

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

**DANIELE KUNZ**

**Mecanismos da endocitose de vicilinas em células epiteliais do  
intestino médio das larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus*  
(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFSC como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora.

Orientador: Carlos Peres Silva

**Florianópolis 2017**

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

Kunz, Daniele

Mecanismos da endocitose de vicilinas em células  
epiteliais do intestino médio das larvas do caruncho  
*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae:  
Bruchinae) / Daniele Kunz ; orientador, Carlos Peres  
Silva - Florianópolis, SC, 2017.

100 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Endocitose. 3. Epitélio intestinal dos  
insetos. 4. Domínio CRAL-TRIO. 5. Proteína transportadora de  
?-tocoferol. I. Silva, Carlos Peres . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. III. Título.

**“Mecanismos da endocitose de vicilinas em células epiteliais do intestino médio das larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)”**

Por

**Daniele Kunz**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (13/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

---

Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

---

Dr(a) Carlos Peres Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

---

Dr(a) Rodrigo Bainy Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr(a) Guilherme Toledo Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)

**JONAS ARNEMANN**

---

Dr(a) Jonas André Arnemann (Universidade Federal de Santa Maria)

---

Dr(a) Richard I. Samuels (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)

Florianópolis, 10 de março de 2017.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Carlos Peres Silva pela confiança, estímulo e dedicação 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.

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

Ao meu amor Thiago Pico pelo encorajamento e incentivo, tendo amorosamente me suportado durante estes anos sempre com muito cuidado e zelo que temo, nem sempre, ter retribuído à altura.

À minha família que tanto amo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio à pesquisa durante a execução desta Tese.



## RESUMO

O transporte de proteínas através do epitélio intestinal dos insetos é ainda pouco conhecido. Há evidências de que vicilina, uma importante proteína de armazenamento de sementes do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), é internalizada em larvas do bruquíneo *Callosobruchus maculatus*. Tem sido relatado que esta globulina de armazenamento interage com proteínas presentes nas membranas microvilares ao longo do trato digestivo das larvas. Na presente Tese, as vias celulares envolvidas na endocitose de vicilina em larvas do caruncho *C. maculatus* foram estudadas. Vicilina marcada com FITC (purificada a partir de sementes do feijão-de-corda) foi incorporada na dieta das larvas de *C. maculatus* na concentração fisiológica (0,5% m/m). O destino das globulinas marcadas ou não-marcadas foi monitorado por microscopia confocal, imunohistoquímica e Western blotting. A proteína microvilar de ligação à vicilina foi purificada usando cromatografia de afinidade em uma coluna de vicilina-Sepharose seguida por espectrometria de massa MALDI-TOF. A absorção de vicilinas é um caso de endocitose mediada por receptor. O receptor de vicilina foi purificado e mostrou uma elevada homologia com as proteínas da superfamília SEC14, principalmente a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Estas proteínas estão presentes no intestino das larvas nas microvilosidades das células epiteliais, associadas a vesículas de endocitose. Vesículas endocíticas e cisternas foram encontradas em toda a extensão das células epiteliais do intestino médio. O tipo de transcitose destas macromoléculas foi confirmado através da utilização de inibidores específicos da via endocítica mediada por clatrina ou via mediada por caveolina. Os inibidores filipina III, nistatina e wortmanina inibiram significativamente a endocitose de vicilina, sugerindo que a via endocítica é principalmente mediada por caveolina. Este trabalho mostrou que a transcitose de vicilina através das células do intestino médio de larvas do inseto *C. maculatus* é mediada por um membro da família SEC14 homóloga à proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. É possível sugerir que vicilina é internalizada por endocitose dependente majoritariamente por caveolina. Em relação à faseolina foi observada dificuldade de internalização pelas larvas de *C. maculatus*. Estas globulinas favoreceram a geração de espécies reativas de oxigênio, onde o aumento da peroxidação lipídica foi determinado pelo método TBARS e o uso de anticorpos anti malondialdeído e 4-hidroxinonenal.

**Palavras-chave:** Endocitose; epitélio intestinal dos insetos; domínio CRAL-TRIO; proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol.



## ABSTRACT

The transport of proteins across the intestinal epithelium of insects is still little known. There is evidence that vicilin, a major storage protein of cowpea seeds (*Vigna unguiculata*), is internalized in larvae of the bruchid *C. maculatus*. It has been reported that this storage globulin interacts with proteins present in the microvillar membranes along the digestive tract of the larvae. In the present Thesis, the cellular routes involved in the endocytosis of vicilin in larval *C. maculatus* was investigated. FITC-labeled vicilin (purified from *C. maculatus* susceptible seeds of cowpea) were incorporated into the diet of the larvae at physiological concentration (0.5% m/m). The fate of labeled or non-labeled globulins was monitored by confocal microscopy, immunohistochemistry and western blotting. The microvillar vicilin-binding protein was purified by using affinity chromatography on a vicilin-Sepharose column followed by MALDI-TOF mass spectrometry. The absorption of vicilins is a case of receptor-mediated endocytosis. The putative vicilin receptor was purified and showed high homology with proteins from the SEC14 superfamily. These proteins are present in the luminal surface of the midgut cell microvilli and inside these epithelial cells, associated to endocytic vesicles. Endocytic vesicles and cisternae were found throughout the extent of midgut epithelial cells. The type of transcytosis of these macromolecules was confirmed through the use of specific inhibitors of clathrin or caveolin-mediated pathways. The inhibitors filipin III, nystatin and wortmannin significantly inhibited the endocytosis of vicilin, suggesting that the endocytic pathway is mediate mainly by caveolin. In this Thesis it was shown that the transcytosis of vicilin through the midgut cells of larval *C. maculatus* is mediated by a member of the SEC14 family homologous to the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein. It is possible to suggest that vicilin is internalized by endocytosis dependent on caveolin. In relation to the phaseolin, it was observed difficulty of internalization by the larvae of *C. maculatus*. These globulins favor the generation of reactive oxygen species, where the increase of lipid peroxidation was determined by the TBARS method and the use of anti-malondialdehyde and 4-hydroxynenal antibodies.

**Keywords:** Endocytosis; insect midgut; CRAL-TRIO domain;  $\alpha$ -tocopherol transfer protein.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> . A) Fêmea realizando a postura dos ovos; B) Larva de primeiro instar no interior do cotilédone da semente; C) Terceiro instar larval; D) Fase de pupa; E) Emergência do inseto adulto; F) Estágio larval G) Pupa; H) Inseto adulto.....	25
Figura 2- <i>Vigna unguiculata</i> (Leguminosa) feijão de corda.....	26
Figura 3 - Estrutura tridimensional da vicilina de <i>Vigna unguiculata</i> . Demonstração dos trímeros com subunidades entre 45 e 70 KDa. ....	28
Figura 4 - Gênero <i>Phaseolus</i> (Leguminosa) feijão carioquinha, feijão preto, feijão marrom. ....	30
Figura 5 - Representação esquemática da transcitose de macromoléculas cruzando o epitélio intestinal na direção do meio interno. Macromolécula em roxo, logo após a formação de uma vesícula seguindo a fusão dessas vesículas para formação de endossomo na cor azul. O processo é finalizando com transcitose da macromolécula representada na cor vermelha sendo liberada na superfície basolateral.	32
Figura 6 - Modelo da estrutura tridimensional e conservação do domínio SEC14 em insetos. A estrutura tridimensional da proteína é composta por alternados de $\alpha$ -hélices e folhas $\beta$ , (Smith et. al, 2015).....	35
Figura 7 - Corte em criostato das larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com a vicilina purificada marcada com FITC, demonstração do epitélio intestinal. A) Larva de 2 <sup>o</sup> instar; B) Larva do 4 <sup>o</sup> instar. A internalização da vicilina é observada através da fluorescência em verde tanto no epitélio intestinal como no corpo gorduroso; EP- Epitélio intestinal; FB- Corpo gorduroso; S- Grânulo de amido; L- Lúmen; V- vesículas. ....	53
Figura 8 – Microscopia confocal demonstrando a internalização do complexo vicilina-FITC na forma de vesículas endocíticas no citoplasma das células do epitélio intestinal das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> . Preparações a fresco de epitélios intestinais foram incubadas com vicilina marcada com FITC na concentração de 120 nM em tampão PBS pH 7.2 por 3 horas antes da observação e documentação em microscópio confocal. Núcleos corados com DAPI. N= núcleo; V= vesículas endocíticas.....	54
Figura 9 – Curso temporal das vicilinas endocitadas. A internalização das proteínas marcadas com FITC foi registrado no tempo zero min até 75 min por microscopia confocal. As setas indicam o surgimento das vesículas no epitélio intestinal. Barra 50 $\mu$ m. ....	55

Figura 10 - Viabilidade celular dos isolados intestinais da larva de <i>C.maculatus</i> . (Método MTT).....	56
Figura 11 - Perfil de eluição das proteínas de microvilosidades intestinais das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> em coluna de vicilina-Sepharose. As proteínas foram obtidas a partir da extração das proteínas microvilares com o detergente Triton X-100 e posteriormente submetidas ao fracionamento por cromatografia de afinidade em coluna vicilina-Sepharose. P1= Eluição com 50mM Tris-HCl, pH 8.0 com 0,1% Triton X-100; P2= Eluição com 250mM NaCl, pH 8.0 com 0,1% Triton X-100; P3= fração eluída com solução de ácido acético 0,1M contendo Triton X-100 0,1%, pH 8.0. ....	58
Figura 12 - Análise de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) corado com nitrato de prata das frações eluídas da cromatografia de afinidade em coluna de vicilina-Sepharose. P1, Primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio; P2, fração eluída com a adição de NaCl; P3, Fração eluída com ácido acético. ....	59
Figura 13 - Alinhamento das sequências de proteínas da superfamília SEC14. <i>Drosophila yakuba</i> , <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Drosophila simulans</i> , <i>Drosophila erecta</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Drosophila mojavensis</i> , <i>Oryctes borbonicus</i> . Os aminoácidos estão coloridos seguindo quatro tipos: ácido, azul; básico, cor de rosa; hidrofóbico, vermelho; hidrofílico, verde. * significa que as sequências são idênticas naquela posição; = indicam substituições conservativas; . substituições semi- conservativas. Destaque para sequência de aminoácidos idênticos. ....	61
Figura 14 – Modelagem da estrutura da proteína presente nas microvilosidades intestinais de <i>Callosobruchus maculatus</i> . Painel A) O modelo foi baseado na estrutura do transportador de $\alpha$ - tocoferol humano, o ligante é $\alpha$ -tocoferol (ZIND ID 5921400). A imagem 3D foi criada utilizando-se o programa Phyre2. Painel B) Gráfico de Ramachandran, em azul forte (sinalizado por pontos pretos) representa a concentração de aminoácidos em regiões mais favoráveis (Gráfico criado em: <a href="http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php">http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php</a> ). ....	62
Figura 15 - Análise da interação das proteínas eluídas da coluna de afinidade vicilina-Sepharose com o complexo vicilina-FITC, com o anticorpo anti proteína transportadora de $\alpha$ -tocoferol e com a mistura do complexo vicilina-FITC mais $\alpha$ -tocoferol. A) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose em SDS – PAGE 12 % corados com nitrato prata; B) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose incubadas em tampão PBS com o complexo	

vicilina-FITC; C) Western blotting das frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose, utilizando anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol; D) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose incubados por 1h em tampão PBS com  $\alpha$ -tocoferol seguido por incubação com vicilina purificada marcada com FITC, demonstrando a inibição da ligação da vicilina às proteínas microvilares. .... 63

Figura 16 - Inibição da endocitose de vicilina na presença do anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Epitélio intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* pré-incubados com anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol durante 30 minutos. Após, incubados em presença de vicilina marcada com FITC na concentração de 120nM por 3h. Os dados foram analisados por análise de variância ( $P < 0,001$ ). ..... 64

Figura 17- Co-localização de vicilina e a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol através de imunohistoquímica. Cortes em criostato da larva inteira de *Callosobruchus maculatus* alimentada com proteína purificada da semente de *Vigna unguiculata* marcada com FITC. A) Corpo gorduroso; B e C) Maior intensidade de fluorescência no corpo gorduroso, co-localização do anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol com a vicilina; D) Corte com campo claro, co-localização do anticorpo anti a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol; FB (corpo gorduroso); L (lúmen); C (cutícula); EP (epitélio intestinal). ..... 65

Figura 18 - Imunolocalização de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Nos painéis A e B encontram-se micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em cortes do epitélio intestinal da larva de *Callosobruchus maculatus* alimentada com vicilina purificada. As setas indicam as marcações nas microvilosidades onde a proteína microvilar foi reconhecida pelo anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. .... 66

Figura 19 - Inibição da endocitose de vicilinas em células do epitélio intestinal de das larvas do inseto *C. maculatus*. Microscopia confocal demonstrando fluorescência em verde ligada à superfície celular dos epitélios, pré-incubados durante 30 min. com inibidores da rota de endocitose mediada por caveolina e 3h com vicilina marcada com FITC. A) Nistatina 15 $\mu$ M ; B) Filipina III 4 $\mu$ M; D) Wortmanina 1 $\mu$ M. N= Núcleos corados com DAPI. Barras 50  $\mu$ m..... 67

Figura 20 - Endocitose de vicilinas em células do epitélio intestinal de *Callosobruchus maculatus* na presença de inibidores da rota mediada por clatrina. Microscopia confocal demonstrando fluorescência em verde

no citoplasma celular do epitélio da larva do inseto *Callosobruchus maculatus*, pré-incubado durante 30 min com inibidores da rota de endocitose mediada por clatrina e 3h com a vicilina marcada com FITC. A) Clorpromazina 10 µM; B) Óxido de phenylarsina 6 µM. N= núcleos corados com DAPI; V= Vesículas endocíticas com vicilina purificada marcada com FITC. Barras 50 µm. ....67

Figura 21 - Efeito de inibidores das rotas endocíticas na internalização de vicilina em epitélios intestinais incubados com o complexo vicilina-FITC. Epitélios intestinais das larvas de *Callosobruchus maculatus* foram pré-incubados com inibidores por 30 minutos e depois incubados em presença de vicilina marcada com FITC na concentração de 120nM por 3h. Cada tratamento foi realizado com três repetições independentes. Os dados foram analisados por análise de variância ANOVA (\*p>0,001; \*\*\*p<0,001), em seguida, analisados separadamente por um teste post hoc Tukey. P= 0,05. As leituras foram mensuradas no fluorímetro.....68

Figura 22 - Quantificação da intensidade de pixels das imagens (FITC). Média da intensidade no total de 50 células independentes. Os valores da linha de células do epitélio intestinal (faseolina) a linha de vicilina (controle). \*\*, P <0, 001. Quantificações realizadas em epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus ex-vivo*. ....69

Figura 23 - Células do epitélio intestinal de larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus*. No painel A células após o tratamento com vicilina/FITC; Painel B células após tratamento com faseolina/FITC. N = Núcleo; V = Vicilina; F = Faseolina.....70

Figura 24 - Corte em criostato da larva inteira do caruncho *Callosobruchus maculatus*. Na figura A larva alimentada com vicilina purificada marcada com FITC; B Larva alimentada com faseolina purificada marcada com FITC. FB = corpo gorduroso; L = lúmen; E = epitélio. ....71

Figura 25 - Níveis dos complexos faseolina e vicilina - FITC em células do corpo gorduroso do caruncho *Callosobruchus maculatus*. Larvas do 3<sup>o</sup> instar alimentadas por 24h com as proteínas purificadas faseolina e vicilina – FITC. A média da intensidade no total de 30 animais independentes. Os valores da linha de células do corpo gorduroso são indicados em relação à linha de controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,005, ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc de Duncan*). Quantificações realizadas com valores obtidos pelo scanner a laser FLA3000. C.G = corpo gorduroso.....71

- Figura 26 - Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em Larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*. Larvas expostas a faseolina por 24 horas e epitélios inteiros expostos a Sulfato Ferroso de Amônio 30µm durante 30 minutos. Peroxidação lipídica medida pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,005$ , ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc de Tukey*). ..... 72
- Figura 27 - Reconhecimento pelos anticorpos de marcadores da peroxidação lipídica. A) Larvas do inseto *Callosobruchus maculatus* foram pré- tratadas com faseolina e vicilina purificadas durante 24 horas. Após esse período foram removidos os intestinos. As concentrações de proteínas foram normalizadas para 3µg/ml. A peroxidação lipídica foi medida pelo método Tbars. B) Reconhecimento de marcadores bioquímicos da peroxidação lipídica, anticorpos HNE (4-hidroxinonenal) e MDA (malondialdeído). Para o trabalho, foi utilizada Teste de *student*, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . ..... 73
- Figura 29 - Viabilidade celular de epitélios intestinais das larvas de *C. maculatus* expostos a vicilina (controle), faseolina e sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ). O tempo de incubação com os compostos por 30 min. Após esse tempo foi analisado a viabilidade celular através da redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Barras representam porcentagem em relação ao grupo controle. (Análise de variância de uma via seguida pelo teste *post hoc de Tukey*). ..... 74



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>HNE</b>	4-hidroxinonenal
<b>m/m</b>	massa/massa
<b>m/v</b>	massa/volume
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Solução salina em tampão fosfato
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenediamina
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	23
1.2 INSETOS DA ORDEM COLEÓPTERA .....	23
1.3 <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE) .....	25
1.4 PROTEÍNAS DE RESERVA (GLOBULINAS 7S) .....	27
1.5 PROCESSO DE ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS QUE CRUZAM O EPITÉLIO INTESTINAL .....	30
1.6 ABSORÇÃO DE VICILINAS E A RESISTÊNCIA A CARUNCHOS .....	32
1.7 DOMÍNIO CRAL-TRIO .....	34
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>43</b>
4.1 COLÔNIA DE INSETOS .....	43
4.2 PREPARAÇÕES DE MICROVILOSIDADES .....	43
4.3 PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR .....	43
4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	44
4.5 ESPECTOMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF) .....	44
4.6 WESTERN BLOTTING .....	45
4.7 MARCAÇÃO DE VICILINA COM FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA) .....	45
4.8 ALIMENTAÇÃO DE LARVAS COM VICILINAS .....	46
4.9 MICROTOMIA (CRIOSTATO) .....	46
<b>5. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</b> .....	<b>47</b>
5.1 IMUNOMARCAÇÃO (IMUNOGOLD) .....	47
5.2 ESTUDO DA ROTA ENDOCÍTICA .....	47
5.3 QUANTIFICAÇÕES DE VICILINA FLUORESCENTE NAS VESÍCULAS ENDOCÍTICAS .....	48
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE FITC .....	48

5.5	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	48
5.6	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PERÓXIDOS TOTAIS E DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	49
5.7	DOT BLOT.....	50
5.8	ANÁLISE DA VIABILIDADE MITOCONDRIAL.....	50
5.9	IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA.....	50
<b>6.</b>	<b>MODELAGEM POR HOMOLOGIA.....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
7.1	ESTUDO DA ENDOCITOSE DE VICILINAS NO CARUNCHO <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> .....	53
7.1.1	Endocitose de vicilinas das sementes de <i>Vigna unguiculata</i> em larvas do caruncho <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	53
7.1.2	Endocitose em isolados intestinais <i>ex vivo</i> do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> .....	53
<b>8.</b>	<b>PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE VICILINA, OBTIDO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE VICILINA-SEPHAROSE.....</b>	<b>57</b>
8.1	PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	57
8.2	ANÁLISE DA ESPECTOMETRIA DE MASSAS DA PROTEÍNA PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES INTESTINAIS DO CARUNCHO <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> .....	59
8.3	VALIDAÇÃO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE A-TOCOFEROL COMO O RECEPTOR DE VICILINA.....	62
8.4	CARACTERIZAÇÃO DA ROTA ENDOCÍTICA DA VICILINA.....	66
<b>8.4.1</b>	<b>Efeito dos inibidores sobre a endocitose de vicilina em epitélios <i>ex-vivo</i> do caruncho <i>Callosobruchus maculatus</i>.....</b>	<b>68</b>
8.5	MECANISMOS DA FASEOLINA COMO AGENTE LIMITANTE NA CAPACIDADE DO INSETO <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> EM ABSORVER ANTIOXIDANTES.....	69
<b>8.5.1</b>	<b>Microscopia de Fluorescência.....</b>	<b>69</b>
<b>8.5.2</b>	<b>Quantificação da intensidade de fluorescência nos epitélios intestinais incubados com o complexo vicilina-FITC.....</b>	<b>69</b>
<b>8.5.3</b>	<b>Efeitos da faseolina sobre marcadores de estresse oxidativo ..</b>	<b>72</b>
<b>8.5.4</b>	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>

9.1 ENDOCITOSE DE PROTEÍNAS INTACTAS ATRAVÉS DO EPITÉLIO INTESTINAL DE INSETOS DA ESPÉCIE <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> . .....	75
9.2 MECANISMOS DA FASEOLINA COMO AGENTE LIMITANTE NA CAPACIDADE DO INSETO <i>CALLOSOBRUCHUS MACULATUS</i> EM ABSORVER ANTIOXIDANTES. ....	81
<b>10. CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

No Brasil, entre os anos de 2015 e 2016, a área plantada de feijão foi de 2,8 milhões de hectares plantados (Conab). O Brasil atualmente ocupa a terceira posição no ranking de produtores de feijão mundial, ficando atrás da Índia e China, a produção brasileira de feijão chegou a 3,05 milhões de toneladas na safra 2016/2017, significando um aumento expressivo na produção (Ministério da Agricultura, 2017). O Brasil é de um dos principais produtores e consumidor do grão, sendo esta leguminosa um produto com alta importância econômica e social no País, fonte principal de proteínas, vitaminas e sais minerais para população carente. A produção de feijão, há décadas é utilizada como alternativa econômica de exploração agrícola em pequenas propriedades e como atividade de ocupação de mão-de-obra menos qualificada nas diversas regiões rurais brasileiras.

