxido 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 em faseolina foi removido por diálise contra água destilada. A solução resultante foi liofilizada para posterior utilização.

3.3 ALIMENTAÇÃO DE LARVAS USANDO SEMENTES ARTIFICIAIS

Para acompanhar o destino das faseolinas após ingestão pelas larvas de *C. maculatus*, essas proteínas foram quimicamente marcadas com FITC (ver item 3.2). Ambos os complexos vicilina/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 das cápsulas de gelatina com o auxílio de espátulas e bastões de vidro. As larvas retiradas das sementes de *V. unguiculata* suscetíveis foram transferidas no início do primeiro e do quarto instar, quando as larvas estão

ativamente consumindo sua dieta, para cápsulas de gelatina. As larvas foram transferidas para uma cavidade produzida na massa compactada de farinha em cada metade da cápsula, na proporção de duas larvas por cápsula, perfazendo um número amostral de 10 indivíduos por experimento. Em seguida, as duas metades foram cuidadosamente encaixadas de forma a permitir os movimentos necessários para a alimentação das larvas. As larvas controles utilizadas (10 larvas) também foram alimentadas em cápsulas artificiais, mas na sua dieta encontrava-se apenas farinha de sementes de *V. unguiculata*, sem marcação com o fluorocromo.

Após o pulso de alimentação com as proteínas marcadas (24h), as larvas foram retiradas das cápsulas e imediatamente transferidas para sementes artificiais contendo apenas farinha de sementes de *V. unguiculata* suscetível sem marcação (mesma dieta controle), onde permaneceram por 24h, 48, 72 e 120 h. Alternativamente as larvas após os pulsos de alimentação de 24 h com as proteínas marcadas foram retiradas das cápsulas e mantidas por 24 h sem acesso à alimentação. Neste caso as larvas foram mantidas no interior de micro tubos de 1,5 ml abertos, mantidos no escuro e nas mesmas condições da sala de manutenção dos insetos. Depois deste período, estas foram retiradas das cápsulas ou dos tubos e preparadas para microscopia.

3.4 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE INSETOS PARA MICROTOMIA (CRIOSTATO)

Após alimentação das larvas, estas foram transferidas para soluções de sacarose de diferentes concentrações. Nesta etapa as amostras passaram por três banhos de sacarose. O primeiro banho ocorreu em uma solução 5% de sacarose (m/m) e o segundo banho em uma solução 15% de sacarose (m/m), onde permaneceram por 3h em cada um dos banhos. No terceiro e último banho, as amostras foram submetidas à imersão em uma solução de sacarose 30% (m/m) onde permaneceram por 18h. Após os banhos de sacarose, as amostras foram encaminhadas ao Criostato Leica (Modelo CM1850). As larvas foram colocadas em seus respectivos blocos e preenchidas com a resina Tissue-Tek por 1h, na proporção de 2 larvas por bloco. Ao término deste período estas foram cortadas com uma espessura de 7 μ m e

colocadas em lâminas para visualização em microscopia de fluorescência.

3.5 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE CRIOSTATO PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As lâminas obtidas a partir dos cortes de criostato foram encaminhadas para 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 dos órgãos internos das larvas, tanto de epitélio intestinal quanto de corpo gorduroso.

3.6 COLORAÇÃO DOS CORTES COM HEMATOXILINA E EOSINA

As lâminas obtidas a partir dos cortes de criostato foram coradas utilizando-se a técnica hematoxilina – eosina (HE) seguindo os seguintes passos: incubação em álcool absoluto (1 a 2 min); Álcool absoluto (10 min); Álcool 95% (5 min); Álcool 85% (5 min); Álcool 70% (5 min); Água corrente (5 min); Hematoxilina (20 min); Água corrente (20 min); Eosina (1 min); Álcool 85% (mergulhar); Álcool 95% (3 a 5 min); 3 passagens no Álcool absoluto (10 min cada).

3.7 DETERMINAÇÕES DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando a ovalbumina como um padrão, para as amostras que não continham Triton X-100. Quando amostras continham Triton X-100, proteínas foi determinada de acordo com Smith et al. (1985), modificado por Morton & Evans (1992), utilizando albumina de soro bovino como um padrão.

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (LAURIL SULFATO DE SÓDIO)

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (LAEMMLI, 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 %, e 1 % de azul de bromofenol). A eletroforese foi processada a uma voltagem constante de 50 V ate a linha de frente do corante atingir o gel de separação, então foi elevada ate 150 V constantes durante aproximadamente 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue R e, para melhor visualização das bandas, com nitrato de prata 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).

3.9 COLORAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

As proteínas dos géis foram submetidas a 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% + 0,4% de formaldeído 37%

concentrado e parado com ácido acético 5% (20 minutos). Os géis foram armazenados em ácido acético 2%, para posterior análise e documentação.

3.10 “WESTERN BLOTTING”

As proteínas foram transferidas dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose de acordo com a metodologia descrita por Towbin et. al. (1979). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente no tampão PBS (NaCl 136 mM, KCl 30 mM, KH_2PO_4 1,5 mM e $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mM), contendo 2% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo anti-vicilina de *V. unguiculata* em tampão bloqueador por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com PBS por seis vezes (10 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (HRP) (1:2000), em tampão bloqueador, por 1 hora e 30 minutos. Passado o período de incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS por 6 vezes (10 minutos cada) e a revelação foi feita por DAB (diaminobenzidina): 100 μl de Tris/HCl 2 M pH 7,5, 5 mg de corante DAB, 0,3 mL de imidazol, 4,9 mL de água destilada e 5 μL de H_2O_2 . As membranas foram deixadas em contato com a solução reveladora por um período de 10 minutos ou até as bordas das membranas ficarem escurecidas. Para parar a reação as membranas foram lavadas com água destilada.

3.11 PREPARAÇÕES DE MICROVILOSIDADES

Para o preparo de frações enriquecidas em membranas de microvilosidades do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus*, duzentos e cinquenta intestinos foram homogeneizados com auxílio de Potter-Helvehjem em tampão Tris-HCl 2 mM, manitol 50mM, pH7.1, e dobrado seu volume com CaCl_2 20 mM para a obtenção de uma concentração final de 10mM. Essa mistura foi preservada em banho de gelo por 10 min. Logo após este período, as amostras foram centrifugadas a 2800 g durante 15 minutos a uma temperatura de 4^o C. O sobrenadante desse homogeneizado foi centrifugado novamente a 15.500 g durante

15 minutos à temperatura de 4^o C e o sedimento final obtido nesta centrifugação está enriquecido em microvilosidades.

3.12 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO ENTRE DIFERENTES VICILINAS PELA LIGAÇÃO ÀS MICROVILOSIDADES ISOLADAS

Foram incubadas concentrações constantes de microvilosidades e vicilina marcada sendo acrescidas concentrações crescentes de vicilina suscetível e faseolina (0,01%). A competição foi realizada com as vicilinas não marcadas por um período “overnight”. Após a competição as amostras foram centrifugadas a 15.000g durante 10 minutos à temperatura de 4^o C sendo o sobrenadante e o sedimento diluídos com tampão de amostra e aplicados separadamente em gel de SDS-PAGE 12%.

3.13 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICO (ELISA)

As quantificações de vicilinas foram realizadas pelo método de ELISA segundo instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno (Nunc, Dinamarca). Para a obtenção das curvas padrão amostras de concentrações conhecidas de faseolina e de vicilina foram aplicadas em poços em um volume padrão de 50 µL (concentrações das proteínas de 1-10 mg final) do tampão carbonato 0,1 M, pH 9,5 durante 1 h a 37^o C e durante a noite a 4^o C. As placas foram lavadas quatro vezes com 0,01% de Tween 20 em PBS (PBS-T). Os sítios não cobertos com as globulinas foram bloqueados por incubação das placas durante 90 min a 37^o C, com 280 µL de uma solução 1% de gelatina em PBS, e lavado com PBS-T. Subsequentemente, 50 µL de anticorpo anti-vicilina numa diluição de 1:20.000 e incubaram-se as placas durante 90 min a 37^o C. Depois de seis lavagens com PBS-T, um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de cabra anti-coelho (diluído 1:40.000) foi adicionado e incubado durante 90 min a 37^o C. Após esta passagem, as placas foram lavadas com PBS-T e a reação foi revelada pela adição de 50 µL TMB (Sigma). A reação foi parada por adição de 50 µL de H₂SO₄ 3N e as amostras foram lidas a 492 nm num leitor de microplacas (Cainelle-Gebara et al., 1995). Todos os ensaios foram

realizados em triplicata e os resultados representam a média de três determinações.

3.14 PURIFICAÇÃO DE UM RECEPTOR DE VICILINAS PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES DOS ENTERÓCITOS DAS LARVAS DE *C. MACULATUS*

Neste experimento foram dissecados 1000 epitélios intestinais para obtenção das proteínas das microvilosidades de membrana que foram extraídas por incubação da fração de membrana com Triton X-100 (10 mg de Triton X-100/mg proteína) durante a noite a 4°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de afinidade vicilina-Sepharose (0,75 cm de diâmetro e 3,0 cm de altura), equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM 0,1% de Triton X-100, pH 8,0. As proteínas não-adsorvidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio, enquanto as proteínas adsorvidas foram eluídas em dois passos, o primeiro usando-se uma solução de Tris NaCl 50mM Triton X-100 0,1% e o segundo passo usando ácido acético 0,1 M com Triton X-100 0,1% . Frações de 1,2 mL foram recolhidas e utilizadas para as determinações de proteínas e eletroforese.