A cultura do feijão é bastante suscetível às condições climáticas, ainda o uso intensivo de inseticidas químicos favorece o aumento de pragas nas culturas, prejudicando a colheita. Com o aumento das pragas, o uso de inseticidas tem sido constante e muitas vezes indiscriminado, aumentando o custo e tornando o controle de pragas mais difícil e complexo. Quando o grão é armazenado de forma inadequada favorece a infestação por insetos pragas, como o inseto *Callosobruchus maculatus*, estes insetos se alimentam do interior do grão, prejudicando o poder germinativo da semente e aceitabilidade pelo consumidor. Quando estes insetos atacam essas sementes armazenadas podem produzir gerações em alguns dias, a espécie *C. maculatus* é conhecida por possuir um alto potencial biótico, uma vez que fêmeas adultas deste inseto podem realizar a ovoposição de até 80 ovos por dia e são áfagos.

Desta forma, buscam-se consolidar estudos de proteínas ativas que atravessam a barreira intestinal dos insetos, como as vicilinas que são as principais proteínas de reserva da semente de *vigna unguiculata* e tornam-se importantes uma vez que tem sido descrito ser uma forma importante para atingir o meio interno dos insetos. Visando assim, a soma de esforços para minimização dos problemas ambientais, de saúde pública e agro-econômicos.

### 1.2 INSETOS DA ORDEM COLEÓPTERA

Coleóptera é a maior ordem dos insetos, um número estimado entre 350.000 a 375.000 espécies descritas, os insetos que compõem essa ordem, são conhecidos por ter 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).

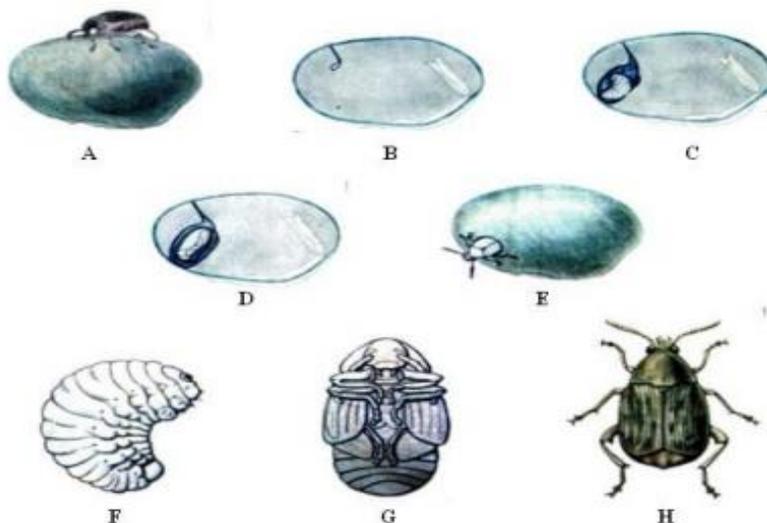
Esse grupo é constituído por besouros, que se alimentam de sementes principalmente de leguminosas (Fabaceae), com importância econômica dentre as culturas estão feijões, ervilhas e soja. A espécie *Callosobruchus maculatus* (figura 1) do bem sucedido gênero *Callosobruchus* de brocas de sementes, originalmente 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 besouros 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 *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)

A maioria das pragas que atacam as lavouras é de coleópteros, insetos adultos ou suas larvas. Já outras espécies destroem sementes de um imenso número de leguminosas (Southgate, 1979). Johnson em 1989 fez um levantamento das relações de infestações de bruquídeos e diferentes espécies de plantas no campo constatando que os bruquíneos são importantes predadores de sementes de 35 famílias de plantas hospedeiras e, aproximadamente 85% das plantas hospedeiras registradas foram de leguminosas (Fabaceae).

Figura 1 - Ciclo de vida do inseto *Callosobruchus maculatus*. A) Fêmea realizando a postura dos ovos; B) Larva de primeiro instar no interior do cotilédone da semente; C) Terceiro instar larval; D) Fase de pupa; E) Emergência do inseto adulto; F) Estágio larval G) Pupa; H) Inseto adulto.



Fonte: Google. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

As infestações por *C. maculatus* podem se iniciar no campo, as fêmeas põem em média, 80 ovos, os quais são depositados na superfície dos grãos.

Após a eclosão, as larvas penetram nas sementes, onde se alimentam dos cotilédones formando galerias até puparem no seu interior. Além da perda de peso e do valor comercial dos grãos por causa das galerias provocadas pelas larvas, os carunchos diminuem

significativamente o poder germinativo das sementes (Quintela et al., 1991).

Espécimes da espécie *C. maculatus* só se alimentam e crescem no interior das sementes de feijões. Já os adultos podem ser mantidos sem se alimentar ou ingerir água, por isto são chamados insetos áfagos. Seu tempo de vida é relativamente curto, aproximadamente de duas a três semanas, dependendo das condições climáticas, passando boa parte desse tempo acasalando-se e realizando a postura de ovos nos feijões. Nas zonas tropicais do Oeste da África e no Nordeste brasileiro, o caruncho *C. maculatus* se desenvolve em sementes de espécies selvagens e cultivadas do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (Leguminosa) (Figura 2).

Figura 2- *Vigna unguiculata* (Leguminosa) feijão de corda.



Fonte: <<https://www.google.com.br/vignaunguiculata>> acesso em 26 fevereiro de 2016.

Esses pequenos besouros estabeleceram uma relação muito estreita com as leguminosas, sendo que cerca de 84% das espécies de bruquíneos se desenvolvem unicamente no interior de sementes de leguminosas. Para se desenvolverem em tantas diferentes espécies de leguminosas, algumas das

quais ricas em compostos extremamente tóxicos, as larvas desses insetos desenvolveram múltiplas vias de detoxificação. Não por acaso, as relações entre bruquíneos e sementes de leguminosas são muito exploradas em estudos ecológicos. Das cerca de 1700 espécies incluídas

na subfamília Bruchinae, aproximadamente 30 espécies se adaptaram a atacar sementes estocadas pelo homem.

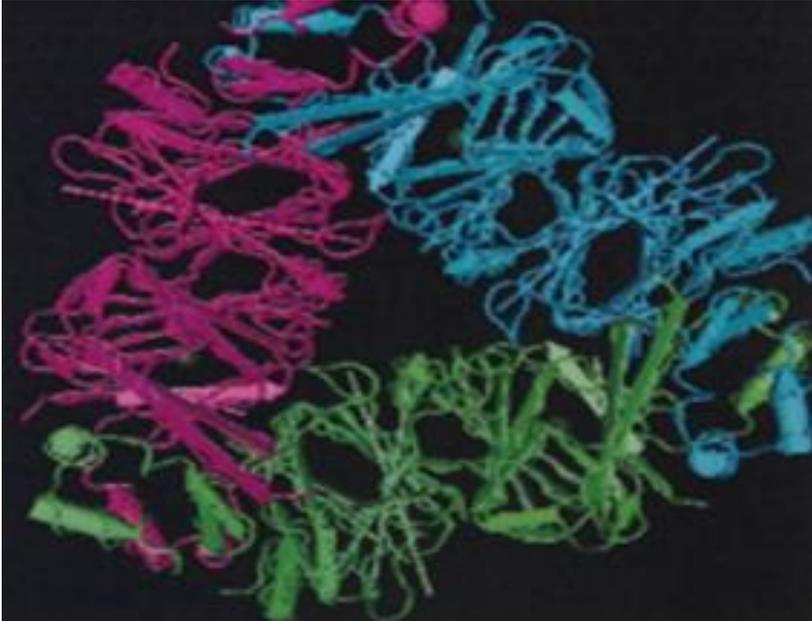
A espécie *C. maculatus* vem se tornando uma espécie modelo em diversos estudos ecológicos como, por exemplo, em estudos de conflito sexual e de adaptação a proteínas de defesa vegetais. Com relação à história dos estudos das bases bioquímicas das relações entre plantas e insetos herbívoros, *C. maculatus* vem tendo uma participação de destaque. O primeiro trabalho a sugerir a participação de uma proteína no mecanismo de defesa de uma planta a um inseto em particular envolveu as sementes de *V. unguiculata* e as larvas de *C. maculatus* (Gatehouse et al., 1979).

#### 1.4 PROTEÍNAS DE RESERVA (GLOBULINAS 7S)

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de destaque nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e tem amplo significado social, constituindo-se em um dos principais alimentos protéicos e energéticos da população brasileira. Em alguns estados, como exemplo Roraima, seu cultivo representa papel importante não só na subsistência dos agricultores, mas também como produto de valor comercial, sendo vendido para consumo tanto seco como verde, o que possibilita ao agricultor um período maior de venda (Menezes et al., 2007).

As vicilinas formam uma classe bem conhecida de proteínas de reserva de plantas e nas sementes de feijão-de-corda a maior parte das proteínas presentes são vicilinas que constituem 25% do peso seco destas sementes (Müntz et al., 1986). As vicilinas são moléculas oligoméricas, classificadas como globulinas 7S de acordo com o seu coeficiente de sedimentação, possuem grau variado de glicosilação (Shutov et al., 1995), apresentam uma composição de aminoácidos com altas concentrações de ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, fenilalanina e leucina, mas têm, no entanto, concentrações mínimas de aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína (Carasco et al., 1978; Macedo et al., 1995). As vicilinas são solúveis em soluções salinas (Fernandes & Xavier-Filho 1998), não possuem ligação dissulfeto em suas cadeias polipeptídicas, apresentam grande heterogeneidade (Sales et al., 2000), massa molecular em torno de 150 kDa e se agregam para formar trímeros de subunidades com massas moleculares variando entre 45-70 kDa (Fernandes & Xavier-Filho 1998). As globulinas representam entre 50 a 90% de toda a proteína encontrada nos grãos de leguminosa, sendo assim, a proteína de reserva majoritária (Utsumi, 1992).

Figura 3 - Estrutura tridimensional da vicilina de *Vigna unguiculata*. Demonstração dos trímeros com subunidades entre 45 e 70 KDa.



Fonte: <<https://www.google.com.br/vicilina>> Acesso em março de 2016.

Já há algum tempo certas proteínas como as vicilinas e faseolina, têm sido consideradas como parte do arsenal químico da defesa de diversas plantas, em especial quando se trata da defesa de sementes. Como durante essa fase da vida da planta os indivíduos são vulneráveis e injúrias podem ser potencialmente mortais, muitas sementes acumulam um coquetel de substâncias potencialmente tóxicas para evitar o mínimo dano provocado por animais.

As vicilinas são codificadas por um grande número de genes (Shewry et al., 1995) e as porções N-terminal das sequências mostram similaridade com as regiões C-terminal sugerindo que essas proteínas surgem de um evento de duplicação gênica (Shewry et al., 1995; Shutov et al., 1995). Estruturas tridimensionais de várias destas proteínas foram identificadas por cristalografia de raios-X (Figura 3) confirmando a simetria da molécula e a disposição das subunidades no trímero (Ng et al., 1993). Há tempos estudos vêm sugerindo que vicilinas (7s) encontradas em diferentes sementes de leguminosas apresentam genes ancestrais comuns, onde algumas propriedades se mostram similares, como é o caso da sequência de aminoácidos, N- terminal e atividade

biológica são decorrentes de uma evolução genética convergente (Geptes et al. 2005; Argos et al. 1985).

Essas proteínas de reserva parecem ser multifuncionais, fornecendo aminoácidos durante a germinação da planta e participando dos mecanismos de defesa das sementes, sendo tóxica a insetos (Macedo et al., 1993; Shutov et al., 1995; Sales et al., 2000; Oliveira et al., 2014). O mecanismo de ação das vicilinas sobre os bruquídeos ainda não está completamente esclarecido, mas já foram levantados questionamentos de que vicilinas se ligariam à quitina (Yunes et al. 1998; Sales et al., 2001). Isso levou a hipótese de que estas proteínas do feijão - de - corda e outras leguminosas podem se ligar fortemente a várias estruturas contendo quitina (Firmino et al., 1996; Sales et al., 1996, 2001) e nas paredes celulares ou membranas plasmáticas de fungos filamentosos e leveduras (Gomes et al., 1998). Estas informações contribuíram para a idéia da participação das vicilinas no mecanismo de defesa das sementes, em adição à função de reserva protéica.

Na natureza, as sementes de leguminosas estão dentre as mais tóxicas, o que é compreensível, devido ao fato de que elas acumulam muitos nutrientes, principalmente proteínas e amido, além de vitaminas e minerais. Algumas dessas sementes possuem coloração aposemática e se expõe em frutos deiscentes. Poucos são os animais capazes de explorar esse nicho ao mesmo tão rico em nutrientes e tão protegido quimicamente. Somente um grupo restrito e especializado de besouros se adaptou a predação de sementes de leguminosas de forma extensiva e sistemática, um grupo bastante evoluído dentro da família Chrysomelidae, que são os Bruchinae.

Entre as sementes mais utilizadas para alimentação humana estão às pertencentes ao gênero *Phaseolus* e *Vigna*. Os Grãos obtidos a partir das leguminosas representam a segunda colocação na produção mundial de alimentos, sendo que esses fornecem proteínas em quantidade e qualidade necessárias a alimentação humana (Lourenço, 2000; Duranti 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  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -barril. Sementes do gênero *Phaseolus* se caracterizam por apresentar uma superfamília de proteínas potencialmente tóxicas que englobam inibidores de  $\alpha$ -amilases, lectinas e arcelinas. Trabalhos clássicos demonstraram que inibidores de  $\alpha$ -amilases são particularmente tóxicos para bruquídeos pragas do velho mundo, como o já citado *C. maculatus*, além das espécies

*Callosobruchus chinensis* e *Bruchus pisorum* (Ishimoto & Chrispeels, 1996).

Figura 4 - Gênero *Phaseolus* (Leguminosa) feijão cariocinha, feijão preto, feijão marrom.



Fonte: <<https://www.google.com.br/phaseolusvulgaris>> acesso em 11 janeiro de 2017.

### 1.5 PROCESSO DE ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS QUE CRUZAM O EPITÉLIO INTESTINAL

O epitélio intestinal em animais atua como uma barreira que permite uma troca seletiva de moléculas entre o lúmen do intestino e os tecidos internos. A transferência de proteínas inteiras cruzando o sistema digestório para o interior do sistema circulatório de mamíferos foi pela primeira vez descrita no ano de 1936 (Verzár & McDougall, 1936). As macromoléculas podem ser transportadas ao outro lado do intestino por transcitose (Figura 5), um processo complexo em que a macromolécula é internalizada em um ponto da membrana plasmática da célula, dentro de vesículas, para ser transportada para dentro do citoplasma, indo de volta para a membrana plasmática do lado oposto desta mesma célula. Quando internalizada, as vesículas contendo a proteína são transportadas seguindo uma sequência de eventos intracelulares complexos que permitem a fusão desta proteína em compartimentos celulares

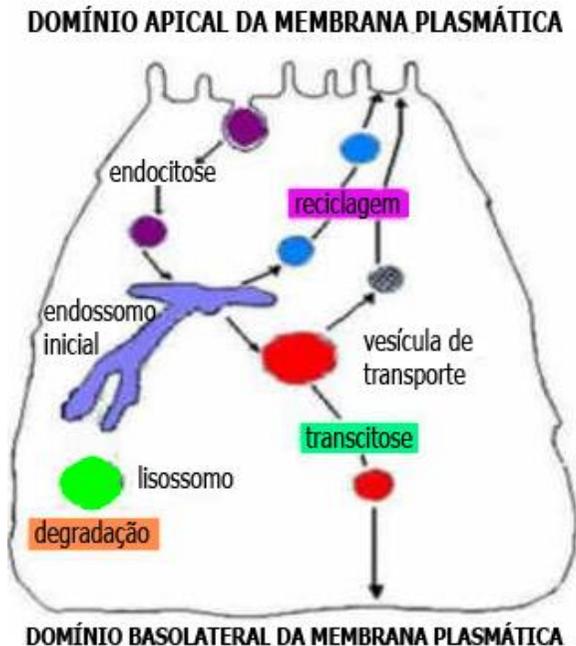
específicos. A transcitose é descrita como um mecanismo de transporte ativo, modulado por um número de passos intracelulares específicos (Apodaca, 2001), que é usado por organismos multicelulares para mover seletivamente um determinado material que cruzará dois ambientes separados.

O transporte de proteínas que cruzam o epitélio intestinal em mamíferos tem sido investigado há décadas (Okamoto, 1998; Apodaca, 2001; Tuma & Hubbard, 2003). Mamíferos neonatos, logo após o nascimento, necessitam adquirir imunidade passiva humoral por transporte de IgG do leite materno cruzando o intestino em direção ao sangue (Sugimura et al., 2001). Quando comparado aos mamíferos, ainda muito pouco é sabido sobre a absorção de proteínas inteiras que cruzam o epitélio do intestino dos insetos. Nestes animais, o transporte através do epitélio de macromoléculas não tem recebido grande importância, apesar da relevância de estudos voltados para esta área ter grande expressão no controle biológico dos insetos. Um dos primeiros pesquisadores a demonstrar a passagem de proteínas intactas que cruzam o sistema digestivo dos insetos foi Wigglesworth ainda no ano de 1943. O autor descobriu que uma pequena quantidade de hemoglobina ingerida foi absorvida e cruzou o intestino de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) em direção à hemolinfa (Wigglesworth, 1943).

Nos últimos anos tem se mostrado a capacidade de algumas proteínas e peptídeos, atingir o meio interno, através do epitélio intestinal de insetos sendo considerado um método promissor para a interiorização de substâncias tóxicas na hemocele (Casartelli et al., 2005; Jeffers & Roe, 2008; Fiandra et al., 2009). Algumas lectinas mostraram-se capaz de atravessar o epitélio intestinal de insetos (Casartelli et al., 2005; Fitches et al., 2001; Powell et al., 1998), sendo utilizadas como uma proteína de fusão recombinante com peptídeos entomotóxicos (Fitches et al., 2002). Alguns estudos demonstraram a possibilidade de absorção, internalização e ação de moléculas de proteínas em órgãos internos, dos insetos, além de ser um processo importante, é comum nestes animais. No ano de 2000 Paes e colaboradores demonstraram, que proteínas tóxicas a bruquídeos, como as arcelinas, não somente se ligam à parede do intestino, mas são também encontradas nos órgãos internos das larvas de *Z. subfasciatus*. O feijão *P. vulgaris*, conhecido como feijão preto ou comum, contém uma família de proteínas chamadas arcelinas, que é comprovadamente tóxica para as larvas da espécie *Z. subfasciatus*, as arcelinas do tipo 1 encontradas nessas sementes causam um retardo no crescimento dessas larvas, pois, promovem uma alteração na estrutura do intestino médio e penetram para o interior da hemolinfa.

Uchôa et al. 2006, confirmaram o transporte de vicilinas do lúmen do intestino médio para dentro da hemolinfa de *C. maculatus* e mostraram que estas proteínas também foram detectadas nos túbulos de Malpighi e no corpo gorduroso 48 h após a ingestão.

Figura 5 - Representação esquemática da transcitose de macromoléculas cruzando o epitélio intestinal na direção do meio interno. Macromolécula em roxo, logo após a formação de uma vesícula seguindo a fusão dessas vesículas para formação de endossomo na cor azul. O processo é finalizando com transcitose da macromolécula representada na cor vermelha sendo liberada na superfície basolateral.



Fonte: <<https://www.google.com.br/transcitose>> Acesso em março de 2016.

## 1.6 ABSORÇÃO DE VICILINAS E A RESISTÊNCIA A CARUNCHOS

A história da busca por alvos na fisiologia digestiva de larvas de bruquídeos que pudessem ser explorados para fins de controle começou ainda, no final da década de 70 quando Gatehouse et al. (1979) publicaram dados sugerindo que inibidores de tripsina conferiam resistência a sementes de *V. unguiculata* contra o *C. maculatus*. Embora

essa proposição tenha posteriormente se mostrado equivocada (Xavier-Filho et al., 1989 e Zhu et al., 1994), isso 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; 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  $\alpha$ -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, um grupo japonês (Huesing et al., 1991) continuava afirmando a eficácia de inibidores de  $\alpha$ -amilases em conferir resistência a espécies de bruquídeos que 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). Com relação à participação de proteínas de defesa na resistência de sementes de leguminosas a bruquídeos, novamente *C. maculatus* tem um papel importante do desenvolvimento desses estudos. Como *C. maculatus* não consegue se desenvolver nas sementes do feijão comum *Phaseolus vulgaris*, essa relação *C. maculatus* – *P. vulgaris* foi e ainda tem sido extensivamente estudada.

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 na superfície das membranas microvilares das células 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).

Sales e colaboradores em 2001 propuseram que o mecanismo de resistência associado à vicilina seria a presença de quitina nas células do intestino médio das larvas. Foi demonstrado, através de imunomarcção, que os anticorpos utilizados evidenciavam 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 (Uchôa et al., 2006). 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 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 prováveis receptores presentes nas membranas das microvilosidades como descrito por Uchôa e colaboradores em 2006 (Oliveira et al., 2014).

Em 2011 Shahidi-Noghabi e colaboradores, descreveram que lectinas quiméricas (RIPs) podem ser internalizados em cultura de células CF-203 de *Sambucus nigra* através de vias endocíticas semelhantes.

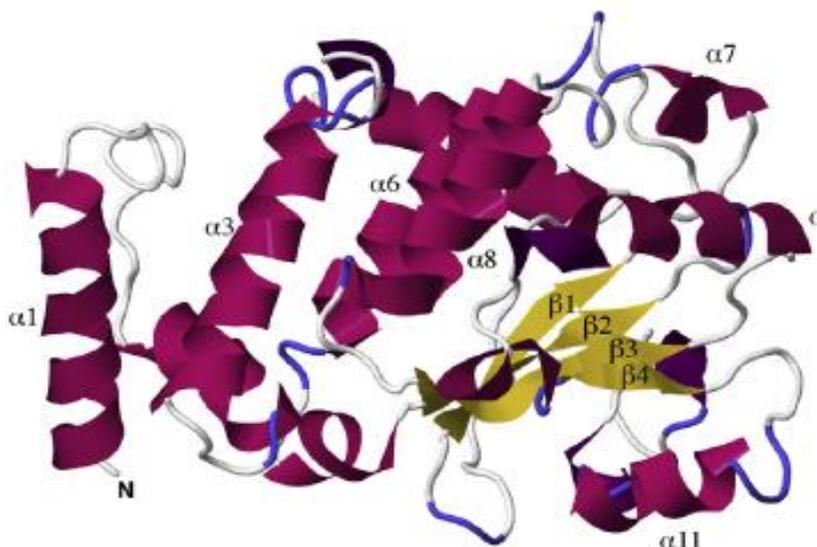
## 1.7 DOMÍNIO CRAL-TRIO

O domínio CRAL-TRIO é um domínio estrutural proteico que liga a moléculas lipofílicas pequenas. Este domínio tem o seu nome em função da proteína de ligação ao retinaldeído celular (CRALBP) e do fator de troca de guanina TRIO. Nas proteínas transportadoras de  $\alpha$ -tocoferol está presente o domínio CRAL-TRIO. A proteína CRALB transporta 11-cis-retinol ou 11-cis-retinaldeído. Modula a interação de retinóides com enzimas do ciclo visual. O TRIO está envolvido na coordenação da remodelação da actina, que é necessária para a migração e crescimento celular (Panagabko et al., 2003). É encontrado em proteínas de ativação como a GTPase (gaps), fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) e uma família de proteínas de ligação com ligante hidrofóbicos. O domínio pode constituir tanto toda a proteína ou apenas parte dela, tem uma região de ligação ao ligante N-terminal dentro de um domínio de uma família maior de proteínas

SEC14 – (elemento de sequência celular). A estrutura contém várias alfa hélices, bem como uma folha beta composto de 6 cadeias. (Figura 6) (Smith et al., 2015). Na estrutura presente o bolso hidrofóbico para a ligação de lipídios, que desempenham um importante papel no transporte dos  $\alpha$ -tocoferóis (Horiguchi et al., 2003).

Smith et. al, 2015, encontraram vários aminoácidos nos genes contendo o domínio CRAL-TRIO altamente conservados em insetos. Pesquisas no GenBank produziram 43 proteínas preditas na Família de domínios CRAL-TRIO de *B. mori*, 12 de *D. melanogaster*, 14 de *A. gambiae* e 18 de *T. castaneum*, 6 de *A. mellifera*.

Figura 6 - Modelo da estrutura tridimensional e conservação do domínio SEC14 em insetos. A estrutura tridimensional da proteína é composta por alternados de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , (Smith et. al, 2015).



Fonte: Elaborado pela autora.

O tráfego intracelular de ligantes hidrofóbicos é muitas vezes mediado por proteínas de ligação específicas. O domínio CRAL-TRIO é comum a várias proteínas de ligação de lipídeos, incluindo a CRALBP (Proteína celular ligadora de retinaldeído), e a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) (Panagabko et al., 2003). Katoh encontrou genes da família SEC14 em número considerável no tecido cerebral de mamífero, contendo vesículas revestidas por clatrina, sugerindo que estas tenham sua origem a partir do complexo de Golgi formando a principal proteína

de transporte pela via do sistema de secreção de endossomos/ lisossomos (Kato et al., 2009).

Sabe-se, que a importação de proteínas específicas para uma célula, pode ser efetuada através da ligação de proteínas a receptores presentes na membrana citoplasmática, posteriormente estas são incluídas em vesículas. Sendo, este processo denominado uma endocitose mediada por receptor, caso essa 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.

Endocitose é um processo celular básico que é utilizado pelas células para internalizar uma variedade de moléculas (Mayor; Pagano, 2007). Macromoléculas e grandes estruturas entram nas células por endocitose, a qual é definida como invaginação de uma porção da membrana plasmática contendo proteínas e lipídeos, e ligantes extracelulares e/ou moléculas solúveis. Já íons e pequenas moléculas, como aminoácidos e açúcares, podem atravessar a membrana através de canais. Diferentes tipos de endocitose foram descritos, diferindo no tamanho da vesícula endocítica, tamanho da “carga” e do mecanismo de formação da vesícula. Isto inclui fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (Cossart, 2006). A endocitose independente de clatrina e caveolina pode ocorrer através das CLICs (*Clathrin and dynamin independent carriers*), que é uma vesícula independente de clatrina e dinamina, derivada da membrana plasmática. Algumas vias podem apresentar rotas por compartimento intermediário, como os caveossomos ou endossomo precoce (Pagano, 2007), ou por proteína rica em glicosilfosfatidilinositol (GEEC – *glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments*).

As células sentem o ambiente e comunicam-se um com outro, através da ativação induzida pelo ligante de sinalização de receptores na superfície da célula. Receptores de sinalização, são semelhantes a outras proteínas da membrana plasmática de formas integrais, introduzem a via endocítica e são classificados em diversos compartimentos endossomais. A endocitose regula a sinalização celular mais simplesmente por controle do número de receptores disponíveis para ativação na membrana plasmática, e a ativação de receptores ou a jusante de efetores que frequentemente estimulam a endocitose mediada por receptor (Sorkin et al., 2009;). A endocitose mediada por receptores de sinalização é estimulada através da ativação induzida pelo ligante.

A via endocítica apresenta várias rotas entre a membrana plasmática, endossomo, lisossomo e complexo de Golgi. Assim, logo depois da internalização, as vesículas de transporte ligadas à membrana fundem-se com o endossomo precoce, enquanto que os ligantes internalizados, como proteínas e lipídeos de membrana retornam para a membrana, ou são transportados para o endossomo tardio e lisossomo para a degradação final (Alberts et al. 2010).



## 2. JUSTIFICATIVA

Compreender como proteínas ativas atravessam a barreira intestinal dos insetos, como é o caso das vicilinas, visto que constituem uma importante estratégia para atingir o meio interno dos insetos. As leguminosas são a principal fonte de proteínas, fibras e sais minerais (especialmente ferro), para a população mundial. A sua produção ocorre em praticamente todos os continentes do globo, com especial importância para indivíduos com menor poder aquisitivo e limitado acesso a fontes protéicas de origem animal. Por serem alimentos completos, os grãos de leguminosas são atacados por diversas espécies de inseto-praga, dentre eles os carunchos *Callosobruchus maculatus*.

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, estima que a população mundial deverá dobrar até 2040. Com isso, a produção de alimentos deve acompanhar o consumo. Desta forma, a melhor maneira de garantir a ascensão na agricultura é buscar alternativas através de meios tecnológicos e biotecnológicos, como o melhoramento genético das espécies. Garantindo assim, a preservação de solos e gerando um menor custo ao agricultor com a aplicação de insumos como adubos, inseticidas e fertilizantes que prejudicam o meio ambiente.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o mecanismo de internalização e antibiose de proteínas de reserva dos feijões *Vigna unguiculata* (vicilina) e *Phaseolus vulgaris* (faseolina) através do epitélio intestinal das larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a rota de internalização das vicilinas, com ênfase na transcitose no epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus*.
- Avaliação de inibidores sobre a rota de endocitose das vicilinas mediada por clatrina e/ou caveolina.
- Elucidar a localização intracelular e os mecanismos envolvidos na internalização da faseolina.
- Purificação dos receptores de membrana de vicilina.
- Identificação do receptor para vicilina.
- Estabelecimento de uma abordagem *ex vivo* para o estudo da endocitose de vicilinas no epitélio intestinal de larvas de *C. maculatus*.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 COLÔNIA DE INSETOS

Neste estudo foram utilizadas larvas obtidas da colônia de insetos do laboratório de Bioquímica de Insetos da UFSC. As colônias de *Callosobruchus maculatus* são mantidas em sementes de *V. unguiculata*, previamente desinfestadas por congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  de qualquer infestação anterior de campo. Estas são preservadas numa câmara incubadora a uma temperatura de  $29 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 70%.

### 4.2 PREPARAÇÕES DE MICROVILOSIDADES

Para o preparo de frações enriquecidas em membranas de microvilosidades do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus*, mil (1000) intestinos foram homogeneizados com auxílio de Potter-Helvehjem em tampão Tris-HCl 2 mM, manitol 50 mM, pH7.1, e dobrado seu volume com  $\text{CaCl}_2$  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 min a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante desse homogeneizado foi centrifugado novamente a 15.500 g durante 15 min. à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e o sedimento final obtido nesta centrifugação está enriquecido em microvilosidades.

### 4.3 PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR

Após preparação das microvilosidades estas foram extraídas por incubação da fração de membrana com Triton X-100 (10 mg de Triton X-100/mg proteína) durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 5 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . 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 50mM Tris-HCl, pH 8.0 com 0,1% de Triton X-100. 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 250mM NaCl com 0,1% de Triton X-100 e o segundo passo usando 0,1 M de ácido acético pH 8.0 com 0,1% de Triton X-100. Frações de 1,2 mL foram recolhidas e utilizadas para as determinações de proteínas e eletroforese.

#### 4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS (Läemli, 1970). Foram utilizadas placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm. O gel de separação de acrilamida de 12 % foi preparado misturando-se: 4,0 mL de solução de acrilamida-bis(acrilamida) (30:0,8), 3,3 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 mL de SDS 10 %, 0,1 mL de persulfato de amônio 10 % (APS), 0,004 mL de TEMED, obtendo-se um volume final de 10 mL. O gel de aplicação ("stacking") foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada, 0,5 mL de acrilamida-bis(acrilamida) 30 %, 0,38 mL de tampão 1,0 M Tris-HCl pH 6,8, 0,03 mL de SDS 10 %, 0,03 mL de persulfato de amônio 10 % (APS), e 0,003 mL de TEMED, obtendo-se um volume final de 3 mL. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão 25 mM Tris, glicina 192 mM e SDS 0,1 %, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (0,5M Tris-HCl pH 6,8 contendo água destilada, glicerol 10%, SDS 10 %, 2-β-mercapto-etanol e 1 % de azul de bromofenol). A eletroforese foi processada a uma voltagem constante de 50 V até a linha de frente do corante atingir o gel de separação, então elevada até 150 V constantes durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue R e, para melhor visualização das bandas, com nitrato de prata. 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).

#### 4.5 ESPECTOMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF)

O gel SDS-PAGE 12% com as amostras eluídas na coluna de cromatografia de afinidade vicilina-Sepharose, foi corado com Coomassie blue e as bandas recortadas com auxílio de uma ponteira colocados em tubos tipo Eppendorf. Para descoloração das bandas foi preparada uma solução contendo 50% de acetonitrila em 25 mM de bicarbonato de amônio, as bandas foram deixadas nessa solução até ficarem totalmente descoradas. Posteriormente, foi feita a desidratação usando acetonitrila pura colocado as amostras no vácuo até que ficassem secas. Seguindo, pela digestão com tripsina onde a concentração final da enzima 10 µg/mL em 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, incubou-se no escuro a 37<sup>o</sup> C durante 12 horas. Após para a extração dos polipeptídeos, foi utilizado uma solução contendo 50% de acetonitrila e 5% TFA (ácido

trifluoroacético) mantidos sobre 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  $\mu\text{L}$ , sendo estes novamente colocados no vácuo para secar. Para a aplicação das amostras na placa de MALDI foi recolhido 1  $\mu\text{L}$  de amostra mais 1  $\mu\text{L}$  da matriz, sendo então misturados os 2  $\mu\text{L}$  e, após secagem a temperatura ambiente, a placa foi encaminhada ao espectrômetro de massa.

#### 4.6 WESTERN BLOTTING

As proteínas foram eletro 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 em tampão PBS (136 mM NaCl, 30 mM KCl, 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,1M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8mM  $7\text{H}_2\text{O}$ ), contendo 2 % de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti proteína transportadora de alfa tocoferol (SIGMA) (1:2000) em tampão bloqueador por 10 horas à temperatura de 4°C. As membranas foram lavadas com PBS por 6 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As membranas foram deixadas em contato com a solução reveladora por um período de 10 minutos ou até que as bordas das membranas ficassem escurecidas. Para parar a reação as membranas foram lavadas com água destilada.

#### 4.7 MARCAÇÃO DE VICILINA COM FITC (ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA)

FITC foi covalentemente incorporado a vicilinas de *V. unguiculata*. FITC (50 mg em 1 mL de dimetil sulfoxido anidro) sendo imediatamente diluído em tampão bicarbonato 0,75 M, pH 9.5 antes do uso. Após a adição de FITC com uma razão de 1 mg por mg de vicilina, o frasco usado foi revestido por papel alumínio, incubado constantemente sob movimento rotacional à temperatura ambiente por

uma hora. O FITC não incorporado em vicilina foi removido por diálise contra água destilada. A solução resultante foi liofilizada para posterior utilização.

#### 4.8 ALIMENTAÇÃO DE LARVAS COM VICILINAS

Para acompanhar o destino da vicilina da semente de *V. unguiculata* marcada com FITC, as larvas do inseto *C. maculatus* foram alimentadas por um período de 24h. A proteína vicilina foi inserida e compactada no interior de cápsulas de gelatina com o auxílio de espátulas e bastões de vidro. As larvas retiradas de sementes de *V. unguiculata* foram transferidas no início do segundo e 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. Em seguida, as duas metades foram cuidadosamente encaixadas de forma a permitir os movimentos necessários para a alimentação das larvas. Controles foram utilizados para avaliar o padrão normal de absorção de vicilinas por órgãos internos, onde amido foi misturado com a farinha de sementes de *V. unguiculata* na concentração de 5% (m/m). Após o período de alimentação (24h), as larvas foram dissecadas e usadas para os experimentos de “Western blotting” e microscopia confocal.

#### 4.9 MICROTOMIA (CRIOSTATO)

Após alimentação das larvas, estas foram transferidas para soluções de sacarose em 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(-20°C), na proporção de 2 larvas por bloco. Os cortes foram obtidos em lâminas para visualização em microscopia de fluorescência.

## 5. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As amostras obtidas através da montagem de lâminas com cortes realizados no criostato e outras lâminas contendo os epitélios imersos na solução com os inibidores e as vicilinas marcadas foram encaminhadas para microscopia de fluorescência. Foi utilizado o microscópio Olympus (modelo BX-61) e microscopia de confocal. 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 das larvas inteiras, epitélio e corpo gorduroso.

### 5.1 IMUNOMARCAÇÃO (IMUNOGOLD)

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

### 5.2 ESTUDO DA ROTA ENDOCÍTICA

Foram dissecados 72 intestinos de larvas de *C. maculatus* no 3<sup>o</sup> instar, na presença de solução salina 250mM, sendo preservados os epitélios livres de conteúdo luminal. Estes epitélios (5 epitélios para cada um dos inibidores) foram incubados em presença ou ausência de inibidores individuais por 30 minutos, logo após foi adicionada vicilina purificada da semente de *V. unguiculata* marcada com FITC na concentração de 120nM e incubado por 3 horas. Os inibidores foram preparados em solução salina tamponada com fosfato, e utilizados nas concentrações mais altas possíveis sem causar prejuízos às células do epitélio intestinal (Shahnaz et al., 2011). Para avaliar a rota de endocitose mediada por clatrina utilizou-se clorpromazina na concentração 10µM e óxido de fenilarsina 6µM. Já para avaliação da rota de endocitose mediada por caveolina foi utilizado inibidores

nistatina na concentração 15  $\mu\text{M}$ , filipina 4 $\mu\text{M}$  e wortmanina 0,1  $\mu\text{M}$ . Foram realizados marcações com DAPI (4',6-diamidino - 2 - fenilindole dicloridrato) na proporção 1:10.000.

### 5.3 QUANTIFICAÇÕES DE VICILINA FLUORESCENTE NAS VESÍCULAS ENDOCÍTICAS

Neste experimento, buscou-se mensurar a quantidade de vicilina (marcada com FITC) dentro das vesículas endocíticas. Dissecou-se 72 epitélios das larvas de *C. maculatus*, sendo 12 para cada um dos inibidores e 12 para o controle, estes epitélios ficaram durante 30 minutos em contato com os inibidores e após acrescentou-se vicilina na concentração 120nM incubando-se durante 3h. Estes foram homogeneizados e centrifugados por 30 minutos a 4°C, coletado-se o sobrenadante. Ao sedimento foi acrescentado Triton X-100 e incubado por 8h na temperatura de 4°C, após esse período as amostras foram congeladas e descongeladas por um período overnight, sendo este último passo repetido por duas vezes. Após foi coletado o sobrenadante e acrescentado com a primeira centrifugação, as leituras mensuradas no scanner a laser FLA -3000.

### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE FITC

A intensidade dos pixels foi realizada através do software ImageJ (release1.43) com as imagens obtidas por microscopia confocal (Leica DMI 6000B). Sendo utilizadas as configurações de energia do laser e aquisição idêntica para facilitar a mensuração de fluorescência. A densidade de pixel médio de imagens foi medida por Leica Application Suite (LAS AF LITE) software a uma profundidade de 8 bits. A área delimita em cada célula foi de 418,657  $\mu\text{m}^2$  um total de 50 células independentes foram mensuradas. DAPI, núcleos foram observados com laser 405nm (azul) o comprimento de onda com excitação e emissão de 510 a 566nm. A fluorescência das vicilinas marcadas com FITC foi observada a um comprimento de onda de excitação 492 nm (ultravioleta) e emissão de 521 nm.