3.15 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DAS VICILINAS A PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS MICROVILOSIDADES DOS ENTERÓCITOS

Neste experimento foram utilizadas as amostras retidas e eluídas na cromatografia de afinidade vicilina-Sepharose, assim como amostras de proteínas totais extraídas das preparações de microvilosidades dos enterócitos. As amostras que foram eluídas usando as soluções Tris NaCl 50 mM, Triton X-100 0,1% e ácido acético 0,1 M com Triton X-100 0,1%, foram aplicadas com tampão de amostra em géis de SDS-PAGE 12%. Após as corridas, os géis foram incubados em uma solução contendo glicerol 5% e ambas as vicilinas (suscetível e faseolina) em uma concentração de 1%, sob agitação em temperatura ambiente durante uma hora. Após a incubação e breve lavagem com água destilada, os géis foram visualizados e documentados em um foto documentador munido com filtro UV.

3.16 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOFF)

Depois de confeccionado o gel SDS-PAGE 12% com as amostras eluídas com Tris NaCl 50 mM, Triton X-100 0,1% e ácido acético 0,1 M com 0,1% de Triton X-100 na coluna de cromatografia de afinidade vicilina-Sepharose, o gel foi corado com Coomassie blue e as bandas foram recortadas com auxílio de uma ponteira e colocados em tubos tipo Eppendorf. Para descoloração das bandas foi preparada uma solução contendo 50% de acetonitrila em 25 mM de bicarbonato de amônio, estes foram deixados até que ficassem totalmente descorados. Posteriormente, fez-se a desidratação das bandas usando acetonitrila pura até cobrir a amostra, e colocado no vácuo até que as bandas ficassem secas. Em seguida, fez-se a digestão com tripsina sendo a concentração final da enzima 10 µg/mL em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, incubando no escuro a 37^o C durante 12 horas. Para a extração dos polipeptídeos usou-se uma solução contendo 50% de acetonitrila e 5% TFA (ácido trifluoroacético) em um volume de aproximadamente 50 µL desta solução juntamente com a anterior e deixados em agitação por 30 minutos. Após o tempo citado, foi recolhido o sobrenadante e repetido este passo por mais duas vezes, ao final desta etapa acumulou-se um volume de 150 µL, sendo estes novamente colocados no vácuo até que ficassem secos. Foi preparado um padrão de peptídeo: 1 µL padrão e 1 µL de matriz (10 mg de ácido α -ciano- 4-hidrocinâmico em 10 mL de 1:1 acetonitrila 5% com 3% TFA), as duas soluções foram misturadas e aplicados 2 µL na placa de platínum, aguardou-se as amostras secarem completamente e colocados 2 µL de TFA 0,1% para resuspending os peptídeos. Para a aplicação das amostras na placa de MALDI foi recolhido 1 µL de amostra mais 1 µL da matriz, sendo então misturados os 2 µL e, após secagem a temperatura ambiente, a placa foi encaminhada ao espectrômetro de massa.

3.17 ISOLAMENTOS DE MEMBRANAS INTERNAS DOS ENTERÓCITOS

Após o período de alimentação com faseolina e vicilina suscetível marcada (como descrito anteriormente) em um total de 60 larvas foram separados dois grupos: um grupo de 30 larvas

(15 para cada dieta) que recebeu um pulso de 24 h com alimentação e ficou 24 h sem alimentação, o segundo grupo recebeu um pulso de 24 h com alimentação e logo após foram removidos seus intestinos na presença de NaCl 250mM sendo lavados os epitélios em água para se livrar de todo o conteúdo e em seguida estes foram homogeneizados em um meio hipotônico (manitol 50 mM em Tris-HCl 2 mM, pH 7,0) com auxílio de Potter-Elvehjem, após obtido o homogeneizado foi acrescido CaCl_2 10 mM de acordo com Wolfersberger et al. (1987). Um volume igual de solução de CaCl_2 20 mM foi adicionado ao homogeneizado do epitélio. A mistura resultante foi deixada repousar em gelo durante 10 minutos. Após este tempo, a mistura foi então centrifugada a 2800g durante 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sedimento foi recolhido e resuspendido em 1 mL de água. Posteriormente 100 μL desta amostra foi incubada com 100 μL de tampão acetato de sódio 100 mM em diferentes faixas de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0) deixando-se por 30 minutos. Em seguida, estes foram submetidos a nova centrifugação a 20000g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e ao sedimento foi adicionado Triton 1% deixando-se por uma noite e após extração as amostras foram aplicadas juntamente com tampão de amostra em gel de SDS-PAGE 12%.

3.18 VERIFICAÇÃO DO DESTINO DAS VICILINAS

Com o objetivo de determinar a partição dos complexos vicilina/FITC e faseolina/FITC entre as frações particuladas e solúveis advindas de homogeneizados dos enterócitos de *C. maculatus*, as larvas foram removidas das sementes de *V. unguiculata* e transferidas para misturas contendo as proteínas marcadas em cápsulas de gelatina, sempre duas larvas por cápsula. Neste experimento foram alimentadas 60 larvas do caruncho no 3^o ínstar e transferidas para o interior das cápsulas de gelatina contendo misturas farinhas de cotilédones de *V. unguiculata* (excipiente) e vicilina suscetível ou faseolina marcadas com FITC. Este número de 60 animais foi dividido em dois grupos contendo 30 larvas em cada um deles. Estes grupos contendo 30 larvas foram divididos em subgrupos de 15 larvas, sendo que o primeiro subgrupo recebeu um pulso de alimentação de 24 h com a farinha contendo faseolina marcada, em seguida

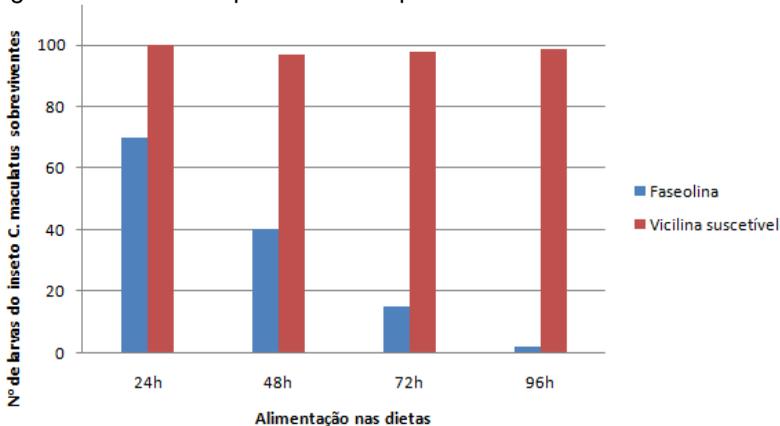
foram retiradas das cápsulas e mantidas por mais 24 h sem acesso à alimentação. Já as outras 15 larvas restantes receberam o pulso de 24h com a farinha contendo faseolina marcada e logo após foram dissecadas para a remoção de seus intestinos e corpo gorduroso. Os epitélios foram lavados por imersão em água destilada para se livrar do material contido no conteúdo luminal. O mesmo processo foi repetido com o grupo alimentado com vicilina suscetível marcada com FITC. Os homogeneizados dos epitélios e dos corpos gordurosos obtidos com o auxílio de Potter-Elvehjem em 200 μ L de água foram submetidos à centrifugação a 20.000g durante 30 minutos a 4^oC. Ao final da centrifugação foram separados os sedimentos e sobrenadantes. Os sedimentos foram ressuspensos em 200 μ L de água. Tanto os sedimentos quanto os sobrenadantes tiveram suas fluorescências fotografadas e mensuradas em um scanner a laser FLA9000.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE FASEOLINA NA DIETA DE LARVAS DE *C. MACULATUS*.

Os resultados aqui obtidos mostram que a incorporação de faseolina em quantidades fisiológicas nas dietas artificiais oferecidas às larvas causa antibiose ao inseto *C. maculatus*. Após a alimentação artificial em cápsulas de gelatina contendo faseolina da semente *P. vulgaris* as larvas do caruncho *C. maculatus* não conseguiram se desenvolver, sendo que a partir de 48h começaram a sofrer um atraso no seu desenvolvimento e posteriormente vieram a morrer nesta dieta (Figura 4). Um número de 200 larvas do inseto *C. maculatus* foram retirados das sementes de *V. unguiculata* e um grupo de 100 larvas transferidas para uma dieta contendo faseolina 0,5 % (m/m) e das outras 100 larvas transferidas para a dieta contendo apenas vicilina (dieta controle), foi observado que a taxa de mortalidade aumentou gradativamente nas larvas alimentadas com a faseolina ao passar dos dias e quando completadas 96h de alimentação, não houve mais sobreviventes. Na dieta controle, a qual havia apenas farinha de vicilina suscetível da semente de *V. unguiculata*, a taxa de mortalidade foi de apenas cinco indivíduos de um total de 100, mesmo depois de percorridas às 96h.

Figura 4- Efeito da incorporação de faseolina e vicilina suscetível na sobrevivência de larvas do inseto *C. maculatus*. As larvas foram transferidas de sementes naturais de *V. unguiculata* (primeiro instar) para cápsulas de gelatina contendo misturas das proteínas purificadas faseolina e vicilina suscetível (0,5%, m/m) e farinha de cotilédones de *V. unguiculata* como excipiente nos tempos indicados.



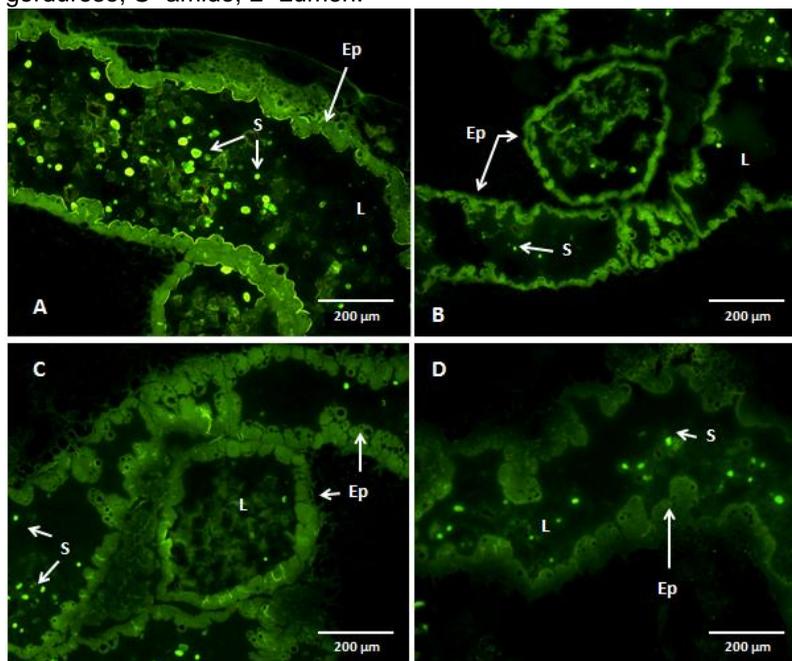
Fonte: acervo da autora

4.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE FASEOLINA NOS ÓRGÃOS INTERNOS DAS LARVAS DE *C. MACULATUS*

Para a determinação da localização das proteínas marcadas em órgãos internos, as larvas foram transferidas diretamente das sementes de *V. unguiculata* para sementes artificiais contendo vicilina suscetível ou faseolina marcadas com FITC, sendo obtidos, após os pulsos de alimentação, cortes em criostato e observação em microscopia de fluorescência. Inicialmente foi observado que tanto as larvas de primeiro instar quanto as larvas de quarto instar absorvem as proteínas marcadas, como revelado pela intensa fluorescência observada nas células tanto do epitélio intestinal quanto nas células do corpo gorduroso (Figura 5). Também pode ser observada a ocorrência de vesículas no interior das células epiteliais (Figura 6). Experimentos posteriores mostraram que nas larvas de primeiro instar a faseolina ingerida pelas larvas de *C. maculatus* fica retida no epitélio intestinal, como indicado pela maior intensidade de fluorescência observada mesmo após 96hs sem

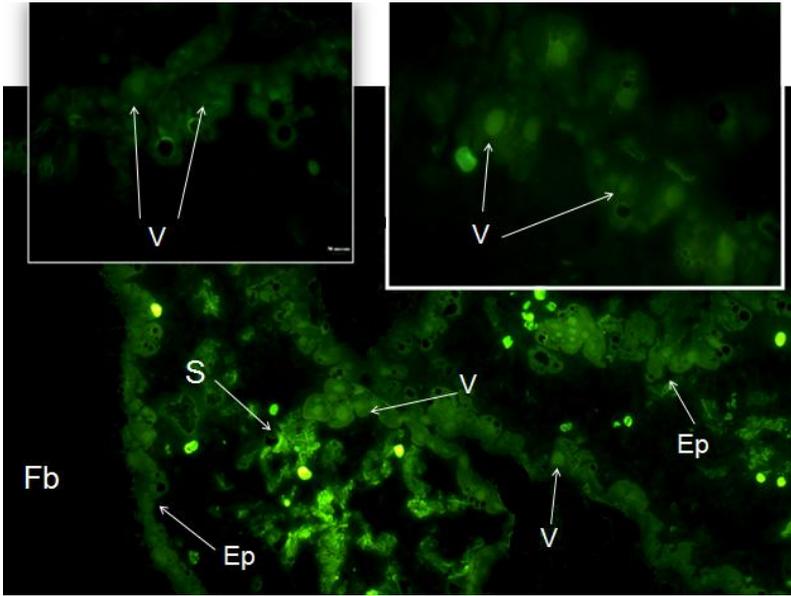
alimentação contendo faseolina marcada, quando comparado com a ingestão de vicilina marcada (Figura 7). O mesmo fenômeno de represamento de faseolina foi também observado para as larvas de quarto instar (Figura 8).

Figura 5- Corte do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas vicilina ou faseolina marcadas com FITC. A) Larva de 1^o instar alimentada com faseolina marcada; B) Larva do 1^o alimentada com vicilina suscetível marcada; C) Larva do 4^o instar alimentada com vicilina suscetível marcada D) Larva do 4^o alimentada com faseolina marcada. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen.



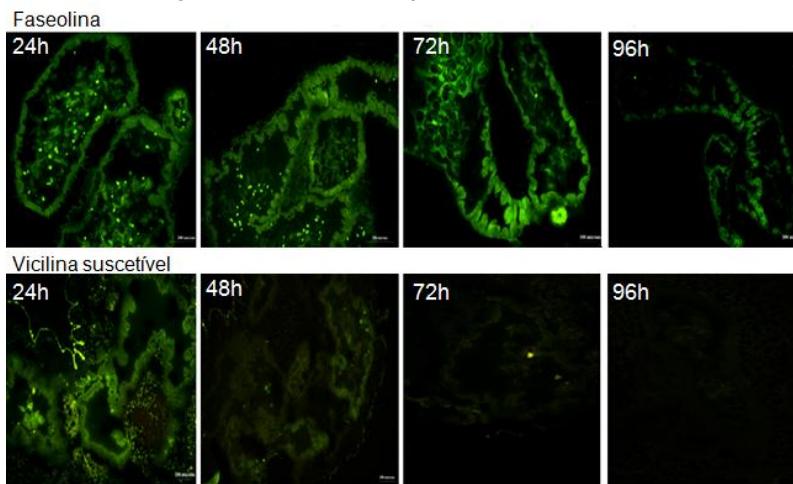
Fonte: acervo da autora

Figura 6- Corte do epitélio intestinal das larvas de 1^o instar de *C. maculatus* alimentadas com a proteína purificada faseolina marcada com FITC. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen; V- Vesículas.



Fonte: acervo da autora

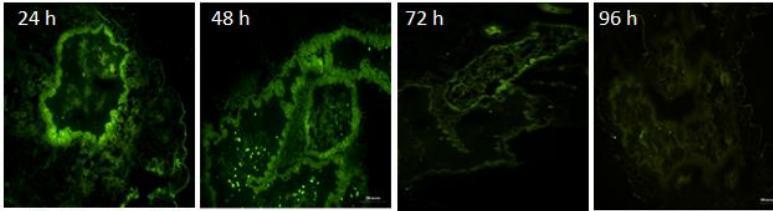
Figura 7- Cortes do epitélio intestinal das larvas de 1^o instar de *C. maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas vicilina suscetível (A) e faseolina (B) marcada com FITC. Após pulso de 24h com alimentação das proteínas purificadas e marcadas com FITC estas ficaram por 0h, 24h,48,72 e 96h em alimentação contendo apenas farinha de *V. unguiculata* sem marcação.



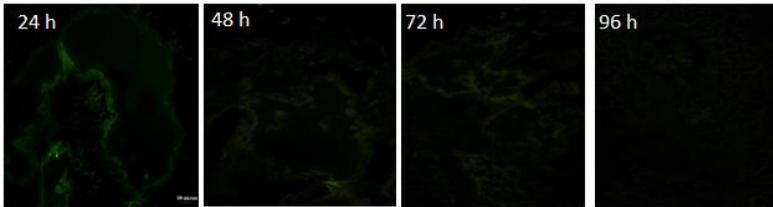
Fonte: acervo da autora

Figura 8- Corte do epitélio intestinal das larvas de 4^o de *C. maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas faseolina e vicilina suscetível marcada com FITC. Após pulso de 24h com alimentação com as proteínas purificadas e marcadas estas ficaram por 24h, 48h, 72 e 96h em alimentação contendo apenas farinha de *V. unguiculata* sem marcação.