### 5.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Depois de realizados os cortes em criostato das larvas alimentadas com vicilina purificada e marcada com FITC, as lâminas contendo os cortes foram bloqueadas por 30 minutos à temperatura ambiente no

tampão PBS (136 mM NaCl, 30 mM KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM 7H<sub>2</sub>O), contendo 5 % de leite em pó desnatado. Após o bloqueio os cortes foram marcados com caneta hidrofóbica, incubados com anticorpo primário anti a proteína transportadora de alfa tocoferol produzido em coelho (1:2000) em câmara úmida por 12 horas à temperatura de 4°C. Após foram lavados com PBS 3 X (5 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cabra marcado com rodamina conjugado peroxidase (HRP) (1:5000), em tampão bloqueador, por 1 hora e 30 minutos. Passado o período de incubação, as lâminas foram coradas com DAPI (4', 6 - diamidino - 2 - fenilindole dicloridrato) de 1 a 3 minutos na proporção 1:10.000, lavadas com tampão PBS por 3 vezes. Em seguida a montagem das lâminas com glicerina tamponada e observadas em microscopia confocal.

## 5.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PERÓXIDOS TOTAIS E DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os produtos finais da peroxidação lipídica foram estimados pelo método de TBARS, como um índice de peroxidação lipídica, com algumas modificações. Larvas do inseto *C. maculatus* foram pré-tratados com faseolina e vicilina purificadas durante 24 horas (12 larvas para cada alimentação). Após esse período foram removidos os intestinos. Utilizou-se também epitélios das larvas de *C. maculatus* removidos inteiros e expostos a sulfato ferroso de amônio na concentração de 30µm durante 30 minutos (controle positivo). As concentrações de proteínas foram normalizadas para 3µg/ml. Os epitélios foram homogeneizados em tampão Tris/HCl 100mM pH 7.4(proporção 1:10), centrifugados durante 10 minutos a 2500 r. p .m. a 4 °C, o sobrenadante foi utilizado para fazer o método. Uma alíquota (100 µl) da amostra foi adicionada a 1 ml de solução contendo 400 µl de tampão ácido acético 1,3 M/HCl, 0,27 M, pH 3.4, 400 µl TBA 0,8% e 200 µl de SDS 8,1%. A mistura foi incubada a 95 °C por 60 minutos. A reação de malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532nm. Para o trabalho, foi utilizada a análise de variância de 2 vias com interação, seguido do teste *post hoc de Duncan*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os testes foram realizados em triplicatas.

## 5.7 DOT BLOT

Após alimentação das larvas do inseto *C. maculatus* com as proteínas purificadas faseolina e vicilina, uma concentração de 3 µg/mL de proteína foi aplicada em membrana de nitrocelulose e deixado secar em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi ativada com metanol durante dois minutos, lavada com TBS-T (2 min.); Os locais não específicos foram bloqueados por imersão em BSA 5% (m/v) em TBS-T durante 1 hora; lavada com TBS-T (3x 2min); Incubada com anticorpo primário HNE (4-hydroxy-2-nonenal 1:3000 dissolvido em BSA / TBS-T) e MDA (malondialdeído 1:4000 dissolvido em BSA / TBS-T) por 12 horas; lavada com TBS-T (3x 5min); Incubada com anticorpo secundário conjugado (1:1000) durante 1 hora; lavada com TBS-T (3x 5min). As membranas foram então incubadas com reagente ECL por 1 min. e fotografadas no fotodocumentador CHEMIDOC MP.

## 5.8 ANÁLISE DA VIABILIDADE MITOCONDRIAL

A viabilidade mitocondrial foi medida através do método da redução do sal MTT (methylthiazolyldiphenil-tetrazolium) por mitocôndrias viáveis (Mosmann, 1983). Após o tratamento com faseolina e vicilina purificada e o sulfato ferroso, as células do epitélio intestinal foram incubadas com MTT 0,5 mg/ml em HEPES-SALINA por 30 min a 37°C. O formazan foi então solubilizado em 500 µL de DMSO e lido em 550 nm.

## 5.9 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As sequências de aminoácidos das proteínas obtidas a partir das microvilosidades intestinais de *C. maculatus* e isoladas através da cromatografia de afinidade em coluna de vicilina-Sepharose apresentaram 99% de similaridade com uma proteína de *Drosophila yakuba*, sendo está a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Então, buscou-se por sequências homólogas de proteínas e de nucleotídeos nas bases de dados do NCBI. Esta etapa do trabalho foi realizada com o auxílio do programa BLASTP. O programa MEGA3 foi utilizado para fazer o alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos. A edição manual deste alinhamento foi feita tendo como referências os alinhamentos múltiplos realizados nos programas ClustalW.

## 6. MODELAGEM POR HOMOLOGIA

Para este estudo foi utilizado Swiss-Model e SwissDock, servidores automatizados na Web, de modelagem por homologia, baseado no Instituto Suíço de Bioinformática. O qual foi submetido à sequência de aminoácidos e recebido outra de volta, automaticamente, sendo a estrutura com o ligante. Para validação do modelo gerado foi utilizada a plataforma online <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>, a qual foi encaminhado o arquivo PDB gerado através do Swiss-Model, obtendo assim um gráfico de Ramachandran.



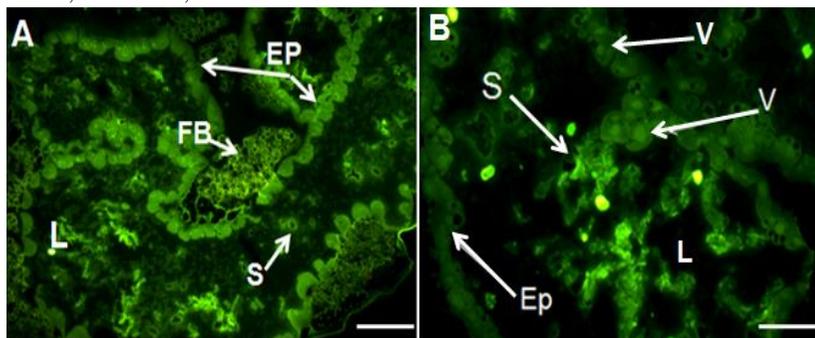
## 7. RESULTADOS

### 7.1 ESTUDO DA ENDOCITOSE DE VICILINAS NO CARUNCHO *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*

#### 7.1.1 Endocitose de vicilinas das sementes de *Vigna unguiculata* em larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus*.

Com o propósito de acompanhar a localização da proteína vicilina purificada e marcada com FITC ingerida pelas larvas de *C. maculatus*, as larvas foram transferidas diretamente das sementes de *V. unguiculata* para sementes artificiais contendo a proteína purificada (vicilina). Após o período de 24h de alimentação, as larvas foram preparadas e realizaram-se cortes em criostato para a observação em microscopia confocal. As observações realizadas em diversos cortes confirmaram que tanto as larvas de segundo instar (quando as larvas começam a ingerir o cotilédone) quanto as larvas de quarto instar (quando as larvas alcançam o máximo de ingestão do cotilédone) absorvem a proteína marcada, como revelado pela intensa fluorescência observada nas células tanto do epitélio intestinal quanto nas células do corpo gorduroso. Também pode ser observada a ocorrência de vesículas no interior dessas células epiteliais (Figura 7).

Figura 7 - Corte em criostato das larvas de *C. maculatus* alimentadas com a vicilina purificada marcada com FITC, demonstração do epitélio intestinal. A) Larva de 2<sup>o</sup> instar; B) Larva do 4<sup>o</sup> instar. A internalização da vicilina é observada através da fluorescência em verde tanto no epitélio intestinal como no corpo gorduroso; EP- Epitélio intestinal; FB- Corpo gorduroso; S- Grânulo de amido; L- Lúmen; V- vesículas.

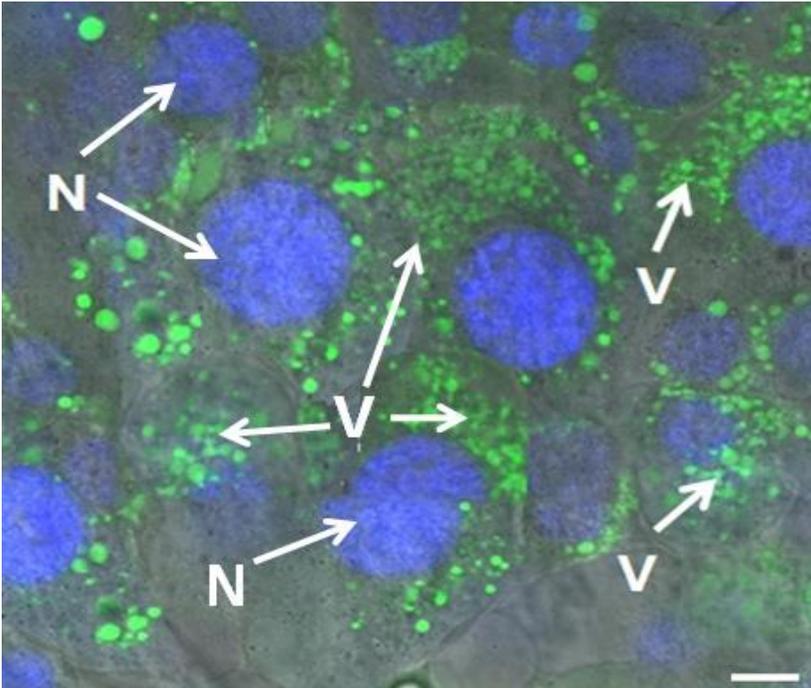


Fonte: Elaborado pela autora.

### 7.1.2 Endocitose em isolados intestinais *ex vivo* do inseto *Callosobruchus maculatus*.

Na Figura 8 pode-se observar a ocorrência de estruturas vesiculares verdes sugerindo a internalização da proteína vicilina (marcada com FITC) em células do epitélio intestinal do caruncho *C. maculatus*, quando o tecido foi incubado *ex vivo* com a proteína marcada. A formação de vesículas contendo esta proteína marcada no interior das células sugere que a mesma está sendo internalizada por meio de endocitose.

Figura 8 – Microscopia confocal demonstrado a internalização do complexo vicilina-FITC na forma de vesículas endocíticas no citoplasma das células o epitélio intestinal das larvas de *Callosobruchus maculatus*. Preparações a fresco de epitélios intestinais foram incubadas com vicilina marcada com FITC na concentração de 120 nM em tampão PBS pH 7.2 por 3 horas antes da observação e documentação em microscópio confocal. Núcleos corados com DAPI. N= núcleo; V= vesículas endocíticas.

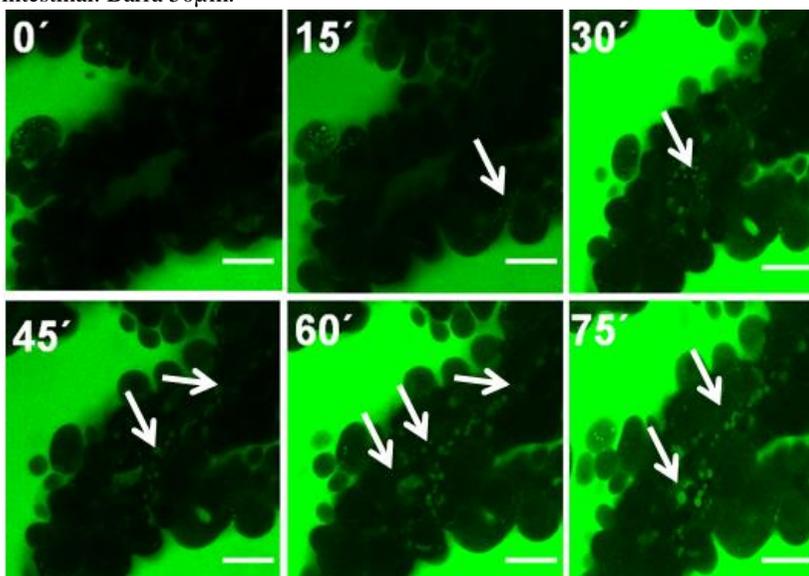


Fonte: Elaborado pela autora.

Usando microscopia confocal foi demonstrada a influência do

tempo de incubação na endocitose de vicilinas. Um mesmo campo de observação foi escolhido e observado, sendo a fluorescência internalizada registrada. O aparecimento de vesículas ocorreu entre os primeiros 15 e 30 minutos, aumentando consideravelmente com o passar do tempo, sugerindo que ocorre uma passagem das proteínas (vicilinas) que estão em solução para o interior das células epiteliais, resultando na formação dessas vesículas (Figura 9).

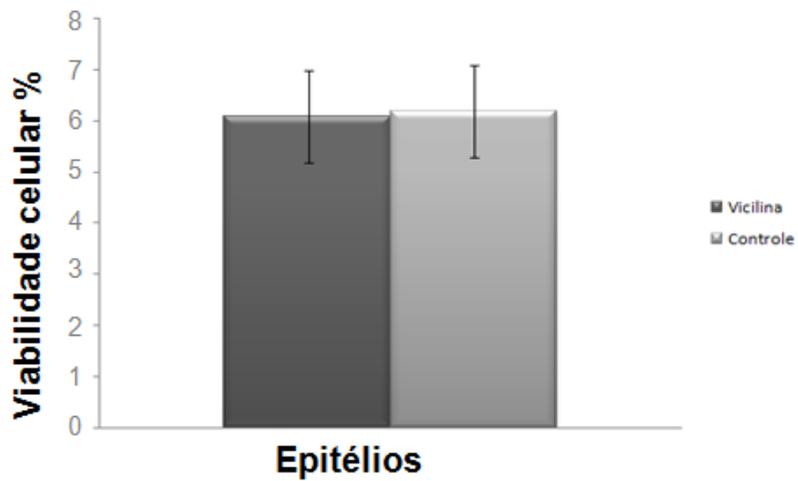
Figura 9 – Curso temporal das vicilinas endocitadas. A internalização das proteínas marcadas com FITC foi registrado no tempo zero min até 75 min por microscopia confocal. As setas indicam o surgimento das vesículas no epitélio intestinal. Barra 50µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como forma de estabelecer a viabilidade celular nos experimentos onde os epitélios intestinais foram mantidos *ex vivo*, quantificou-se através da redução do sal coloração amarela e hidrossolúvel a formazan, um sal de coloração arroxeada e insolúvel em água através da atividade enzimática encontrada em mitocôndrias viáveis. Dessa forma, a redução do sal amarelo a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. Confirmou-se assim, que os isolados intestinais das larvas de *C. maculatus* estavam viáveis no período de tempo dos ensaios realizados nesta Tese.

Figura 10 - Viabilidade celular dos isolados intestinais da larva de *C.maculatus*. (Método MTT).



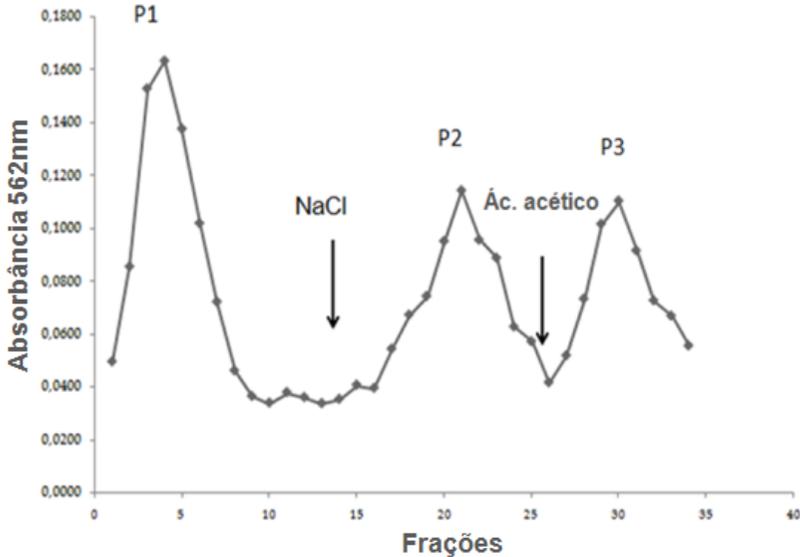
Fonte: Elaborado pela autora.

## **8. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE VICILINA, OBTIDO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE VICILINA-SEPHAROSE.**

### **8.1 PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.**

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores reforçaram a hipótese da presença de um receptor que estaria presente nas membranas intestinais das larvas do inseto *C. maculatus*. Para confirmar esta hipótese, utilizou-se uma coluna de afinidade onde vicilina foi imobilizada em resina Sepharose. Proteínas de microvilosidades de membrana que foram extraídas com o uso do detergente Triton X-100 foram aplicadas à coluna de afinidade vicilina-Sepharose. As proteínas das microvilosidades de membrana que apresentaram afinidade pela vicilina foram eluídas sequencialmente pelo aumento da força iônica com o aumento na concentração de NaCl e pelo abaixamento do pH com a adição de ácido acético na fase móvel (Figura 11). As frações coletadas foram utilizadas para a análise de eletroforese, determinações de proteínas e identificação das bandas de interesse por espectrometria de massas (Figura 12).

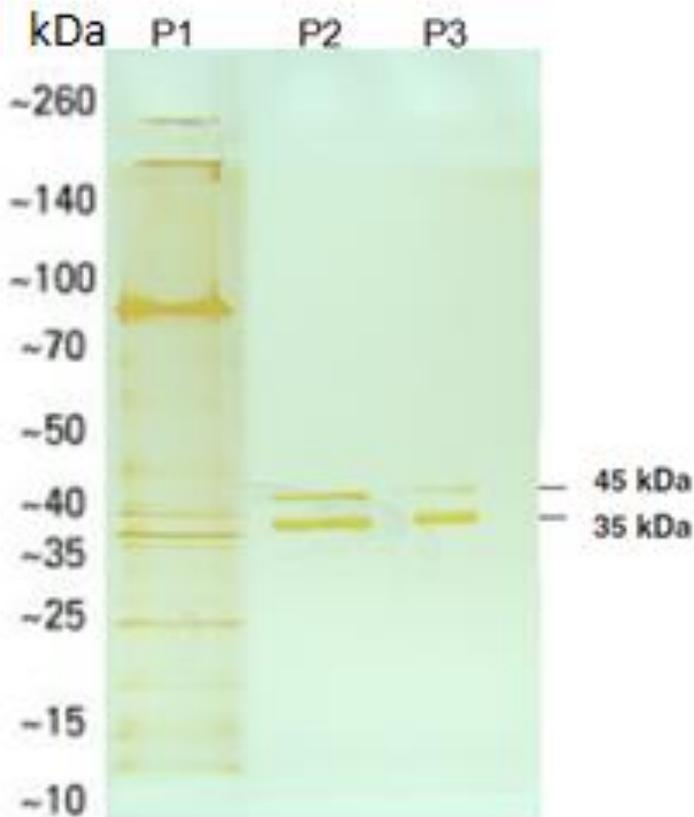
Figura 11 - Perfil de eluição das proteínas de microvilosidades intestinais das larvas de *Callosobruchus maculatus* em coluna de vicilina-Sepharose. As proteínas foram obtidas a partir da extração das proteínas microvilares com o detergente Triton X-100 e posteriormente submetidas ao fracionamento por cromatografia de afinidade em coluna vicilina-Sepharose. P1= Eluição com 50mM Tris-HCl, pH 8.0 com 0,1% Triton X-100; P2= Eluição com 250mM NaCl, pH 8.0 com 0,1% Triton X-100; P3= fração eluída com solução de ácido acético 0,1M contendo Triton X-100 0,1%, pH 8.0.



Fonte: Elaborado pela autora.

As proteínas isoladas na cromatografia foram avaliadas através do perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% revelado por colaração com nitrato de prata (Figura 12). Observaram-se proteínas de tamanhos entre 35 KDa e 45 KDa. Na Figura 12, em P1, observam-se as proteínas que não ficaram retidas na coluna, demonstrando não ter afinidade pela vicilina. Nas raias P2 e P3 temos os perfis proteicos das frações que apresentaram afinidade com a vicilina imobilizada e que foram respectivamente eluídas com NaCl (fração P2) e ácido acético (fração P3).

Figura 12 - Análise de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE 12%) corado com nitrato de prata das frações eluídas da cromatografia de afinidade em coluna de vicilina-Sepharose. P1, Primeira fração eluída com o tampão de equilíbrio; P2, fração eluída com a adição de NaCl; P3, Fração eluída com ácido acético.