Faseolina



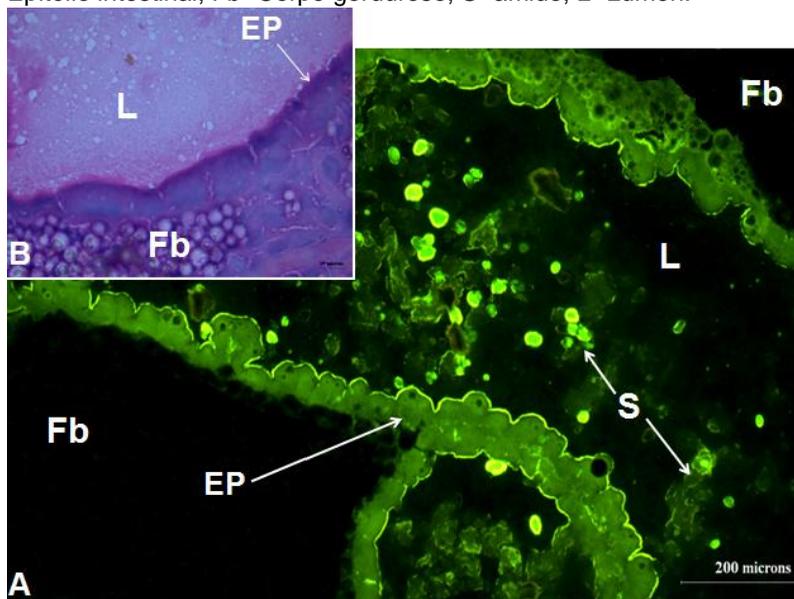
Vicilina suscetível



Fonte: acervo da autora

Observou-se no epitélio intestinal das larvas que há uma maior concentração de faseolina, tanto nas lâminas analisadas através da microscopia de fluorescência quanto às coradas com HE (Figura 10).

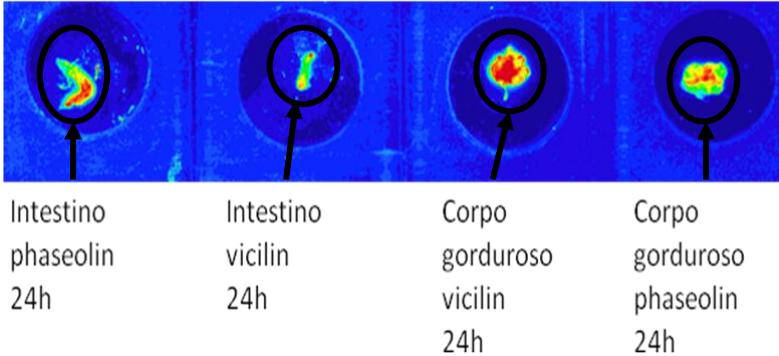
Figura 9 A) Corte do epitélio intetinal da larva de 1º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentada com proteína purificada faseolina e marcada com FITC. B) Larva de 1º instar de *Callosobruchus maculatus*, seccionadas em criostato e coradas com a técnica HE. EP- Epitélio intestinal; Fb- Corpo gorduroso; S- amido; L- Lúmen.



Fonte: acervo da autora

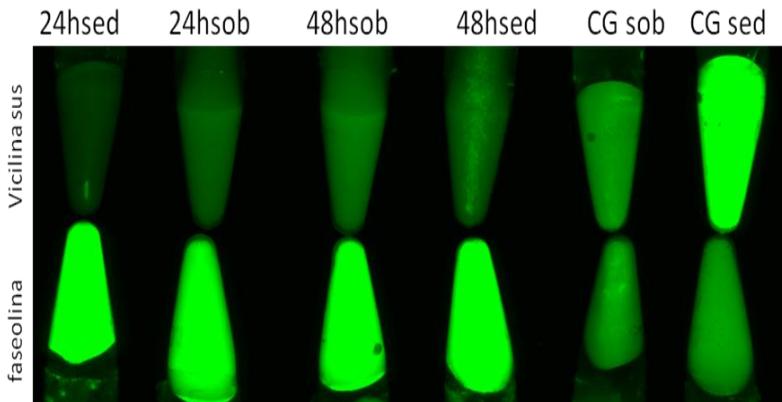
Outro experimento realizado utilizando o método de alimentação artificial foi de alimentar as larvas durante 24 h com as misturas contendo farinha das sementes de *V. unguiculata* e faseolina ou vicilina marcadas com FTIC e depois retorná-las para farinha de *V. unguiculata* sem a incorporação das proteínas marcadas. Após estas dissecadas em salina 250 mM onde tiveram removidos seus intestinos médios e o corpo gorduroso. Em seguida estes tiveram suas fuorescências fotografadas e mensuradas em um “scanner” a laser FLA9000. Frente à distribuição da intensidade de fluorescência observada é possível concluir que a distribuição de faseolina e vicilina não são coincidentes. Enquanto a fluoreescência associada à faseolina se concentra no intestino médio, a fluoreescência associada à vicilina está maior no corpo gorduroso, sugerindo que a passagem de vicilina do intestino para o corpo gorduroso é maior do que o da faseolina (Figuras 9 e 10).

Figura 10- Distribuição de fluorescência entre o intestino médio e o corpo gorduroso de larvas do 3º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas faseolina ou vicilina suscetível marcadas com FITC. As cores mostradas seguem o esquema onde o vermelho indica maior intensidade de fluorescência e a verde menor intensidade.



Fonte: acervo da autora

Figura 11 - Distribuição de fluorescência em micro tubos das frações particuladas e solúveis obtidas a partir de homogeneizados do intestino médio e do corpo gorduroso de larvas do 3º instar de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com as proteínas purificadas faseolina ou vicilina suscetível marcadas com FITC.

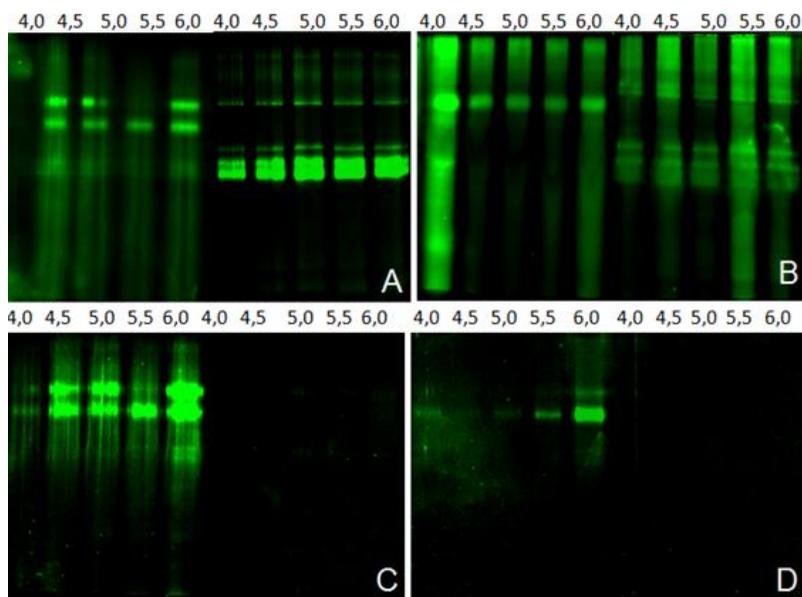


Fonte: acervo da autora

A distribuição das proteínas marcadas entre as frações particuladas e solúveis nos enterócitos e o efeito do pH na dissociação das proteínas na fração particulada foram avaliados por eletroforese. Para observarmos se existia alguma diferença

em relação as diferentes faixas de pH na interação das proteínas com as frações de membranas, após a alimentação das larvas incubou-se a porção de membranas em faixas de pH crescentes de 4,0 a 6,0. Nesta série de experimentos não foi observada diferença quanto ao efeito do pH na dissociação das proteínas marcadas das membranas, já em relação à quantidade de proteína que fica ligada nas membranas ficou evidente que a faseolina permanece em maior quantidade ligada e em quantidade muito menor no sobrenadante (Figura 11). Já a vicilina não aparece em nenhuma das frações após 24 h sem ingestão de proteína marcada, sugerindo que essas proteínas são absorvidas seguindo para o corpo gorduroso (Figura 12).

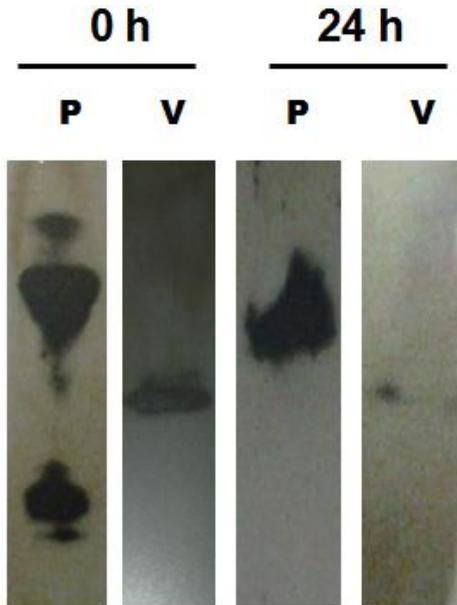
Figura 12 – Efeito do pH na dissociação de faseolina e vicilina marcadas entre as frações solúvel e particulada após pulso de alimentação seguido ou não de jejum. A) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas a membranas logo após pulso de alimentação; B) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas à fração solúvel logo após pulso de alimentação; C) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas a membranas após pulso de alimentação seguido de jejum por 24 h; D) Padrão de bandas de proteínas marcadas associadas à fração solúvel após pulso de alimentação seguido de jejum por 24 h.