Fonte:

## 8.2 ANÁLISE DA ESPECTOMETRIA DE MASSAS DA PROTÉINA PRESENTE NAS MICROVILOSIDADES INTESTINAIS DO CARUNCHO *CALLOSBRUCHUS MACULATUS*.

Para identificar as proteínas que foram retidas na cromatografia de afinidade, foram recortadas as duas bandas de 35 kD e 45 kDa presentes nas frações P2 e P3 das raias dos géis de SDS-PAGE representadas na Figura 12 e analisadas através da identificação das

massas geradas para os peptídeos trípticos (espectrometria de massas). O resultado foi analisado no banco de dados da plataforma Mascot através do recurso “Peptide Mass Fingerprint”, o qual forneceu escores comparando o espectro gerado com os espectros teóricos de sequências de proteínas depositadas em bancos de dados como o GenBank do NCBI e o Uniprot.

As sequências de aminoácidos obtidos a partir das microvilosidades intestinais de *C. maculatus* apresentou 99% de similaridade com a proteína de *Drosophila yakuba*. Então, fez-se um alinhamento da sequência de aminoácidos inferida da proteína isolada do inseto *C. maculatus* com outras 7 sequências já existentes no banco de dados do NCBI (Figura 13), pelos seguintes acessos: XP\_002098463.1; XP\_002104589.1; XP\_001982108.1; NP\_651174. 2; XP\_004517789.1; XP\_001999976.1; XP\_001851205.1. O programa utilizado foi CLUSTAL W. O alinhamento estrutural indica que a proteína isolada de *C. maculatus* compartilha aminoácidos conservados pertencente à família SEC14, tendo como assinatura o domínio CRAL-TRIO. Este resultado, sugere que essa proteína isolada do *C. maculatus* é comum dentro do grupo de dípteros e coleópteros

Figura 13 - Alinhamento das seqüências de proteínas da superfamília SEC14. *Drosophila yakuba*, *Callosobruchus maculatus*, *Drosophila simulans*, *Drosophila erecta*, *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila mojavensis*, *Oryctes borbonicus*. Os aminoácidos estão coloridos seguindo quatro tipos: ácido, azul; básico, cor de rosa; hidrofóbico, vermelho; hidrofílico, verde. \* significa que as seqüências são idênticas naquela posição; = indicam substituições conservativas; . substituições semi- conservativas. Destaque para seqüência de aminoácidos idênticos.

```

Drosophila yakuba YDPFLLKKAFALVQQCIPLRFVEIHHINMRKEGQTIFFNFVTKFLPSKLPFKFVVK--KS
Callosobruchus maculatus YDPFLLKKAFALVQQCIPLRFVEIHHINMRKEGQTIFFNFVTKFLPSKLPFKFVVK--KS
Drosophila simulans YDPFLLKKAFALVQQCIPLRFVEIHHINMRKEGQTIFFNFVTKFLPSKLPFKFVVK--KS
Drosophila erecta YDPFLLKKAFALVQQCIPLRFVEIHHINMRKEGQTIFFNFVTKFLPSKLPFKFVVK--KS
Drosophila melanogaster FDAVLVKKLAVLGGKAYPYRPGGFHFVNAPSSAEKFMSTAKSLMSEKIRKRFHHS--KL
Oryctes borbonicus VSPSLAKKFLVCVQEAYPVKLKEVHWVNSPLVDIVQFVKPFLKEKIRNRIYLHS--SF
Drosophila mojavensis HTPSLAKKATMIFQEAIPVRPKRMHYLNPSPFFDSLQLVKSFLEKIKRIVFHTSDDM
Tribolium castaneum VSPALVKKIMTVCVQYGYPNRIKSAVFFNVTPVFDVAVHKIFKPFLLTKVDRIRI--CKNI
      * * * : * : * * : : . : . : : * : : .

```

```

Drosophila yakuba EDLYQHLPDAMTI EYGGTNGYHAEAVDHNQRKLLDSDYLARDAQYGTNEKLRVGLASA
Callosobruchus maculatus EDLYQHLPDAMTI EYGGTNGYHAEAVDHNQRKLLDSDYLARDAQYGTNEKLRVGLASA
Drosophila simulans EDLYQHLPDAMTI EYGGTNGYHAEAVDHNQRKLLDSDYLAKDAQYGTNEKLRVGLASA
Drosophila erecta EDLYQHLPDAMTI EYGGTNGYHAEAVDHNQRKLLDSDYLAKDAQYGTNEKLRVGLANA
Drosophila melanogaster DSLYKYVPKCECLPAEYGGSGTIGQWSTWRTKLLAYKPFEEEEASYGTNEKLRGQPVVS
Oryctes borbonicus DTLHEKIPKDIILPEEYGGTAGKLQEFHEANPKKLEEYGPWFRAQEDLKADESKRFGKPTN
Drosophila mojavensis ES IYKYVPREILPKEYGGTDGTLQELTDYWKKKVEDYRDNFLEDKMKYSIESRRRPGKPKT
Tribolium castaneum DNLYEYVPEVLPEEFGDGGKMEIDVQHNKAKVESYRDNFLEDKAYGTNEKLRAGKPKT
      : : : : * : : * : * * : : . * * : : : : : * : * *

```

```

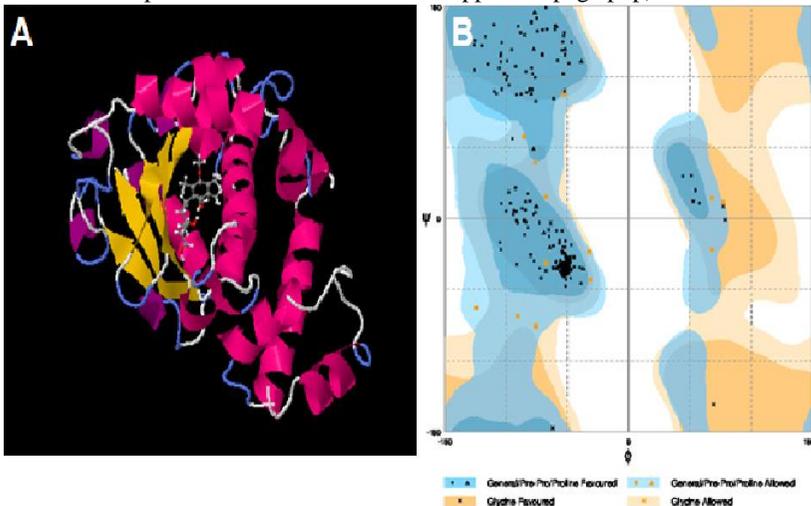
Drosophila yakuba WANGELDGMSSGSRFKLELD
Callosobruchus maculatus WANGELD-----
Drosophila simulans WANGELDGMSSGSRFKLELD
Drosophila erecta WANGELDVMSSGSRFKLEVD
Drosophila melanogaster --AESLFGIEGSRFKLDID
Oryctes borbonicus --YDOLFIDGSRFQLSID
Drosophila mojavensis --GDEIFGIEGSRFKLMVD
Tribolium castaneum --SESIYGLDGSFRQLSVD
      : :

```

Fonte: Elaborado pela autora.

Realizou-se a predição da estrutura terciária da proteína de interesse (Figura 15A) através das ferramentas computacionais: SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>), SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>) e Phyre2 (<http://www.rcsb.org/>). Tal aplicação foi capaz de modelar a proteína de interesse com base na estrutura cristalizada do transportador de  $\alpha$ -tocoferol humano (Meier et al., 2003). A fim de garantir a qualidade estereoquímica do modelo foi construído o gráfico de Ramachandran (Figura 15B), assim foram definidos os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, orientando a avaliação da qualidade do modelo teórico.

Figura 14 – Modelagem da estrutura da proteína presente nas microvilosidades intestinais de *Callosobruchus maculatus*. Painel A) O modelo foi baseado na estrutura do transportador de  $\alpha$ -tocoferol humano, o ligante é  $\alpha$ -tocoferol (ZIND ID 5921400). A imagem 3D foi criada utilizando-se o programa Phyre2. Painel B) Gráfico de Ramachandran, em azul forte (sinalizado por pontos pretos) representa a concentração de aminoácidos em regiões mais favoráveis (Gráfico criado em: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).



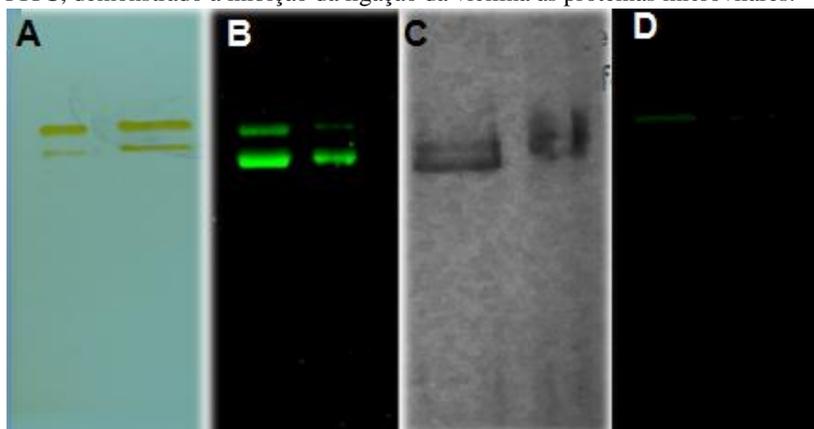
Fonte: Elaborado pela autora.

### 8.3 VALIDAÇÃO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE $\alpha$ -TOCOFEROL COMO O RECEPTOR DE VICILINA

Dado o alto grau de conservação da proteína identificada nas microvilosidades do inseto *C. maculatus*, adquiriu-se um anticorpo

comercial policlonal (Sigma). Este sendo contra a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol, produzido em coelhos para reconhecer a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol em humanos. Assim, realizou-se imunodeteção através da técnica “Western blotting”, mostrando que este anticorpo comercial foi capaz de reconhecer a proteína microvilar de *C. maculatus* capaz de se ligar à vicilina (Figura 16C).

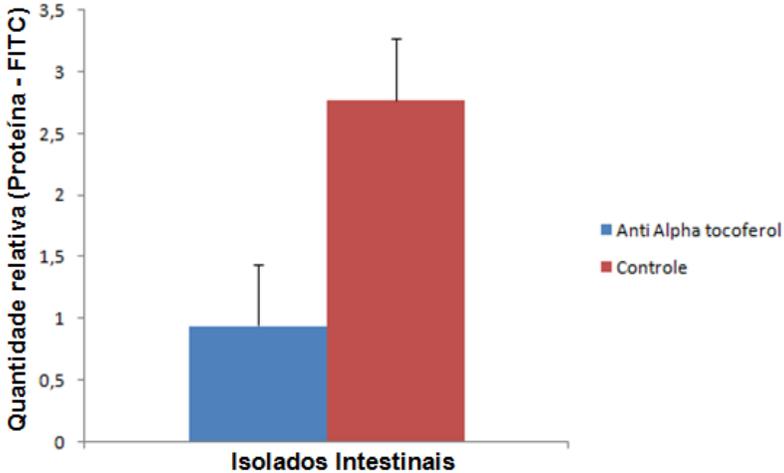
Figura 15 - Análise da interação das proteínas eluídas da coluna de afinidade vicilina-Sepharose com o complexo vicilina-FITC, com o anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol e com a mistura do complexo vicilina-FITC mais  $\alpha$ -tocoferol. A) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose em SDS – PAGE 12 % corados com nitrato prata; B) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose incubadas em tampão PBS com o complexo vicilina-FITC; C) Western blotting das frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose, utilizando anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol; D) Frações purificadas em cromatografia de afinidade vicilina-sepharose incubados por 1h em tampão PBS com  $\alpha$ -tocoferol seguido por incubação com vicilina purificada marcada com FITC, demonstrando a inibição da ligação da vicilina às proteínas microvillares.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com a finalidade de testar o comprometimento da ligação da vicilina a proteína isolada na cromatografia, reproduziu-se o experimento utilizando os isolados intestinais *ex-vivo*. Inicialmente os epitélios foram pré-incubados na presença do anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol por 30 minutos, seguido por incubação com vicilina-FITC durante 3 horas. Foi demonstrado através da fluorescência internalizada pelas células intestinais, o comprometimento na absorção da vicilina, quando estas foram pré-incubadas com o anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 17).

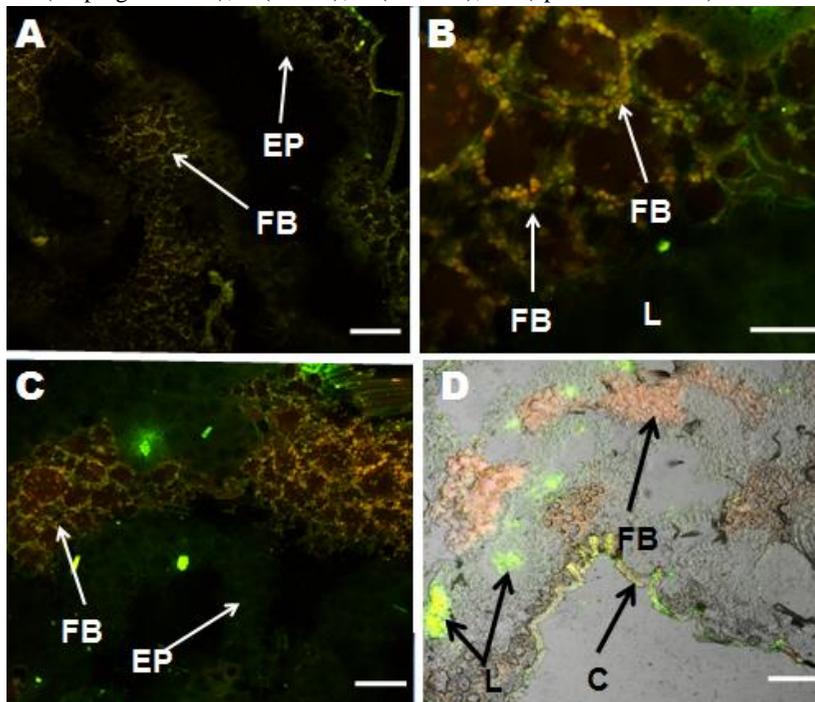
Figura 16 - Inibição da endocitose de vicilina na presença do anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Epitélio intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* pré-incubados com anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol durante 30 minutos. Após, incubados em presença de vicilina marcada com FITC na concentração de 120nM por 3h. Os dados foram analisados por análise de variância ( $P < 0,001$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

As larvas de *C. maculatus* foram alimentadas com a proteína purificada da semente de *V. unguiculata* (vicilina) marcada com FITC, depois de realizados os cortes em criostato estes foram preparados para imunohistoquímica. Primeiramente foram incubados os cortes com anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol e posteriormente com anticorpo secundário marcado com rodamina. Dessa forma, foi possível observar a co-localização da proteína transportadora de alfa tocoferol, já que a vicilina estava marcada com FITC. Essa co-localização é observada nas cores amarela e ou vermelha alaranjada, tanto nas células do epitélio intestinal como no corpo gorduroso.

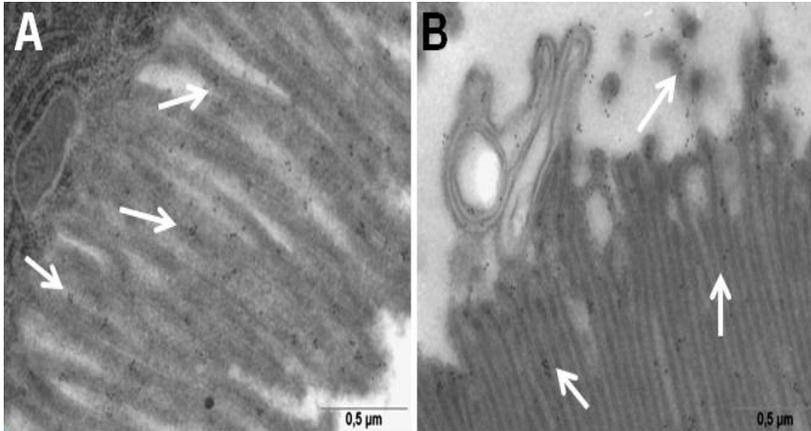
Figura 17- Co-localização de vicilina e a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol através de imunohistoquímica. Cortes em criostato da larva inteira de *Callosobruchus maculatus* alimentada com proteína purificada da semente de *Vigna unguiculata* marcada com FITC. A) Corpo gorduroso; B e C) Maior intensidade de fluorescência no corpo gorduroso, co-localização do anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol com a vicilina; D) Corte com campo claro, co-localização do anticorpo anti a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol; FB (corpo gorduroso); L (lúmen); C (cutícula); EP (epitélio intestinal).



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos com as observações dos cortes de larvas inteiras e não dissecadas com o emprego de criostato e microscopia confocal, foi possível observar a formação de vesículas no corpo gorduroso e no epitélio intestinal das larvas alimentadas com vicilina marcada com FITC. Com isso, foi realizado imunomarcção com anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol para obtenção de imagens em nível ultra-estrutural do epitélio intestinal das larvas. Os resultados mostram que há o reconhecimento pelo anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol da proteína presente nas microvilosidades dos enterócitos (Figura 19).

Figura 18 - Imunolocalização de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol. Nos painéis A e B encontram-se micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão em cortes do epitélio intestinal da larva de *Callosobruchus maculatus* alimentada com vicilina purificada. As setas indicam as marcações nas microvilosidades onde a proteína reconhecida pelo anticorpo anti proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol.

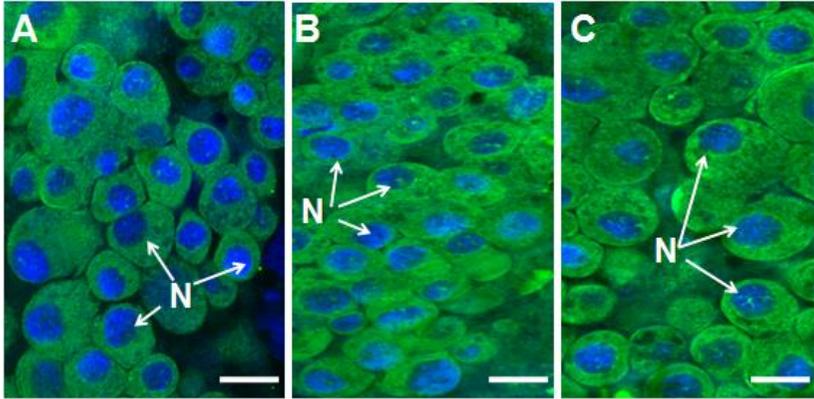


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 8.4 CARACTERIZAÇÃO DA ROTA ENDOCÍTICA DA VICILINA

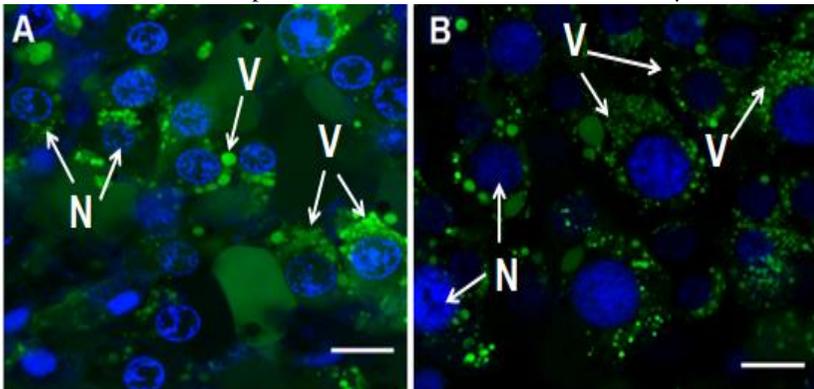
Sabe-se, que a maioria das vesículas que brotam da membrana tem uma capa de proteína, ou seja, essas vesículas são revestidas por uma proteína, observou-se nos experimentos realizados que as vesículas do epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus* são revestidas por caveolina. Quando as preparações desses epitélios foram incubadas com inibidores, estes responsáveis por inibir a rota endocítica mediada por clatrina e caveolina observaram-se inibições apenas nas drogas que medeiam a rota por caveolina (Figura 19). Quando comparados os efeitos dos inibidores duas principais rotas endocíticas, torna-se evidente a formação de vesículas nos epitélios incubados com os inibidores de endocitose mediada por clatrina, sugerindo que essa rota não é majoritária na internalização de vicilina (Figura 20).