Fonte: acervo da autora

A presença de faseolina e vicilina suscetível nas membranas epiteliais do caruncho *C. maculatus* após a alimentação em dieta artificial foi confirmada pela técnica de Western blotting. Podemos observar que tanto logo após o pulso de alimentação, quanto seguido de jejum a faseolina permanece mais ligada a membranas, enquanto a vicilina associada a membranas só foi observada após o pulso de alimentação, diminuindo drasticamente a sua presença depois do período de jejum, provavelmente devido ela ser absorvida, enquanto a faseolina se mantém retida (Figura 14).

Figura 13- "Western blot" das larvas de *C. maculatus* alimentadas com faseolina e vicilina suscetível 1%. P) indica faseolina em 0h e 24h após alimentação V) indica vicilina suscetível em 0h e 24h após alimentação a alimentação.

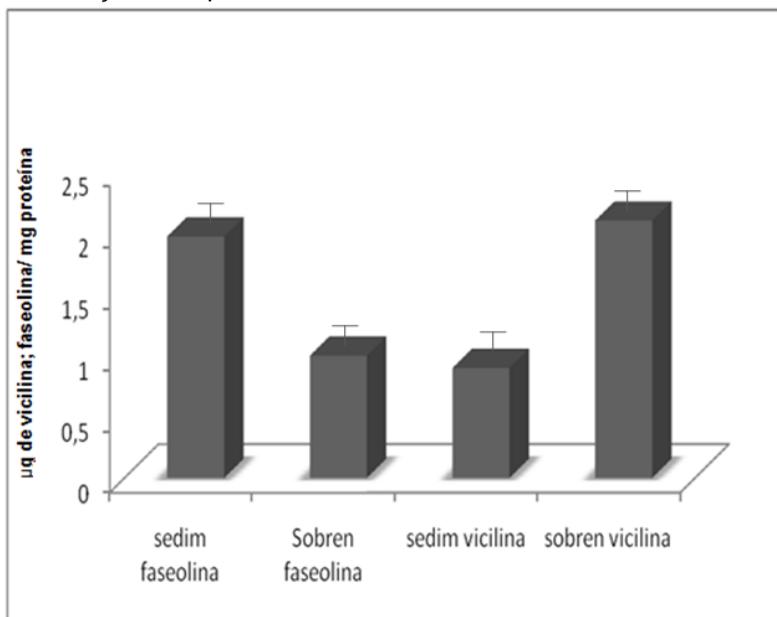


Fonte: acervo da autora

Uma abordagem quantitativa na determinação da distribuição tanto de faseolina quanto de vicilina usando ELISA foi utilizada em larvas de *C. maculatus* submetidas a um pulso de alimentação com farinha de *V. unguiculata* suplementada com faseolina a 1% durante 24hs. Após isto, as larvas foram dissecadas e os epitélios intestinais foram homogeneizados e

centrifugados para obtenção das frações de membrana e solúvel. Foi observado uma concentração maior de faseolina no sedimento em relação ao sobrenadante, enquanto a vicilina se concentra no sobrenadante (Figura 14)

Figura 14 – Determinação através de ELISA da concentração de faseolina ou de vicilina nas frações de membrana e solúvel dos enterócitos após pulso de alimentação em dietas suplementadas com essas proteínas. Os dados mostrados são representativos de 3 determinações independentes contendo 15 animais em cada.



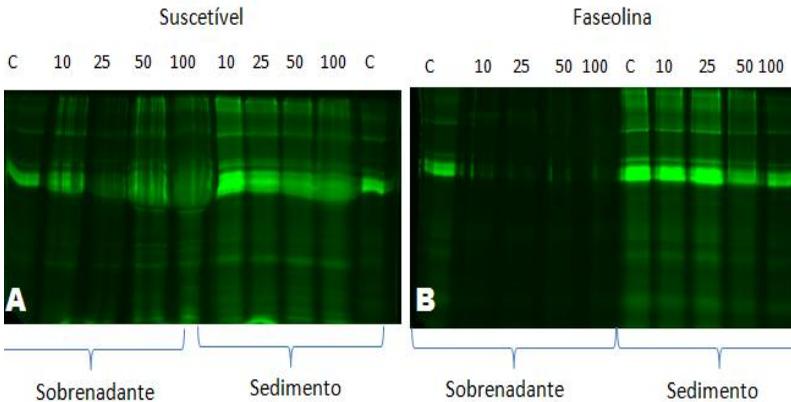
Fonte: acervo da autora

4.3 DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO DE FASEOLINA E VICILINA ÀS MEMBRANAS MICROVILARES DOS ENTERÓCITOS

A fim de comparar a ligação das duas globulinas nas membranas das microvilosidades das células do epitélio intestinal, foram realizados experimentos de competição entre proteínas não marcadas incorporadas em quantidades crescentes com quantidades constantes de faseolina ou vicilina marcadas com FITC e as mesmas quantidades de preparações de membranas microvilares (Figura 15). As vicilinas e faseolinas

não ligadas às microvilosidades migram no gel durante a eletroforese, enquanto parte da vicilina e faseolina foi hidrolisada a qual foi deslocada pelas vicilinas não marcadas, apenas a vicilina suscetível foi encontrada no sobrenadante. Os poços indicam as concentrações das vicilinas/faseolina para o meio de incubação.

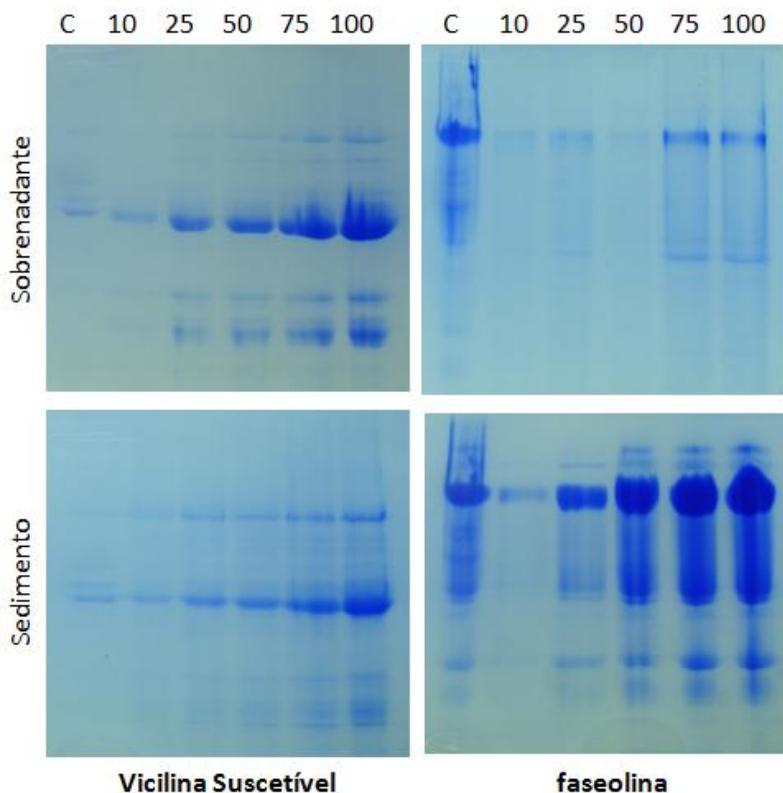
Figura 15- Demonstrando o deslocamento das vicilinas (vicilina suscetível/ faseolina) marcada com FITC, incubadas com diferentes concentrações, os poços indicam a quantidade em μl de proteína. A) Faseolina sobrenadante e sedimento; B) Vicilina suscetível sobrenadante e sedimento.



Fonte: acervo da autora

Para confirmação do resultado obtido anteriormente com as vicilinas marcadas, foram incorporadas novamente quantidades crescentes de faseolina e vicilina suscetível não marcada as microvilosidades, seguido por centrifugação, as amostras contendo proteínas ligadas nos sedimentos foram aplicadas em SDS-PAGE e após coradas com azul de coomassie. Observou-se então que o mesmo resultado obtido com as vicilinas marcadas se repete. Os poços indicam as concentrações das vicilinas/faseolina para o meio de incubação (Figura 16).

Figura 16- Ligação da faseolina e vicilina suscetível em microvilosidades intestinais das larvas de *C. maculatus* com diferentes concentrações.