Figura 19 - Inibição da endocitose de vicilinas em células do epitélio intestinal de das larvas do inseto *C. maculatus*. Microscopia confocal demonstrando fluorescência em verde ligada à superfície celular dos epitélios, pré-incubados durante 30 min. com inibidores da rota de endocitose mediada por caveolina e 3h com vicilina marcada com FITC. A) Nistatina 15 $\mu$ M ; B) Filipina III 4 $\mu$ M; D) Wortmanina 1 $\mu$ M. N= Núcleos corados com DAPI. Barras 50  $\mu$ m.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 20 - Endocitose de vicilinas em células do epitélio intestinal de *Callosobruchus maculatus* na presença de inibidores da rota mediada por clatrina. Microscopia confocal demonstrando fluorescência em verde no citoplasma celular do epitélio da larva do inseto *Callosobruchus maculatus*, pré-incubado durante 30 min com inibidores da rota de endocitose mediada por clatrina e 3h com a vicilina marcada com FITC. A) Clorpromazina 10  $\mu$ M; B) Óxido de phenylarsina 6  $\mu$ M. N= núcleos corados com DAPI; V= Vesículas endocíticas com vicilina purificada marcada com FITC. Barras 50  $\mu$ m.

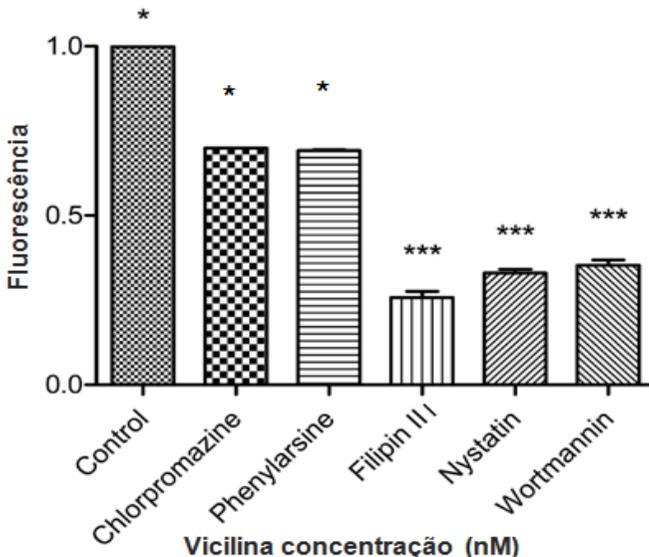


Fonte: Elaborado pela autora.

### 8.4.1 Efeito dos inibidores sobre a endocitose de vicilina em epitélios *ex-vivo* do caruncho *Callosobruchus maculatus*

As vicilinas endocitadas foram medidas através da quantidade de fluorescência internalizada (Figura 19 e 20). Os resultados de quantificação da intensidade de fluorescência confirmaram que as concentrações de vicilina esta mais enriquecida nas frações onde estão os inibidores da rota mediada por clatrina (Figura 21 sinalizados por \*\*), uma vez que a internalização da vicilina foi maior nesses epitélios. Entretanto, foi observada uma diminuição nos epitélios incubados com inibidores da rota mediada por caveolina (\*\*\*), evidenciado assim, a inibição na internalização das vicilinas quando esta tem bloqueada a atuação da proteína caveolina que a auxilia a formação das vesículas para serem endocitadas.

Figura 21 - Efeito de inibidores das rotas endocíticas na internalização de vicilina em epitélios intestinais incubados com o complexo vicilina-FITC. Epitélios intestinais das larvas de *Callosobruchus maculatus* foram pré-incubados com inibidores por 30 minutos e depois incubados em presença de vicilina marcada com FITC na concentração de 120nM por 3h. Cada tratamento foi realizado com três repetições independentes. Os dados foram analisados por análise de variância ANOVA (\* $p > 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), em seguida, analisados separadamente por um teste post hoc Tukey.  $P = 0,05$ . As leituras foram mensuradas no fluorímetro.



Fonte: Elaborado pela autora.

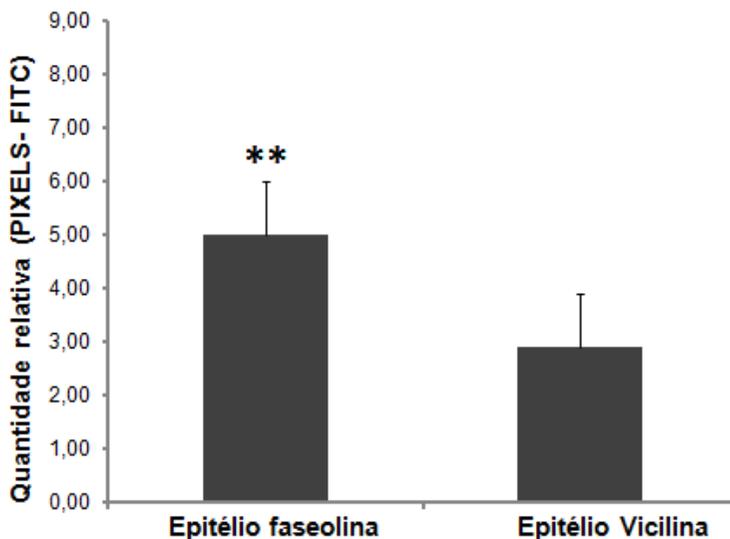
## 8.5 MECANISMOS DA FASEOLINA COMO AGENTE LIMITANTE NA CAPACIDADE DO INSETO *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS* EM ABSORVER ANTIOXIDANTES.

### 8.5.1 Microscopia de Fluorescência

### 8.5.2 Quantificação da intensidade de fluorescência nos epitélios intestinais incubados com o complexo vicilina-FITC

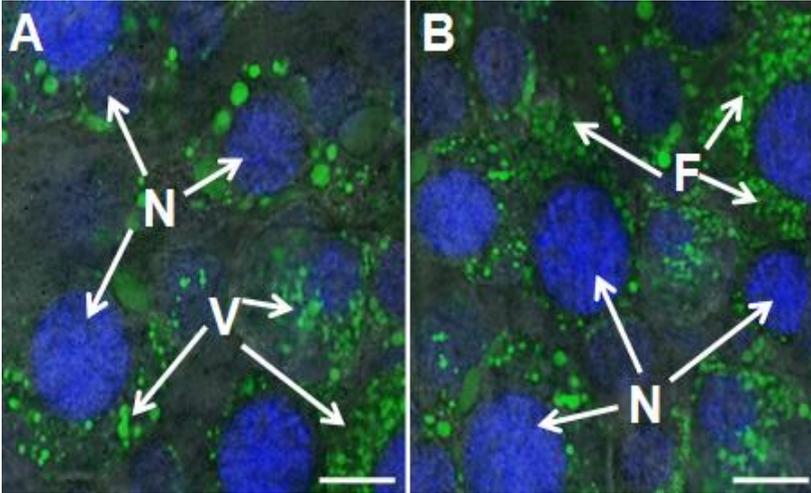
Analisando-se os dados da Figura 22, verifica-se diferença significativa nos valores de fluorescência presente no intestino das larvas alimentadas com faseolina e vicilina, onde se vê uma maior intensidade de fluorescência na presença de faseolina. Na Figura 23B é possível observar nas células intestinais uma maior quantidade de faseolina quando comparada a Figura 23A, que mostra o epitélio intestinal das larvas alimentadas com vicilina, corroborando com as quantificações em PIXELS.

Figura 22 - Quantificação da intensidade de pixels das imagens (FITC). Média da intensidade no total de 50 células independentes. Os valores da linha de células do epitélio intestinal (faseolina) a linha de vicilina (controle). \*\*,  $P < 0,001$ . Quantificações realizadas em epitélio intestinal das larvas de *C. maculatus* *ex-vivo*.



Fonte: Elaborado pela autora.

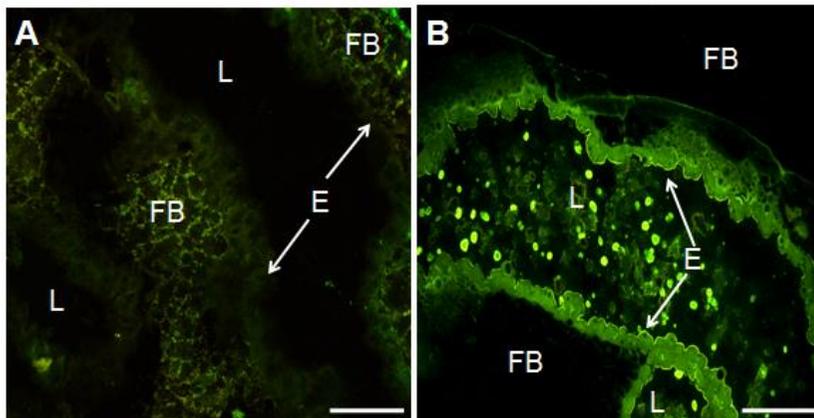
Figura 23 - Células do epitélio intestinal de larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus*. No painel A células após o tratamento com vicilina/FITC; Painel B células após tratamento com faseolina/FITC. N = Núcleo; V = Vicilina; F = Faseolina.



Fonte: Elaborado pela autora.

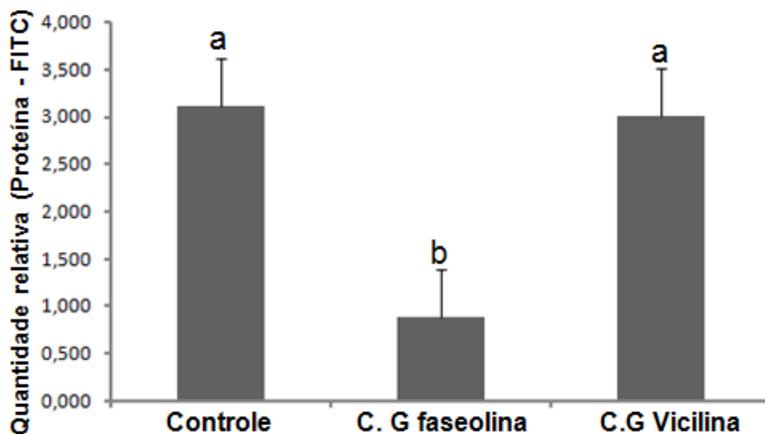
Animais expostos a um pulso de alimentação de 24 horas, contendo as proteínas purificadas faseolina e vicilina - FITC demonstraram alterações em relação à passagem destas proteínas pelo epitélio intestinal. Na Figura 25A observa-se o conteúdo luminal sem vestígios da proteína vicilina-FITC, nota-se uma concentração maior da proteína localizada no corpo gorduroso desses animais. Na Figura 25B onde as larvas foram alimentadas com faseolina-FITC, é observado uma concentração elevada no lúmen e nas células do epitélio intestinal, sendo quase imperceptível a presença de faseolina no corpo gorduroso das larvas de *C. maculatus* alimentadas com faseolina - FITC. Os dados estatísticos corroboram com as imagens obtidas em confocal, pois foi observado um aumento na concentração de vicilina nas células do corpo gorduroso dos animais alimentados por 24h com vicilina purificada - FITC (Figura 25), e uma diminuição daqueles que foram alimentados com faseolina - FITC.

Figura 24 - Corte em criostato da larva inteira do caruncho *Callosobruchus maculatus*. Na figura A larva alimentada com vicilina purificada marcada com FITC; B Larva alimentada com faseolina purificada marcada com FITC. FB = corpo gorduroso; L = lúmen; E = epitélio.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25 - Níveis dos complexos faseolina e vicilina - FITC em células do corpo gorduroso do caruncho *Callosobruchus maculatus*. Larvas do 3<sup>o</sup> instar alimentadas por 24h com as proteínas purificadas faseolina e vicilina - FITC. A média da intensidade no total de 30 animais independentes. Os valores da linha de células do corpo gorduroso são indicados em relação à linha de controle. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,005$ , ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan). Quantificações realizadas com valores obtidos pelo scanner a laser FLA3000. C.G = corpo gorduroso.

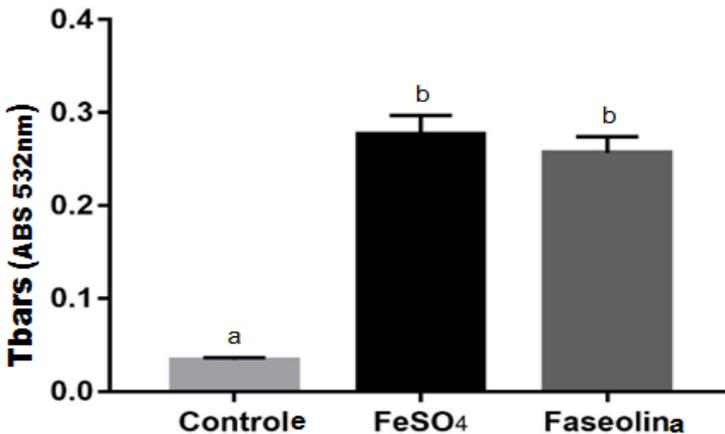


Fonte: Elaborado pela autora.

### 8.5.3 Efeitos da faseolina sobre marcadores de estresse oxidativo

Para medir possíveis efeitos das globulinas sobre a geração de um cenário pró-oxidativo, marcadores de dano oxidativo a lipídios foram medidos através do método de TBARS. Os níveis de peroxidação lipídica aumentaram após 24 horas de alimentação das larvas de *C. maculatus* com faseolina purificada, mas nenhuma alteração foi observada no grupo controle, onde as larvas foram alimentadas com vicilina (Figura 26). Os resultados demonstram que os níveis de peróxidos também aumentaram quando os epitélios intestinais foram expostos ao sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) por 30 min.

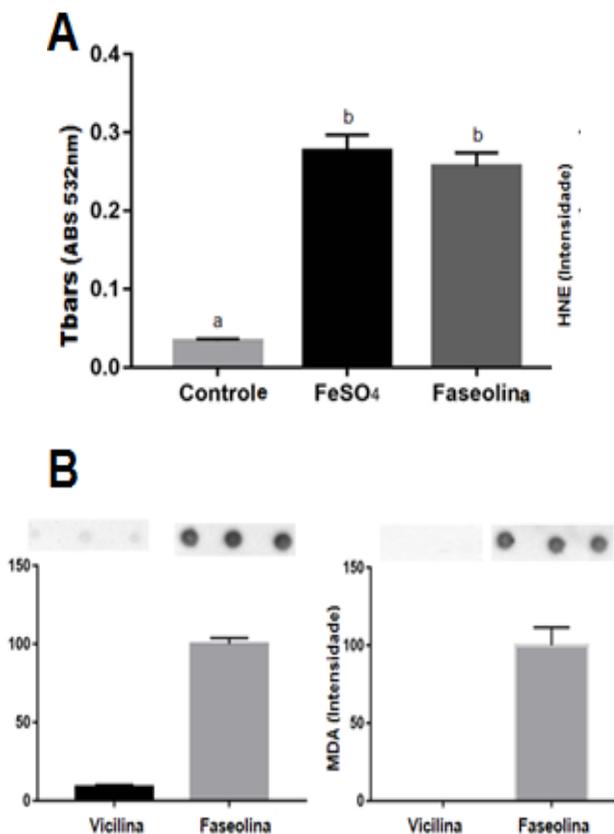
Figura 26 - Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em Larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*. Larvas expostas a faseolina por 24 horas e epitélios inteiros expostos a Sulfato Ferroso de Amônio 30 $\mu\text{m}$  durante 30 minutos. Peroxidação lipídica medida pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,005$ , ANOVA de uma via seguido por teste *post hoc de Tukey*).



Fonte: Elaborado pela autora.

Como meio de confirmar a presença de marcadores bioquímicos atuando sobre a peroxidação lipídica das larvas do caruncho *C. maculatus* alimentadas com faseolina e vicilina, foi utilizado o método qualitativo dot-blot (Figura 27). O mesmo padrão de estresse oxidativo foi observado nas larvas que foram alimentadas com faseolina. A oxidação lipídica se demonstrou elevada, tal qual a indução de estresse oxidativo induzida nas células do epitélio intestinal com sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) no gráfico acima.

Figura 27 - Reconhecimento pelos anticorpos de marcadores da peroxidação lipídica. A) Larvas do inseto *Callosobruchus maculatus* foram pré- tratadas com faseolina e vicilina purificadas durante 24 horas. Após esse período foram removidos os intestinos. As concentrações de proteínas foram normalizadas para 3µg/ml. A peroxidação lipídica foi medida pelo método Tbars. B) Reconhecimento de marcadores bioquímicos da peroxidação lipídica, anticorpos HNE (4- hidroxinonenal) e MDA (malondialdeído). Para o trabalho, foi utilizada Teste de *student*, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



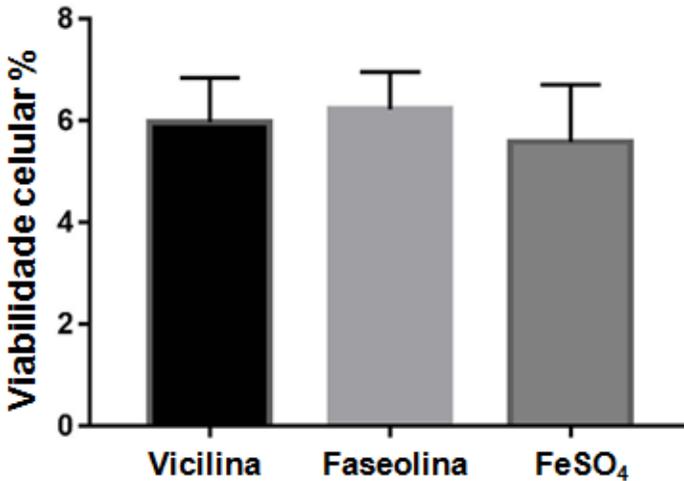
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 8.5.4 Viabilidade celular

Diversos trabalhos mostram que a atividade das enzimas antioxidantes se correlaciona com uma maior resistência ou

vulnerabilidade a oxidantes (Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005). Desta forma, avaliamos a viabilidade celular dos epitélios intestinais expostos a faseolina (Figura 29), vicilina e sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) utilizado como indutor de estresse oxidativo. Nenhum dos tratamentos demonstrou toxicidade às células do epitélio intestinal, apresentado cerca de 60% de viabilidade celular.

Figura 29 - Viabilidade celular de epitélios intestinais das larvas de *C. maculatus* expostos a vicilina (controle), faseolina e sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ). O tempo de incubação com os compostos por 30 min. Após esse tempo foi analisado a viabilidade celular através da redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Barras representam porcentagem em relação ao grupo controle. (Análise de variância de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).



Fonte: Elaborado pela autora.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 ENDOCITOSE DE PROTEÍNAS INTACTAS ATRAVÉS DO EPITÉLIO INTESTINAL DE INSETOS DA ESPÉCIE *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS*.

O mecanismo de proteínas que atravessam o epitélio intestinal em insetos, ainda tem sido pouco estudado, isso comparado a outros animais, como os mamíferos. Desde a década de 30, já está documentado a passagem de proteínas como anticorpos, através do colostro materno para a corrente sanguínea do recém nascido (Verzar; McDougall, 1936). Em insetos, a absorção de proteínas inteiras presentes na dieta ficou conhecida no início século passado, quando uma pequena parte da hemoglobina presente no sangue ingerido pelo barbeiro *R. prolixus* cruzou o epitélio intestinal e foi encontrado na hemolinfa do inseto (Wigglesworth, 1943). A absorção de proteínas através do epitélio intestinal de insetos, recentemente passou a documentada em maior volume, em pelo menos oito ordens de insetos hematófagos e fitófagos (Jeffers & Roe, 2008).

Um dos estudos mais completos descritos até o momento mostra a absorção de uréase da amoreira, proteína da dieta das larvas de *B. mori*, bicho da seda, durante a passagem do último instar larval para a fase de pupa o inseto absorve seletivamente a urease de sua dieta. A urease é utilizada como reforço para a libertação de amônia, a partir do qual o nitrogênio é utilizado para a síntese de aminoácidos a serem incorporados na proteína da seda (fibroína), o principal componente dos casulos (Hirayama et al., 1997, 1999, Sugimura et al., 2001; Kurahashi et al., 2005). A enzima urease é transportada através do epitélio intestinal, mantendo a sua atividade catalítica, mas com a sua mobilidade eletroforética alterada (Kurahashi et al., 2005).

Outro exemplo conhecido da vantagem da captação de uma proteína da dieta é a absorção de vicilinas pelas larvas do bruquídeo *C. maculatus*. Neste caso, ao contrário do que é observado nas larvas de *B. mori*, as moléculas de vicilina são absorvidas a partir do início do desenvolvimento larval e estende-se através de todas as fases larvais, parando antes da fase de pupa (Uchôa et al, 2006; Souza et al., 2010). Curiosamente, vicilinas absorvidas pelas larvas aparecem posteriormente depositadas no corpo gorduroso e nas gônadas de fêmeas e machos, após a sua emergência das sementes. Durante a cópula, parte de vicilinas contidas nas gônadas de machos é transferida para a bursa copulatrix das fêmeas, atingindo a hemolinfa e sendo depositada, juntamente com uma

parte das vicilinas sequestradas por fêmeas nas cascas de ovo (Alexandre et al., 2011). Como as fêmeas de *C. maculatus* são poliândricas, elas são capazes de receber vicilinas de mais de um macho. Incorporando este presente nupcial de vicilinas e depositando-as posteriormente nos ovos (Silva et al., 2015).

Uma possível explicação para o sequestro de vicilinas nestes animais e a sua deposição na casca do ovo está na descoberta de que estas proteínas de armazenamento das sementes têm atividade antimicrobiana e antifúngica, tanto na sua conformação intacta ou como fonte de peptídeos gerados a partir de proteólise parcial (Gomes et al., 1997; Marcus et al., 2008). É possível que peptídeos e vicilinas sejam depositados nos ovos, como parte das suas defesas químicas ou como uma forma de aumentar as defesas contra a dessecação. O sequestro de vicilina e sua deposição na casca do ovo como contribuição de ambos os machos e fêmeas poliândricas tem um paralelo no sequestro de alcalóides por alguns Lepidoptera (Dussourd et al., 1988; Zagrobelny et al., 2014).

Tanto em relação à absorção de urease em *B. mori*, e em relação à absorção de vicilinas em *C. maculatus*, não tem sido descrito em detalhes a via de transcitose destas proteínas vegetais utilizadas na dieta desses insetos, através do epitélio intestinal. Em relação ao transporte de urease, há evidências de que a sua absorção ocorre através de endocitose mediada por receptor, uma vez que a análise de microscopia mostrou que a urease se liga a um ou mais receptores hipotéticos presentes nas microvilosidades dos enterócitos e também está localizada em vesículas intracelulares (Kurahashi et al., 2005). A identidade do receptor da urease, bem como os detalhes sobre a via endocítica envolvida na transcitose desta proteína em larvas *B. mori*, não são ainda conhecidos. Até agora, os dados sobre o mecanismo envolvido na absorção de vicilinas por larvas do inseto *C. maculatus* são escassos. Há evidência do envolvimento de algum tipo de receptor na transcitose desta proteína, uma vez que a ligação de vicilinas sem marcação usada em preparações de microvilosidades pode ser inibido pelo aumento da concentração de vicilina marcado, e duas proteínas com afinidade para a ligação a vicilinas foram isoladas por cromatografia de afinidade numa coluna de Sepharose-vicilina (Uchôa et al., 2006).

No presente estudo, além da abordagem *in vivo*, realizaram-se experimentos de "pulso e caça", em que as larvas foram alimentadas com dietas contendo vicilina -marcada com FITC e, este complexo foi localizado em cortes de larvas congeladas e cortadas no criostato (Figura 7), foi utilizada uma abordagem *ex vivo*, em que as preparações lavadas

do epitélio intestinal foram incubadas com a vicilina marcada com FITC e as montagens frescas foram analisadas em microscópio confocal (Figura 8). Com relação a este experimento, observou-se que a proteína marcada aparece em vesículas dentro dos enterócitos com intervalos de tempo crescentes no período de incubação. O epitélio intestinal de insetos é composto por uma única camada de células (epitélio simples), ao contrário do epitélio intestinal de mamíferos, que é estratificado. Trabalhos do final da década de 90 e outros mais recentes têm mostrado que as preparações de intestinos médios inteiros ou epitélios intestinais isolados de insetos se mantêm viáveis por mais de 24 horas, exercendo várias de suas funções normais, como secreção de enzimas digestivas, síntese de prostaglandinas, manutenção de pH luminal, interação com protozoários e até secreção de membrana peritrófica (Braun & Keddie, 1997; Büyükgüzel et al., 2002).

Diante do exposto, foi realizado um curso de temporal das vicilinas marcadas com FITC (Figura 9), o que permitiu-nos seguir o processo de endocitose ao longo de algumas horas. As vesículas de endocitose aparecem nos primeiros 15 minutos de incubação e o seu número aumenta, indicando que as células do epitélio intestinal estão absorvendo vicilina a partir do meio. Na Figura 8 é possível observar um grande número de vesículas endocítica contendo o complexo vicilina-FITC. Estas observações sugerem fortemente que este complexo é internalizado por endocitose.

A utilização da cromatografia de afinidade em coluna de vicilina-Sepharose permitiu purificar proteínas presentes nas membranas microvilares dos enterócitos das larvas de *C. maculatus*. Estas proteínas purificadas demonstraram grande afinidade de ligação com a vicilina (Figura 11 e 12). A identificação desta proteína por espectrometria de massa e análise dos peptídeos gerados no banco de dados NCBI, mostrou que a proteína presente nas microvilosidades do *C. maculatus* é homóloga à proteína Sec14 (Figura 13). Sendo esta bastante comum em insetos, como *Drosophila*, coleópteros, dípteros e lepidópteros (Smith, 2015). A Proteína Sec14 é uma proteína eucariótica tem como domínio CRAL-TRIO, que inicialmente foi identificada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Novick et al., 1980; Aitken et al., 1990; Bankaitis et al., 1990) e atua, principalmente, no tráfego entre membranas, na formação de vesículas secretoras e no transporte de lipídeos (Bankaitis et al., 1989). A proteína SEC14 há alguns anos tem sido proposta como sendo uma das mais importantes proteínas PITP (proteínas transportadoras de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina) em levedura e tem sua função mediada pela ligação com lipídeos, como a

fosfatidilcolina (Schaaf et al., 2007). Pode-se observar que esta proteína homóloga em insetos tem um elevado grau de conservação entre si, a proteína SEC14 apresenta um bolso hidrofóbico onde se encontra a estrutura do domínio CRAL-TRIO, sendo composta por  $\alpha$ -hélices alternadas e por folhas  $\beta$  que ligam moléculas lipofílicas tais como a Vitamina E (Panagabko et al., 2003).

Diante do quadro mostrado acima, e com a utilização de ferramentas computacionais para a análise dos dados genéticos gerados, sugere-se fortemente que a proteína identificada nas microvilosidades do epitélio intestinal do *C. maculatus*, seja o transportador de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 14). O método mais bem sucedido de predição de estruturas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (Deane e Blundell, 2003). Na Figura 14B observa-se um gráfico de Ramachandran, o qual aponta a qualidade do empacotamento global da proteína, podendo definir os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis sendo estes 94% e desfavoráveis 5%, orientando assim a avaliação da qualidade do modelo teórico gerado, a representação gráfica de ângulos  $\phi$  versus ângulos  $\psi$ , é necessário para que se garanta uma maior precisão dos modelos gerados, no mínimo 90% dos 18 ângulos  $\phi$  e  $\psi$  da cadeia principal devem estar na região mais favorável do gráfico de Ramachandran (ANDERSON, 2003). O mecanismo evolutivo da duplicação de genes, associado às mutações leva a divergências moleculares e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas estruturalmente relacionadas, que derivam de um ancestral comum sendo chamadas de homólogas, que apresentam algumas diferenças nas suas sequências de aminoácidos, mas possuem alto grau de similaridade estrutural (Holtje et al., 2003).

Relativamente poucos membros da grande família de genes CRAL-TRIO foram estudados até o momento quanto à especificidade do ligante. Aqueles que têm sido estudados incluem a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol em humanos ( $\alpha$ -TTP), SPF (se liga ao esqualeno), a proteína de ligação ao retinaldeído celular (CRALBP) e em *S. cerevisiae* a SEC14p, que se liga ao fosfatidilinositol e fosfatidilcolina (Smith 2015; Panagabko et al., 2003). Em insetos, a função de apenas um membro da proteína com domínio CRAL -TRIO foi determinada, o qual não foi descoberto utilizando um Screen de *Drosophila*, mas foi descoberto em uma tela para mutantes na biogênese da rodopsina, no qual os olhos de *Drosophila* são deficientes (Wang e Montell, 2005).

Após a cristalização da estrutura do transportador de  $\alpha$ -tocoferol, foi relevado que este possui duas conformações, uma forma fechada

formando um bolso hidrofóbico o qual liga principalmente as moléculas de  $\alpha$ -tocoferol, e uma forma aberta quando está na presença de detergentes como o Triton X-100, este provavelmente representa a forma ligada às membranas (Meier et al., 2003).

Na Figura 15B pode-se observar que vicilina marcada com FITC é capaz de se ligar às bandas purificadas usando cromatografia de afinidade, provando que estas proteínas são reconhecidas por vicilina. Dada a homologia elevada na identificação da proteína com a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol, foi testado o reconhecimento destas proteínas de *C. maculatus* por um anticorpo comercial criado contra a proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol humano. Na Figura 15 C pode-se observar que as duas bandas foram reconhecidas pelo anticorpo comercial, enquanto que o painel D mostra o comprometimento na ligação da vicilina quando este é pré - incubado com alfa tocoferol (vitamina E). Na Figura 16 é possível observar que este anticorpo é capaz de inibir a ligação de vicilina nas proteínas purificadas, o que sugere que as proteínas microvilares purificadas podem corresponder ao receptor (transportador de  $\alpha$ -tocoferol) que medeia a internalização de moléculas de vicilina em enterócitos de larvas do inseto *C. maculatus*.

Para reforçar ainda mais a identidade do receptor responsável pela internalização de vicilina em enterócitos de larvas do *C. maculatus*, foi feita uma análise por microscopia confocal de cortes de larvas, em que as larvas foram alimentadas com o complexo vicilina - FITC e a localização do receptor foi realizada utilizando um anticorpo secundário marcado com rodamina (Figura 17) mostra a co-localização de vicilina "verde" com o receptor em "vermelho", tanto no intestino como e nas células do corpo gorduroso, o que sugere que o mesmo receptor ou outro receptor muito semelhante está envolvido na internalização de vicilina no intestino e nas células do corpo gorduroso. A localização também foi observada através de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 18).

A fim de esclarecer se a endocitose de vicilinas é dependente de clatrina ou caveolina, utilizou-se uma combinação de inibidores destas vias de endocitose para as experiências *in vitro*. A Figura 19 mostra que a incubação dos epitélios na presença de filipina III e nistatina causou o desaparecimento das vesículas de endocitose no citoplasma dos enterócitos, enquanto que clopromazina e óxido de phenylarsina, que são inibidores da endocitose dependente de clatrina, não afetaram a internalização da vicilina marcada (Figura 20). Estes dados sugerem que a endocitose de vicilina é dependente de caveolina. Para reforçar estes dados, foi medida a fluorescência presente no epitélio que foram pré-incubadas na presença ou na ausência dos inibidores da endocitose,

seguido de incubação com o complexo de vicilina-FITC. Embora filipina III, nistatina e wortmanina foram significativamente mais eficazes na inibição da internalização de vicilina, os inibidores clopromazina e óxido de phenylarsina, causaram uma inibição parcial de endocitose em comparação com o grupo de controle (Figura 21). Estes dados sugerem que a internalização do complexo de vicilina-FITC pode ocorrer através de via dependente de caveolina, além de endocitose dependente de clatrina. Dados semelhantes aos observados aqui com vicilina foram descritas para a internalização de duas lectinas de *Sambucus nigra* em CF-203 células de inseto do intestino médio mantidas em cultura, que também envolve endocitose dependente caveolina e clatrina (Shahidi-Noghabi et al., 2011).

Existem evidências crescentes de que a transcitose de proteína intacta através do epitélio do intestino de insetos é mediada por receptores, embora apenas um número muito pequeno de receptores foi descrito. Um dos poucos estudos que mostram a identidade de um receptor envolvido na endocitose de uma proteína relatado que a internalização do complexo de albumina-FITC em células do intestino médio de *B. mori* envolve megalina (Casartelli et al., 2008). Análise confocal e experiências de imuno-localização com um anticorpo primário anti-megalina indicou que o receptor era de um homólogo a megalina, o receptor pertencente à família de lipoproteína de baixa densidade encontrada em mamíferos. Os autores também demonstraram que a internalização de albumina-FITC foi mediada por clatrina e que a integridade da actina e organização dos microtúbulos foram essenciais para o bom funcionamento da maquinaria endocítica.

No epitélio intestinal dos insetos, ambos os mecanismos moleculares de transcitose a proteína da dieta intacta e aqueles através dos quais vesículas de endocitose são geradas e movimentam todos endossomos continuam a ser mal compreendido. Os poucos estudos publicados mostram que, assim como outras formas de transcitose nos sistemas digestivos de mamíferos, em transcitose de proteína através do epitélio intestinal dos insetos envolve endocitose mediada pelo receptor e do tráfego vesicular (Kurahashi et al, 2005; Casartelli et al, 2008; Shahidi-Noghabi et al. 2011;).

## 9.2 MECANISMOS DA FASEOLINA COMO AGENTE LIMITANTE NA CAPACIDADE DO INSETO *CALLOSOBRUCHUS MACULATUS* EM ABSORVER ANTIOXIDANTES.

No ambiente celular, é comum a presença de radicais livres derivados do oxigênio, formados durante o metabolismo oxidativo. Durante a evolução, a formação de radicais livres ocorreu após uma mudança do metabolismo energético, que se deu após o aumento dos níveis atmosféricos de oxigênio gerado pelo surgimento de organismos fotossintéticos, dando origem a diversas respostas adaptativas na maioria dos organismos, daí o surgimento das mitocôndrias e da respiração, bem como o desenvolvimento de mecanismos antioxidantes. Dentre as ROS mais importantes estão o superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^\bullet$ ) (Gandara et. al, 2012).

A geração descontrolada de ROS pode levar à oxidação de proteínas, DNA e lipídeos causando danos que podem culminar na morte celular. Quando existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação dos mecanismos antioxidantes, ocorre o que se chama estresse oxidativo. Boa parte das substâncias de defesa das plantas é composta de substâncias de baixa massa molar, como glicosídeos cianogênicos, diversos tipos de alcalóides, aminoácidos não – protéicos, etc, mas também algumas sementes adicionam a essa substância de efeito agudo, alguns produtos gênicos primários que atuam de forma crônica, afetando de alguma forma a performance do herbívoro. Grande parte da pressão de herbivoria em sementes maduras é resultado do ataque de insetos, em especial de insetos da ordem Coleoptera.

Em relação à faseolina, foi observado que esta globulina quando comparada a vicilina, fica em maior quantidade presa nas células no epitélio intestinal, podendo causar a morte dos insetos pela dificuldade na absorção de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento como a vitamina E (Kunz, 2012). Dentre as sementes que se destacam por acumular proteínas potencialmente tóxicas as sementes de leguminosas tem um papel de destaque. Essas sementes costumam acumular cerca de metade da sua massa fresca na forma de proteínas, muitas dessas proteínas possuindo atividades antinutricionais. Até mesmo as proteínas de reserva dessas sementes já foram registradas como tendo atividades inseticidas e antifúngicas. Por serem tão ricas em proteínas e carboidratos, diversas sementes de leguminosas foram domesticadas pelo homem, como o feijão, a ervilha, a soja etc e elas fazem parte da dieta de diversas comunidades humanas. Estudos reproduzidos com

epitélios *ex vivo* dos insetos *C. maculatus*, confirmam um volume maior de faseolina retida nas células no epitélio intestinal (Figura 22 e 23). Este aprisionamento de faseolina nos enterócitos pode estar levando a um estresse oxidativo pela privação de nutrientes ao inseto, em especial a vitamina E. Muitas plantas respondem à predação por insetos com um aumento acentuado da produção de espécies reativas de oxigênio. A produção aumentada de superóxido e peróxido de hidrogênio podem conduzir a um fenômeno conhecido como resposta de hipersensibilidade, onde as ROS produzidas pela planta provocam a morte das células do vegetal ao redor do inseto, isolando-o das partes saudáveis e eventualmente levando a morte do invasor por inanição, assim como pela exposição aos níveis elevados de ROS, um mecanismo descrito em insetos que formam galhas em vegetais tão diversos como trigo ou pinheiros (Gandara et al., 2012; Mittapalli et al., 2007; Radville et al., 2011).

Alternativamente, realizou-se a comparação através do pulso de alimentação das larvas de *C. maculatus* com faseolina e vicilina marcadas com FITC durante 24h e observou-se que a faseolina permanece em maior quantidade no epitélio intestinal e ápice dos enterócitos, quando comparada à vicilina (Figuras 24 e 25). Nota-se que a vicilina no período de 24h já pode ser visualizada nas células do corpo gorduroso, sugerindo que está não causa danos ao inseto quando é ingerida. Durante o processo de seleção artificial dessas sementes, as substâncias tóxicas de baixa massa molar e termoestáveis foram sendo progressivamente eliminadas. No entanto, devido ao cozimento para o consumo humano, as proteínas de defesa, por conta da inativação térmica, passaram incólumes a esse processo de seleção e foram conservadas, sendo depositadas durante a formação das sementes, podendo protegê-las do ataque de herbívoros.

Em estudo realizado para medir possíveis efeitos da faseolina sobre estresse oxidativo das larvas *C. maculatus* (Figuras 26 e 27), confirmou-se que os níveis de espécies reativas de oxigênio, medidos pelo método de Tbars são especialmente altos nas larvas que foram alimentadas com faseolina, podendo-se comparar com sulfato ferroso, utilizado para induzir o estresse oxidativo. A faseolina tem sido descrita como um potente causador de antibiose em insetos da espécie *C. maculatus*. A resistência da semente *P. vulgaris* a *C. maculatus* tem sido atribuída a faseolina, uma vez que esta provoca a morte dos insetos (Kunz, 2012). No caso da variedade transgênica de álamo que superexpressa uma peroxidase, esta se mostrou mais resistente à predação pela mariposa *Lymantria dispar* (Barbehenn et al., 2010).

Os resultados relatados neste trabalho demonstram pela primeira vez que moléculas de vicilina entram nas células do intestino médio de *C. maculatus* predominantemente por endocitose independente de clatrina mediada por receptores, exigindo o tráfego vesicular através dos compartimentos endossomais para a conclusão subsequente de uma transcitose produtiva. Elucidar os mecanismos subjacentes a conversão de diferentes vesículas de endocitose e endossomos não só irá avançar no campo da transcitose de proteínas na dieta, mas também serão a chave novos insights nos mecanismos fundamentais na biogênese de vesículas e tráfego intracelular nos tecidos intestinais dos insetos.

Por outro lado, demonstrou-se que, ingestão de faseolina pelas larvas de *C. maculatus* produz ROS. Sugere-se fortemente que a faseolina é tóxica causando efeitos crônicos sobre as larvas do bruquídeo *C. maculatus*, afetando a sobrevivência destes insetos pelo fato da privação de nutrientes, assim, a ingestão de faseolina em quantidades consideradas fisiológicas parece ser acompanhada pelo aumento da produção de ROS, cujos níveis são aumentados após 24h da alimentação, isso talvez implique um certo "custo" para o organismo, por exemplo, o comprometimento no desenvolvimento e até mesmo a morte.

A busca de novas proteínas que sejam tóxicas para insetos pragas continua imprescindível, tanto quanto conhecer suas propriedades moleculares e seus mecanismos de ação, etapas indispensáveis para a base do desenvolvimento biorracional. O objetivo final deste trabalho é fornecer mais informações a respeito do potencial adaptativo dos insetos pragas a proteínas potencialmente tóxicas e, assim, planejar melhores estratégias de controle.