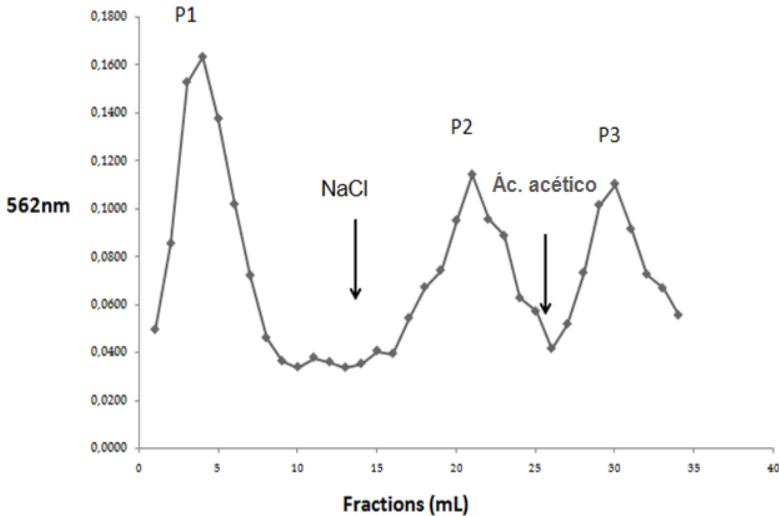
Fonte: acervo da autora

4.4 PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE VICILINAS PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE VICILINA-SEPHAROSE

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores motivaram-nos a isolar um possível receptor que estaria presente nas membranas intestinais das larvas de *C. maculatus*. Para isto utilizamos uma coluna de afinidade onde vicilina foi imobilizada em resina Sepharose. Proteínas de microvilosidades de membrana foram extraídas por o detergente Triton X-100 e aplicado a coluna de Sepharose para que a vicilina fosse ligada

de forma covalente. Proteínas de microvilosidades de membrana que se prenderam a vicilina foram eluídas pelo pH ácido e as frações foram utilizadas para a análise de eletroforese e determinações de proteínas(Figura 17).

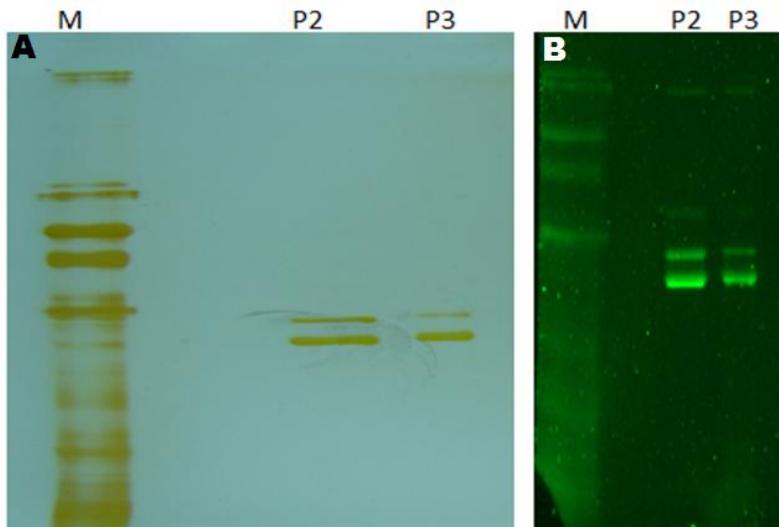
Figura 17 - Perfil de eluição de proteínas de microvilosidades intestinais das larvas *C. maculatus* obtidas a partir de cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-vicilina.



Fonte: acervo da autora

Com o perfil do padrão de proteína isolada na cromatografia submeteu-se as amostras a SDS-PAGE para verificação do tamanho e afinidade pelas vicilinas, onde este experimento nos mostrou que a faseolina se liga não só as proteínas retidas nos picos 2 e 3, mas também a outras proteínas de membrana(Figura 18).

Figura 18- Amostras obtidas na cromatografia de afinidade sepharose-vicilina, no painel A, gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) corado com prata; B) As mesmas frações foram aplicadas em gel de eletroforese e posteriormente incubado em solução faseolina- FITC a uma concentração de 1%.



Fonte: acervo da autora

A fim de identificar quais eram as proteínas retidas na coluna de afinidade vicilina-sepharose, pode-se através da utilização do espectrômetro de massas (Maldi- Toff) observar que essas proteínas de membranas que foram purificadas a partir da cromatografia de afinidade, tem massa igual ou muito semelhante com receptores, sendo esta a proteína transportadora α -tocoferol (Figura 19).

Figura 19- Tabela com as anotações feitas a partir das diferentes sequências obtidas após espectrometria de massa (Maldi-Tof) dos picos 2 e 3 da cromatografia de afinidade sepharose-vicilina.

Descrição	cobertura	Valor E	Identidade máxima	Acesso
GE10388 [Drosophila yakuba]	100%	E4-18	100%	gi 195502985 XP_002098463.1
modular domain immune-type receptor [Raja eglanteria]	100%	4E-08	100%	gi 86156154 ABC86795.1
alpha tocopherol transfer protein	95%	E8-00	95%	gi 485601518 3W67_A

Fonte: acervo da autora

5. DISCUSSÃO

5.1 RESISTÊNCIA DOS CARUNCHOS

Em um primeiro momento, teve-se um marco importante na história da busca por alvos na fisiologia digestiva de larvas de bruquídeos que pudessem ser explorados para fins de controle no final da década de 70, quando GATEHOUSE et al. (1979) publicaram dados sugerindo que inibidores de tripsina conferiam resistência de sementes de *V. unguiculata* a *C. maculatus*. Embora essa proposição tenha posteriormente se mostrado equivocada (XAVIER-FILHO et al., 1989 e ZHU et al., 1994), estimulou a pesquisa sobre as proteinases digestivas desses insetos, culminando até o final da década de 80 e meados da década de 90 com o bom volume de conhecimento da natureza e ocorrência das proteinases digestivas das larvas dos carunchos pragas de feijões (GATEHOUSE et al., 1985; KITCH e MURDOCK 1986; CAMPOS et al., 1989; SILVA e XAVIER-FILHO, 1991). Ficou evidente por estes trabalhos, que as larvas de bruquídeos utilizam principalmente de proteinases cisteínicas e aspárticas para digestão de proteínas, não sendo afetadas por inibidores de proteinases serínicas.

Em uma série de trabalhos, na sua maioria durante a década de 80, o grupo do Prof. Kitamura demonstrou que o inibidor de α -amilase encontrado em sementes do feijão *P. vulgaris* era o responsável pela resistência desse feijão a carunchos do gênero *Callosobruchus* (ISHIMOTO e KITAMURA, 1989). Apesar de divergências na literatura que sugeriam que a resistência seria devida à presença de lectina nessas sementes (JANZEN et al., GATEHOUSE et al., 1984), no início da década de 90, o grupo japonês (HUESING et al., 1991) continuava afirmando a eficácia de inibidores de α -amilases em conferir resistência a espécies de bruquídeos ficou ainda melhor estabelecida com a produção de sementes transgênicas, como no caso de ervilhas que se tornaram resistentes a seu bruquídeo praga *Bruchus pisorum* (SHADE et al., 1994; SCHOEDER et al., 1995).

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

genótipos africanos resistentes a *C. maculatus* foi depois comprovada ser associada à ocorrência de formas variantes das proteínas de reserva vicilinas (MACEDO et al., 1993).

A capacidade de toxicidade das vicilinas variantes também foi relacionada à resistência da proteólise e com sua afinidade de ligação ao intestino médio das larvas de *C. maculatus* (SALES et al., 1992; MACEDO ET al., 1993). Posteriormente, 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 ligar a quitina (SALES et al., 1996, FIRMINO et al., 1996). UCHÔA et al. (2006) e XAVIER-FILHO et al. (1998) afirmando que variantes de vicilinas (globulinas 7S) em sementes de feijão de corda (*V. unguiculata*) são consideradas como o principal fator de resistência a *C. maculatus* em genótipos africanos, onde foi descrito que estas atuam especialmente sobre a quitina quando presente no intestino médio das larvas, provocando efeitos nocivos ao seu desenvolvimento.

SALES e colaboradores em 2001 propuseram que o mecanismo de resistência associado à vicilina e à presença de quitina nas células do intestino médio das larvas. Demonstrou-se, através de imunomarcção, que os anticorpos utilizados evidenciaram a presença de quitina e vicilina, principalmente na área apical das células do intestino médio das larvas. Sendo que mais tarde descobriu-se que o transporte de vicilinas para a hemolinfa de larvas de *C. maculatus* poderia ser mediado por receptores encontrados em microvilosidades do epitélio intestinal, porém recentemente após imunomarcção de larvas alimentadas com vicilinas variantes (1053) e vicilinas suscetíveis das sementes de *V. unguiculata* 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. Assim, foi possível rever novos dados e analisar os resultados publicados em 2001 por Sales e colaboradores, onde se concluiu 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 (OLIVEIRA et al., 2014).

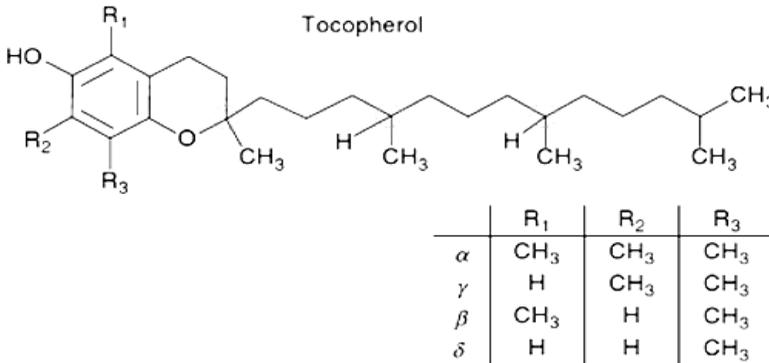
5.2 RESISTÊNCIA DA VICILINA DE *P. VULGARIS* AO *C. MACULATUS*

Frente ao exposto, nossos resultados vêm acrescentar que o transporte de globulinas do intestino médio para órgãos internos das larvas pode ser mediado por endocitose, pois, comprovamos a evidência de um possível receptor através da espectrometria de massa, tendo este apresentado alta homologia com a proteína transportadora de α -tocoferol (Tabela 19). O α -tocoferol tem papel fundamental na proteção do organismo contra os radicais livres que causam danos nas células e tecidos, esses danos podem ser inibidos pelo fato de ser o mais abundante antioxidante lipossolúvel nos tecidos, plasma e no LDL e ter alta atividade biológica, atuando como um dos principais constituintes dos mecanismos da defesa endógena do organismo, tendo sua localização principalmente nas membranas celulares (GOTODA et al., 1995). As proteínas transportadoras de α -tocoferol são pertencentes à família de proteínas Sec14, que desempenham um importante papel no transporte dos α -tocoferóis (HORIGUCHI et al., 2003). Os tocoferóis são um grupo de compostos biologicamente ativos, que variam somente no número e posições de radicais metila (-CH₃) na sua molécula. Embora, mínimas estas mudanças estruturais influenciam na atividade biológica destas moléculas. Os tocoferóis ativos foram nomeados em ordem de sua atividade: alfa-tocoferol é o mais ativo, seguido do beta-tocoferol, e assim por diante. Todos eles são chamados de vitamina E (SATO et al., 1993).

As vitaminas regulam reações que ocorrem no metabolismo em contraste com os macronutrientes (gorduras, carboidratos, proteínas), que são justamente os compostos utilizados nas reações reguladas pelas vitaminas. A ausência de uma vitamina bloqueia uma ou mais reações metabólicas específicas na célula, e pode eventualmente causar um distúrbio no balanço metabólico do organismo inteiro (BOREL et al., 2001). As plantas, por exemplo, não necessitam do consumo de nenhuma vitamina, e são capazes de sintetizar várias delas. Os insetos necessitam de algumas vitaminas na sua dieta dentre estas as já conhecidas: niacina, B1, B2 e B6 e C. Os dados

indicam, ainda, que ortólogos desse transportador encontrados no gênero *Drosophila* são conservados tanto em coleópteros e dípteros pelas várias homologias apresentadas nas sequências obtidas e após cuidadosa análise dos dados.

Figura 20- Estrutura do tocoferol, número e posições de radicais metila (-CH₃) na sua molécula.



Fonte: GUILLARD et al.; 2009.

É sabido, que a importação de proteínas específicas para uma célula, pode ser efetuada através da ligação de proteínas à receptores presentes nas membranas citoplasmática, posteriormente estas são incluídas em vesículas. Sendo, este processo denominado uma endocitose mediada por receptor, caso esta endocitose não ocorra de forma eficiente pode acarretar em uma série de implicações biológicas para o organismo, pois, esta é uma forma de enviar metabólitos essenciais para as células. Acredita-se, que a faseolina uma vez ingerida pelo inseto *C. maculatus* tenha uma alta afinidade pelo receptor, dificultando sua separação no interior das vesículas.

Ainda, OLIVEIRA (2013) demonstrou que a vicilina variante (IT81D-1053) da semente de *V. unguiculata* afeta o desenvolvimento das larvas do caruncho *C. maculatus* por ligarem-se na superfície das células epiteliais do intestino médio e comprometerem o tráfego vesicular, comprometendo assim o desenvolvimento larval. A existência de algumas linhagens de vicilinas variantes expressas em sementes de *V. unguiculata* vem sendo associada ao efeito tóxico das globulinas sobre seus predadores há décadas MACEDO et al.(1993, 1995) já vinham estudando seus efeitos sobre os carunchos.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como base explicar o fenômeno de antibiose conferido a faseolina em relação à espécie *C. maculatus* onde, inicialmente, foi demonstrada nas larvas que foram transferidas dos cotilédones de sementes de *V. unguiculata* para cotilédones da semente de *P. vulgaris* ou cápsulas contendo a proteína purificada faseolina que é uma proteína de armazenamento da semente de *P. vulgaris* (Figuras 4) que de alguma forma, a faseolina contribuiu para a morte ou retardo no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*. As larvas submetidas à alimentação artificial de sementes apresentaram características diferentes, conforme sua dieta não apresentou diferença nos instares larvais que estavam. Outro ponto interessante a ser discutido é a abordagem experimental tipo experimento de pulso e caça proporcionado pela marcação das diferentes vicilinas com FITC. Enquanto as larvas alimentadas com dieta rica em faseolina apresentaram uma maior fluorescência no epitélio intestinal, aquelas que se alimentaram apenas com a farinha de *V. unguiculata* (dieta controle) não apresentaram fluorescência no epitélio, mas sim no corpo gorduroso (Figuras 10 e 11).

Outro dado importante observado foi à formação de vesículas no interior do epitélio intestinal das larvas alimentadas com faseolina (Figura 6). Entretanto, nas dietas testadas, as larvas mostravam-se ativas quanto a sua alimentação e desenvolvimento em ambas as dietas apenas nas primeiras 24h, após, na alimentação que continha faseolina notou-se um retardo no desenvolvimento e mortalidade aumentada. Frente aos resultados obtidos nos experimentos de alimentação artificial e resistência, decidiu-se testar com fêmeas adultas do inseto *C. maculatus* colocando estas para realizar a ovoposição em viveiros contendo sementes de *P. vulgaris*, novamente não se obteve sucesso, pois as fêmeas chegaram a realizar a ovoposição, mas não ocorreu emergência sendo que estes viveiros foram mantidos por um período de 120 dias onde foi controlado diariamente se havia emergência, esses dados corroboram com REIS DE SÁ et al. (2013) que defendem a capacidade de toxicidade conferida a sementes de *P. vulgaris* contra os insetos *C. maculatus* pois, as larvas quando expostas a alimentação com as sementes de *P. vulgaris* tem seu desenvolvimento embrionário afetado, tendo comprometida a atividade das α -glicosidases, α -amilase e protease cisteínica.

Segundo SILVA et al.; (2003) a faseolina detectada no tegumento das sementes de *P. vulgaris* pela técnica de “Western blotting” e sequenciamento N-terminal é tóxica a *C. maculatus*. Como descrito por CASARTELLI et al. (2005) e JEFFERS & ROE (2008), o conhecimento da absorção de proteínas intactas pelo intestino e epitélio dos insetos está em sua infância. Um dos mais discutidos temas com relação à absorção de proteínas inteiras através do epitélio intestinal de insetos e o valor de adaptação deste processo e quais as funções exercidas por essas proteínas absorvidas. Em vários casos, as proteínas absorvidas não são úteis para os insetos, mas por outro lado, eles podem causar efeitos tóxicos.

A presença de faseolina na membranas do epitélio intestinal das larvas do caruncho *C. maculatus* foi confirmada através da técnica de imunoblotting, onde observou-se que após o pulso de 24 horas de alimentação com a proteína purificada faseolina está se encontra ligada as porção de membranas, o evento foi observado mesmo após o período em que as larvas do caruncho *C. maculatus* permaneceram sem acesso a alimentação. FITCHES et al. (2001) demonstraram o potencial tóxico da fito-hemaglutinina (PHA) do *P. vulgaris* por se ligarem a glicoproteínas no intestino e tecidos, que foram detectados em diferentes órgãos e intestino das larvas da traça do tomate *Lacanobia oleracea*, causando antibiose. Sabe-se que as proteínas da semente do feijoeiro *P. vulgaris* chamadas de arcelinas são potencialmente tóxicas as das larvas do caruncho *Z. subfasciatus* por possuírem a capacidade de atravessar o epitélio do intestino médio, sendo estas detectadas na hemolinfa e corpo gorduroso desses insetos (PAES et al., 2000).

Nossos dados sugerem que a faseolina tem um mecanismo diferente de não conseguir atravessar totalmente o epitélio dos carunchos, ficando em alta quantidade acumulada nos enterócitos causando assim a morte dos insetos pela dificuldade na absorção de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento como a vitamina E, comprometendo o tráfego vesicular.

Os resultados apresentados neste estudo, permitem maiores detalhes do processo de absorção de proteínas de armazenamento que podem ser potencialmente tóxicas para insetos pragas como a faseolina que confere antibiose a insetos pragas pelo fato de afetar o tráfego vesicular porém, se faz

necessário novos experimentos para elucidar completamente qual é o mecanismo envolvido na interação faseolina-receptor pois, os dados apontam para endocitose mediada por receptor, porém se torna indispensável adotar novos parâmetros para estabelecer se o receptor encontrado é reciclado e se diferenças como o pH podem estar envolvido neste mecanismo.

6. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados mostraram que é possível acompanhar o destino das vicilinas/faseolina absorvidas através do intestino médio das larvas de *C. maculatus*. Com isso, podemos concluir que as vicilinas/faseolina são consumidas pelas larvas e absorvida através das células epiteliais do intestino médio.
- 2) A faseolina se acumula no epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus* e promove um bloqueio parcial do tráfego vesicular, independente do instar larval que se encontra, impedindo seu desenvolvimento.
- 3) Uma proteína à qual a faseolina se liga nas membranas epiteliais foi purificada e demonstrou homologia com a proteína transportadora de α -tocoferol.
- 4) Um novo mecanismo de antibiose é proposto envolvendo acúmulo de vicilinas/ faseolinas no epitélio intestinal das larvas do caruncho *C. maculatus* e o comprometimento dos processos endocíticos. Este mecanismo envolve provavelmente a ligação da vicilina/faseolina a uma proteína homóloga a proteína transportadora de α -tocoferol.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, BRUCE; JOHNSON, ALEXANDER; LEWIS, JULIAN; RAFF, MARTIN; ROBERTS, KEITH; WALTER, PETER. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p. p. 1-194.