## 10. CONCLUSÕES

1. Os dados aqui apresentados mostram que a proteína de reserva da semente *V. unguiculata* vicilina, é internalizada por endocitose nas larvas do caruncho *C. maculatus*.
2. A rota pela qual a proteína é endocitada é mediada principalmente por caveolina e, em menor taxa, por clatrina.
3. A proteína isolada e purificada em cromatografia de afinidade vicilina-Sepharose, presente nas membranas do epitélio intestinal das larvas do inseto *C. maculatus*, é reconhecida pelo anticorpo anti a proteína transportadora de  $\alpha$  - tocoferol.
4. Faseolina quando ingerida pelo inseto *C. maculatus* produz espécies reativas de oxigênio, pelo fato de possuir uma forte afinidade pela proteína transportadora de  $\alpha$ - tocoferol, podendo levar as larvas à morte por inanição.
5. Sugere-se que a vicilina/faseolina se liga no mesmo transportador de  $\alpha$ -tocoferol.



## REFERÊNCIAS

Aitken J. F. The gene encoding the phosphatidylinositol transfer protein is essential for cell growth. *Journal of Biology Chemistry*, 1990. p.4711-7.

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1-194.

Alexandre, D., Linhares, R.T., Queiroz, B., Fontoura, L., Uchoa, A.F., Samuels, R.I., Macedo, M.L.R., Bezerra C.S., Oliveira, E.M. ; Demartini, D.R., Carlini, C.R., Silva, C.P. Vicilin-derived peptides are transferred from males to females as seminal nuptial gift in the seed-feeding beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 2011. p. 801-808.

Anderson, A.C. *The Process of Structure-Based Drug Design*. Chemistry & Biology, 2003.p. 787-797.

Apodaca, G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic*, 2001. p.149-159.

Argos, P.; Narayana, S. V.; Nielsen, N.C. structural similarity between legumin and vicilin storage preteins from legumes. *The Embo Journal*, 1985. p.1111-1117.

Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E., Dowhan, W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function, *Nature*, 1990.p. 561–562.

Bäumlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I.A., Shutov, A.D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 1995. p. 1070–1075.

Bavoso A, Falabella P, Giacometti R, Halane AJ, Ostuni A, Pennacchio F, Tremblay E. Intestinal absorption of proctolin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Redia*, 1995. p. 173–185.

Barbehenn, R., Dukatz, C., Holt, C., Reese, A., Martiskainen, O., Salminen, J.P., Yip, L., Tran, L., Constabel, C.P. Feeding on poplar leaves by caterpillars potentiates foliar peroxidase action in their guts and increases plant resistance. *Ecologia*, 2010. p. 993-1004.

- Borovsky D, Mahmood F. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regul Peptides*, 1995. p. 273–81.
- Borovsky D. Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *J Exp Biol*, 2003. p. 3869–3875.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem*, 1976. p. 248-254.
- Braun, H., Horstmann, C., Bäumlein, H. A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. *Plant Molecular Biology*, 1996. p. 35-44.
- Blum, H., Beier, H. and Gross H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987. p. 93-99.
- B.P Zhou, Y Liao, W Xia, Y Zou, B Spohn, M.C Hung HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation *Nat. Cell Biol.*, 2001. p. 973–982.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. *Invertebrados*. Segunda edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2007. 968p.
- Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J., Silva, C. P., Ary, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and  $\alpha$ -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comparative Biochemistry. Physiology*, 1989. p. 51-57.
- Casartelli, M., Corti, P., Leonardi, M.G., Fiandra, L., Burlini, N., Pennacchio, F., Giordana, B. Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *Journal of Insect Physiology*, 2005. p. 933–940.
- Casey, R., Domoney, C., Ellis, N. Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surveys of Plant Molecular Biology and Cell Biology*, 1986. 2-95.
- Castillo, J., Rodrigo, M.I., Márquez, J.A., Zúñiga, A. and Franco, L. A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *European Journal Biochemistry*, 2000.p. 2156-2165.
- Carasco, J.F., Croy, R., Derbyshire, E., Boulter, D. The isolation and characterization of the major polypeptides of the seed globulin of

cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their sequential synthesis in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 1978. p. 309-323.

Cheng S.C, Quintin J, Cramer R.A, Shepardson K.M, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis E.J, Martens J.H, Rao N.A, Aghajani-Refah A, Manjeri G.R, Li Y, Ifrim D.C, Arts R.J, van der Meer B.M, Deen P.M, Logie C, O'Neill LA, Willems P, van de Veerdonk. mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. FL, 2014.

Cossart P; Pizarro-Cerdá J, . Bacterial Adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006. p .715-27.

Conab. Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: safra 2015/2016. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2016. Acesso em: 02 fev. 2017.

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

Deane, C. M.; Blundell, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2003.

Dussourd, D.E., Ubik, K., Harvis, C., Resch, J., Meinwald, J., Eisner, T. Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *utetheisa ornatix*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1988. p . 5992–5996.

Duranti, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* , 2006. p. 67-82

Dringen, R.; Pawlowski, P. G.; Hirrlinger, J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, 2005. p. 157-165

Fernandes, K. V. S., Sabellii, P. A., Barrat, D. H. P., Richardson, M., Xavier-Filho, J. & shewry, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 1993. p. 215-219.

Ferraz, F. C.; Carvalho, A.G., Souza, N, J. Eficiência de armadilhas de impacto para levantamento de coleópteros em vegetação ciliar em Pinheiral. *Simpósio de Ecossistemas Brasileiros*, 1998. p. 142 - 145.

Fiandra, L., Casartelli, M., Cermenati, G., Burlini, N., Giordana, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic

membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. *Journal of Insect Physiology*, 2009. p. 10-18.

Firmino, F., Fernandes, K. V. S., Sales, M. P., Gomes, V. M, Miranda, M. R.

A., Domingues, S. J. S. & Xavier-Filho, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996. p. 749-756.

Fitches E, Woodhouse S, Edwards J.P, Gatehouse J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Jornal Insect Physiology*, 2001. p. 777–87.

Fitches, E., Ilett, C., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, L.N., Greene, R., Edwards, J.P. and Gatehouse, J.A. The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology*, 2001. p. 1389-1398.

Fitches, E., Audsley, N., Gatehouse, J.A. and Edwards, J.P. 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*, 2002. p. 1653-1661.

Gallo, D.; Nakano, O. Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Batista, G. C. de; Berti Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. R. A.; Alves, S. B. Vendramim, J. D. *Manual de Entomologia Agrícola*, 1988. 649 p.

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. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997. p. 271-281.

Gandara, A. C. P., Dias, F., Oliveira, J. H. M., Gonçalves, R., Oliveira P. L. Os Múltiplos Papéis dos Radicais Livres na Biologia e na Evolução

dos Insetos. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012.

Gatehouse, A. M. R.; Gatehouse, J. A.; Dobie, P.; Kilminster, A. M.; Bouter, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1979. p. 948-958.

Gatehouse, A. M. R. & Bouter, D. 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*, 1983. p. 345-350.

Gatehouse, A. M. R. Antinutritional proteins in plants. In —Developments in Food Proteins. Elsevier, 1984. p. 245-293

Gepts, P.; Beavis, W.D., Brummer, E.C. Legumes as a model plant family. *Genomics for food and feed. Plant Physiology*, 2005. p.1228-1235.

Gomes, V.M., Mosqueda, M.-I., Blanco-Labra, Sales, A.M.P., Fernandes, K.V.S., Cordeiro, R.A., Xavier-Filho, J. Vicilin storage protein from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. p. 4110-4115.

Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., et. al. Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the  $\alpha$ -tocopherol-transfer protein. *The New England Journal of Medicine*, 1995. p. 1313–1318.

Grossi de Sá, M. F., Chrispeels, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 1997. p. 271-281.

Guillard, M.; Dimopolou, A.; Fischer, B.; Morava, E.; Lefeber, D.J.; Kornak, U.; Wevers, R.A. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. p. 903–914.

Hirayama, C., Sugimura, M., Shinbo, H. Recycling of urea associated with the host plant urease in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 1999. p. 15–20.

Höltje, H. D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

Huesing, J. E., Shade, R. E., Chrispeels, M. J. e Murdock, L.L.  $\alpha$ -Amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean to cowpea weevil. *Plant Physiology*, 1991 .p. 993-996.

Ishimoto, M., Chrispeels, M. J. Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$  -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology*, 1996. p. 393-401.

Ishimoto, M., Kitamura, K. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology and Zoology*, 1989. p. 281-286.

Ishimoto, M., Suzuki k., Iwanaga M., Kikuchi F., Kitamura, K. Variation of seed alfa-amylase inhibitors in the common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995.p. 425-429.

Ishimoto, M., Yamada, T., Kaga, A. Insecticidal activity of  $\alpha$  -amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of alfa-amylase inhibitor in the common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Biochimica and Biophysica*, 1999.p. 104-112.

Janzen, D. H. Specificity of seed-attacking beetles in a Costa Rican deciduous forest. *Journal of Ecology*, 1980.p. 929-952.

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

Jeffers, L.A., Roe, R.M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *Journal of Insect Physiology*, 2008.p. 319-332.

Jeffers, L.A., Roe, R.M. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *Journal of Insect Physiology*, 2008. p. 319-332.

Jeffers, L.A., Shen, H., Bissinger, B.W., Khalil, S., Gunnoe T.B., Roe, R.M. Polymers for the stabilization and delivery of proteins topically and per os to the insect hemocole through conjugation with aliphatic polyethylene glycol. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2014. p. 58–66.

Jongsma M. A., Baker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by

induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. Proceeding of the National Academy. 1995.p. 8041-8045

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

Lara, F. M. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2ª ed., São Paulo, 1991. 336 p.

Katoh K, Asimemos G, Toh H. Multiple Alignment of DNA Sequences With Mafft. Methods Molecular Biology, 2009. p.39-64.

Kitch, L. W., Murdock, L. L. Partial characterization of a major thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus*. F. Arch. Insect Biochemistry Physiology, 1986.p. 561-575.

Kurahashi, H., Atiwetin, P., Nagaoka, S., Miyata, S., Kitajima, S., Sugimura, Y. Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology, 2005.p. 1055–1061.

Kunz, D. Estudo da antibiose e destino da faseolina (Globulina – *Phaseolus vulgaris*) em larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), 2014. 79f Dissertação (mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2014.

Läemml, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature, 1970.p. 680-685.

Lima, C. A. M. Insetos do Brasil. Coleopteros. 3ª parte - Escola Nacional de Agronomia, 1955. Rio de Janeiro.

Lourenço, E. J. Tópicos de proteínas de alimentos. Funep. Jaboticabal, 2000. 343p.

Lovell S.C., Davis I.W., Arendall W.B III, De Bakker P.I.W., J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson and D.C. Richardson Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. Proteins: Structure, Function & Genetics, 2002.p. 437-450.

Luo J, D Manning B, C Cantley L Targeting teh PI3K – AKT pathway in human câncer: Rationale and Promise. Cell Press October, 2003.p. 257–262.

- Mayor S, Pagano R.E. Pathways os Clathrin-Independent Endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. p.603-12.
- Macedo, M.L.R., Andrade, L.B.S, Moraes, R.A. and Xavier-Filho, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1993.p. 88-94.
- Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V. ., Sales, M. P. and Xavier-Filho J. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible and resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research Brasil*,1995. p. 183-190.
- Manners, J.M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome Biology*, 2007. p.225.
- Marcus, J.P., Green, J.L., Goulter, K.C., Manners, J.M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia*. *The Plant Journal*, 1999.p. 699-710.
- Marcus, J.P.; Goulter, K.C.; Manners, J.M. Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity in vitro. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2008.p. 75–87.
- Menezes, A. C. S. G. et al. Importância sócio-econômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima. In: workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima. Embrapa, 2007.
- Meier, R., Takashi, T. , Clemens, S.B. Baumann, U., Stocker, A. The Molecular Basis of Vitamin E Retention: Structure of Human  $\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein. *Journal. Molecular Biology*, 2003.p. 725–734.
- Mittapalli, O., Neal, J.J., Shukle, R.H. Antioxidant defense response in a galling insect. *Proceeding of the National Academy of Science*, 2007. p.1889-1894.
- Morton, R.E. and Evans, T.A. Modifications of the bicinchoninic acid proteins assay to eliminate lipid interference in determining protein content. *Analytical Biochemistry*, 1992. p. 332-334.
- Mota, A.C., DaMatta, R.A., Lima-Filho, M., Silva, C.P., Xavier-Filho, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). *Journal of Insect Physiology*, 2003. p. 873-880.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55-63, Dezembro. 1983.

Nafria, J. M. N. & Durante, M. P. M. *Tratado de Entomologia*, 1985. 599p.

Müntz, K., I. A., Braun, H., Baumlein, H. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common singledomain ancestral gene. *Journal of Molecular Evolution*, 1057–1069.

Ng, T.B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins. *Peptides*, 2004. p. 1215-1222.

Novick P, et al. Identification of 23 complementation groups required for posttranslational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 1980. p.205-15

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*, 2013.

Okamoto, C.T. Endocytosis and transcytosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998. p. 215-228.

Paes, N.S., Gerhardt, I.R., Coutinho, M.V., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., Chrispeels, M.J. and Grossi-de-Sá, M. F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of the bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *Journal of Insect Physiology*, 2000. p. 393-402.

Paes, E.V., Uchôa, A.F., Pinto, M.S.T., Silva, C.P., Fernandes, K.V.S., Oliveira A.E.A., Xavier-Filho, J. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2008.p. 11-17.

Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., Manor, D., Atkinson, J. Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry*, 2003. p. 6467-6474.

Pedrosa-Macedo, J. H. Os coleópteros nos reflorestamentos brasileiros. (Mimeografado). Curso sobre atualização em Proteção Florestal, 1989. 13p.

Powell KS, Spence J, Bharathi M, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). *Jornal Insect Physiology*, 1998. p. 529–539.

Quintela, E. D. et al. Principais pragas do caupi no Brasil. EMBRAPA/CNPAP, 1991.

Q Yu, Y Geng, P Sicinski. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature*, 2001. p. 1017–1021.

Radville, L., Chaves, A., Preisser, E.L. Variation in plant defense against invasive herbivores: evidence for a hypersensitive response in eastern hemlocks (*Tsuga canadensis*). *Journal of Chemistry Ecology*, 2011.p. 592-597.

Raina A.K, Rafeali A, Kingan T.G. Pheromonotropic activity of orally administered PBAN and its analogs in *Helicoverpa zea*. *Journal Insect Physiology*, 1994.p. 393–397.

Richards, O. W. & Davies, R. G. *Tratado de Entomologia*, 1984. 998p.

Ryan, C. A. *Annu. Rev. Phytopathology*, 1990. p. 425- 449.

Sammour, R. H., Gatehouse, J. A., Gilroy, J. and Boulter, D. The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformes*) to pea vicilin and its separation from  $\alpha$ -mannosidase. *Planta*, 1984. p. 61-70.

Sato, y., Arai, h., Miyata, A., et al. Primary structure of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *Journal Biology. Chemistry*, 1993.p. 17705–17710.

Sales, M. P., Gerhardt, I. R., Grossi-de-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*, 2000. p. 515-522.

Shahidi-Noghabi, S., Damme E. J. M. V., De Vos, W. H., Smagghe, G., Internalization of *Sambucus nigra* Agglutinins I and II In Insect Midgut CF-203 Cells. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 2011.

Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Tabe, L. M., Murdock, L. L., Higgins, T. J. V., Chrispeels, M. J. Transgenic pea seeds expressing the

□-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology*, 1994. p. 793-796.

Schaaf, G., Ortlund, E., Tyeryar, K., Mousley, C., Ile, K., Woolls, M., Garrett, T., Raetz, C.R.H., Redinbo, M. AND Bankaitis, V.A. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Molecular Cell*, 2008. p. 191–206.

Schmitz, J., Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B. K., Cerda, J., Crane, R. K. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica*, 1973. p. 98-112.

Schroeder, H. E., Gollasch, S., Moore, A., Tabe, L. M., Craig, S., Hardie, D. C., Chispeels, M. J., Spencer, D., Higgins, T. J. V. Bean □-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, 1995. p. 1233-1239.

Southgate, B. J. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 1979. p. 449-473.

Shewry, P.R. Plant Storage proteins. *Revista Brasileira de biologia*, 1995. p.375-426,

Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Y.V., Bäumlein, H. A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. *European Journal of Biochemistry*, 1998. p. 79-89.

Shutov, A.D., Kakhovskaya, I.A., Braun, H., Bäumlein, H., Müntz, K. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *Journal of Molecular Evolution*, 1995. p. 1057–1069.

Silva, C.P., Kunz, D., Linhares, R. T., Samuels. R. I, Macedo, M. L. Diet-derived vicilins detected in eggs laid by a double-mated female *Callosobruchus maculatus* originate from nuptial gifts donated by both male partners. *Journal of Stored Products Research*, 2015. p. 71-74.

Silva L. B., Sales M. P., Oliveira A. E. A., Machado O. L. T., Fernandes K. V. S., Xavier-Filho J. The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)]. *An. Academia Brasileira de Ciências*, 2004. p. 57-65.

Silva, C.P., Terra, W.R., Lima, R.M. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001.p. 18-28.

Silva, C. P., Xavier-Filho, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry Physiology*, 1991. p. 529-533.

Singh, B. B., Singh, S. R., Adaji, O. Bruchid resistance in cowpea. *Crop Science*, 1985.p. 736-739.

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. and Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985.p. 76-85.

Smith, G.; Briscoe A. D. Molecular evolution and expression of the CRAL\_TRIO protein family in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015. p. 168-173

Southgate E, B. J. Biology of Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 1979. p. 449-473.

Souza, S.M. Absorção e compartimentalização de vicilinas de *Vigna unguiculata* em *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

Souza, S.M., Uchôa, A.F., Silva, J.R., Samuels R.I., Oliveira, A.E.A, Oliveira, E.M., Linhares, R.T., Alexandre, D., Silva, C.P. The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Journal of Insect Physiology*, 2010.

Sorkin A., Von. Z. M., Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Rev. Mol. Cel. Biol*, 2009. 609-22.

Stanley, D.W., Bedick, J.C. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Physiology*, 1997.

Sugimura, M., Hirayama, C. and Nakamura, M. Selective transport of the mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph of

- the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 2001.p. 1133-1138.
- Terra, W. R., Ferreira, C., Bastos, F. Phylogenetic consideration of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, 1985.p. 443-449.
- Terra, W. R., Ferreira, C. Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, 2005. p. 171-224.
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979. p. 4330-4335.
- Tuma, P.L., Hubbard A.L. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiology Review*, 2003. p. 871-932.
- Uchôa, A.F., DaMatta, R. A., Retamal, C. A., Albuquerque-Cunha, J. M., Souza, S. M. de, Samuels, R. I., Silva, C. P. and Xavier-Filho, J. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology*, 2006. p. 169-178.
- Utsumi, S. Plant food protein engineering. In: *Advances in food and Nutrition Research*, 1992. Vol. 36.
- Wang, T., Montell, C. Rhodopsin formation in *Drosophila* is dependent on the PINTA retinoid-binding protein. *The Journal of Neuroscience*, 2005. p. 5187-5194.
- Wigglesworth, V.B. The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 1943.p. 313-339.
- Yunes, A. N. A., Andrade, M. T., Sales, M. P., Moraes, R. A., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M., Xavier-Filho, J. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)]. *Science of Food and Agriculture*, 1998. p.111-116.
- Verzar, F. MCDougall E.J. Absorption from the Intestine. Published by London, New York, Longmans, Green, 1936.

Xavier-Filho J, Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M. M., Macedo, N. L. R., Lemos, f. J. A., Grant, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 1989. p. 1139-1143

Xavier-Filho, J. The resistance of seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*) to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991. p. 75-77.

Xavier-Filho, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 1992. p. 1-6.

Zagrobelny, M., Motawie, M.S., Olsen, C.E., Pentzold, S., Fürstenberg-Hägg, J., Jorgensen, K., Bak, S.; Moller, B.L., Motawia, M.S. Sequestration, tissue distribution and developmental transmission of cyanogenic glucosides in a specialist insect herbivore. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014. p. 44–53.

Zhu W, Vandingenen A, Huybrechts R, Verammen T, Baggerman G, De Loof A, Poulos CP, Velentza A, Breuer M. Proteolytic breakdown of the neb-trypsin modulating oostatic factor (Neb-TMOF) in the hemolymph of different insects and its gut epithelial transport. *Journal Insect Physiology*, 2001. p. 1235–1242.

Zhu, K., Huesing, J. E., Shade, R. E., Murdock, L L. Cowpea trypsin inhibitor and resistance to cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) in cowpea variety TVu 2027. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1994. p. 987-991.