ALEXANDRE, D., LINHARES, R. T., QUEIROZ, B., FONTOURA, L., UCHÔA, A.F., SAMUELS, R.I., MACEDO, M.L.R., BEZERRA, C.S., OLIVEIRA, E.M., DEMARTINI, D.R., CARLINI, C.R., SILVA, C.P., 2011. Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology* 57, 801-808.

ABROL, D.P. (1999). Pulse susceptibility to *Callosobruchus chinensis* (L.) (Bruchidae: Coleoptera) under field conditions. *Journal of Tropical Agriculture*, 76:150.

BASTOS, J. A.M. (1981). Principais pragas de cultivares e seus controles. Nobel, p. 50-84.

BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, v.209, p.577-589.

BORÉM, A. *Biotecnologia e Meio Ambiente*. Editora: Folha de Viçosa. 425p. 2204.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUSCA, R.C., G.J. BRUSCA. 2007. *Invertebrados*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2ª ed. 968p.

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.

CREDLAND, P.F E J. DENDY. Intraspecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia experimentalis Applicata* 65: 39-47, 1992.

CREDLAND, P.F. Effect of host availability on reproductive performance in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchinae). *The Journal of Stored Products Research*, v. 22, n. 1, p. 49-54, 1987.

CHRISPEELS, M.J., M.F.G. Desa, and T.J.V. HIGGINS. 1998. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Sci. Res.* 8, 257-263.

DERBYSHIRE, E; WRIGHT, D.J & BOULTER. D. 1976. Legumin and vicilina, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15, 3-24.

EMBRAPA (2004). Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins.

Glossário.<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/glossario.htm>> Consultado em 02/10/2013 às 17h10min.

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.

FORGAC, M. (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺) ATPase. *FEBES Lett.* v.440, p.258-63.

FERREIRA, A.M. (1960). Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotessubfasciatus* Boh.) (Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. *Garcia Orta*,8(3):559-581.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., G.C.; Berti Filho, E., Parra,J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D ., Marchini, L.C., Grossi-de-Sá, M.F, Chrispeels, M.J., 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotessubfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 271-281.

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

- 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. Antinutritional proteins in plants. In "Developments in Food Proteins", Vol. 3, pp. 245-293, Hudson, B. J. F. ed., Elsevier, Londres, 1984.
- GOTODA, T., ARITA, M., ARAI, H., et. al. (1995) Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the α -tocopherol-transfer protein. *N. Engl. J. Med.* 333, 1313–1318.
- GUILLARD, M.; DIMOPOLOU, A.; FISCHER, B.; MORAVA, E.; LEFEBER, D.J.; KORNAK, U.; WEVERS, R.A. (2009). Vacuolar H⁺-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1792, p. 903–914.
- ISHIMOTO, M., CHIRISPEELS, M. J. (1996). Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol.* 111, 393-401.
- ISHIMOTO, M., KITAMURA, K., (1989). Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl Entomol Zool* 24, 281-286.
- ISHIMOTO, M., SUZUKI K., IWANAGA M., KIKUCHI F., KITAMURA, K. (1995). Variation of seed α -amylase inhibitors in the common bean. *Theor Appl Genet*, 90, 425-429.
- ISHIMOTO, M., YAMADA, T., KAGA, A., (1999). Insecticidal activity of an α -amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of α -amylase inhibitor in the common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 104-112.
- JACKAI, L.E.N.; DAOUST, R.A. Insect pests of cowpeas. *Annual Review of Entomology*, v. 31, p. 95-119, 1986.
- 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.

JAMES, C. Global status of commercialized transgenic. 32p. NY 2004.

JOHNSON, C.D. (1989). Adaptive radiation of Acanthoscelides in seeds: examples of legume-bruchid interactions. In: Stirton, C.H., Zarucchi, J.L. (Eds.). *Advances in legume biology. Monographs in Systematic Botany*, 29:747-779.

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

LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. O.; BARROS, R.; TORRES, J. B.; GONÇALVES, M. E. C. Estabilidade da resistência de genótipos de caupi a *Callosobruchus maculatus* ((Fabr.)) em gerações sucessivas. *Sci. Agric.* n. 59, 2002, p275-280.

LOPES, J.R.S., Omoto, C. (2002). *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba, Fealq, 20p.

LOCKE, M., Collins, J.V. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *Journal of Cell Biology*, 36:453-483.

MACEDO, M.R.L.; 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 or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Braz. Journal and Biol. Reserch* 28: 183-190.

MELLO, M.O. SILVA-FILHO, M. Plant Insect interactions: na evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 14, p. 71-81, 2002.

MICHAUD, D., BERNIER-VADNAIS, N., OVERNEY, S., YELLE, S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (coleoptera: chrysomelidae). *Insect Biochemistry Molecular and Biology*, v. 25, n. 9, p. 1041-1048, 1995.

NISHI, T. FORGAC, M. (2002). The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v. 3, p. 94 -103.

OLIVEIRA, A.C., FERREIRA, D.F., RAMALHO, M.A.P.,
Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas.
Editora: Editora: Univ. Fed. Lavras. 332p, 2005.

OLIVEIRA, G. B.; KUNZ, D.; PERES, T. V.; LEAL, R. B.; UCHOA, A. F. ; RIBEIRO, A. F. ; Samuels, R.I ; MACEDO, M. L. R. ; TERRA, W. R. ; Silva, C. P. . The Vicilin Variant From a Resistant *Vigna unguiculata* Variety (IT81D-1053) Affects Endocytosis in Larval *Callosobruchus maculatus* Midgut Epithelium. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology (Online)*, 2013.

PANIZZI, A. R. Insect bioecology and nutrition for integrate pest management: Contemporary topics in entomology series. [S.l.]: CRC Press, 2012.

QUINTELA, E.D., NEVES, B.P. das, QUINDERÉ, M.A.W., ROBERTS, D.W. (1991). *Principalis plagas del caupi en el Brasil*. Goiânia: Embrapa-Cnpaf. (Embrapa-Cnpaf.Documentos, 35).

RUPPERT, E. E; FOX, R. S.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7. ed. São Paulo: Rocca, 2005.

SALES M.P., GERHARDT I.R., GROSSI-DE-SÁ M.F., XAVIER-FILHO J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*, 124:515-522.

SATO, Y., ARAI, H., MIYATA, A., et al. (1993) Primary structure of α -tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *J. Biol. Chem.* 268,17705–17710.

STANLEY, D.W., BEDICK, J.C. (1997). Home Page. *Entomology 401/80. Insect Physiology 311, PlantIndustryBldg* (<http://entomology.unl.edu/ent801/ent801home.html>).

STEVENS, T.H.; FORGAC, M. (1997). Structure, function, and regulation of the vacuolar (H⁺) ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.13, p.779-808.

SINGH, B.B., EHLERS, J.D., SHARMA, B., FREIRE FILHO, F.R. (2000). Recent progress in cowpea breeding. In: Proceedings of world cowpea conference III, 4-7. IITA,Ibadan, Nigeria, pp. 22-40.

SILVA ,B; The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae).

SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. (1991). Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comp.Biochem. Physiol* 99B, 529-533.

SILVA, C. P., TERRA, W. R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI de SÁ, M. F., LOPES, A. R., PONTES E. G. (1999). Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 355-366.

SILVA, C. P., TERRA, W. R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI de SÁ, M. F., ISEJIMA, E. M., DAMATTA, R. A., MIGUENS, F. C., BIFANOP, T. D. (2001a). Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 41-50.

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 the bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 24(1):449-473

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

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

TRIPLEHORNE, C. A.; JOHNSON, N. F. Estudos dos insetos. Cenage Learning, São Paulo, 2011, 809p.

UCHÔA A.F, DAMATA R.A., RETAMAL C.A., ALBUQUERQUE-CUNHA J.M., SOUZA S.M., SAMUELS R.I., SILVA C.P., XAVIER-FILHO J. 2006. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs os larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Insect Physiol.* 169-78.

WIECZOREK, H.; BEYENBACH, K.W.; HUSS, M.; VITAVSKA, O. (2009). Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *Journal of Experimental Biology*, v. 212, p.1611-1619.

WOLFERSBERGER, M., LUETHY, P., MAURER, A., PARENTI, P., SACCHI, F.V.,GIORDANA, B., HANOZET, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 86 (2), 301–308.

WIGGLESWORTH, V.B. (1974). The circulatory system and associated tissues. In: *Insect Physiology, Seventh Edition*, Chapman and Hall, London, 33-45p.

WILLIAMS, J.O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigéria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 26:5-10.

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

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

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

ZHU, K., HUESING, J. E., SHADE, R. E., MURDOCK, L L (1994). Cowpea trypsin inhibitor and resistance to cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) in cowpea variety TVu 2027. *Environ. Entomol.* 23, 987-991.