

**Sementes como fonte de compostos químicos
com potencial para o controle do besouro**

Tribolium castaneum

Ariane Fabres de Jesus

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Fevereiro – 2014

**Sementes como fonte de compostos químicos
com potencial para o controle do besouro**

Tribolium castaneum

Arianne Fabres de Jesus

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende

Campos dos Goytacazes – RJ

Fevereiro – 2014

Sementes como fonte de compostos químicos com potencial para o controle do besouro

Tribolium castaneum

Arianne Fabres de Jesus

Comissão examinadora:

Prof. José Roberto da Silva (UFRJ - Macaé)
Membro Externo da Banca

Prof. Francisco José Alves Lemos (CBB - UENF)
Membro da Banca

André de Oliveira Carvalho (CBB - UENF)
Membro da Banca

Antônia Elenir Amâncio Oliveira (CBB - UENF)
Orientador

Gustavo Lazzaro Rezende (CBB - UENF)
Co-orientador

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota"

(Theodore Roosevelt)

DEDICATÓRIA

À minha sobrinha e amiga Paula da Silva Fabres (*in memoriam*) por nos mostrar que a vida deve ser vivida em sua maior intensidade.

Agradecimentos:

A minha mãe Neuza, por seu amor incondicional que mantem toda a família unida;

Ao meu pai Dulcino, pelo exemplo de trabalho e honestidade;

Agradeço à minha orientadora Profa. Antônia Elenir, que me deu a oportunidade de conhecer a grande professora que ela é. Obrigada por me ajudar a encarar todos os desafios dessa tese;

Ao meu co-orientador Gustavo Lazzaro Rezende, por toda a ajuda no desenvolvimento desse projeto;

Ao meu irmão e padrinho Paulo Cesar, por acreditar em mim, por toda a ajuda e atenção;

À minha cunhada e madrinha Alzenir, por ter sempre feito da sua casa um pouquinho minha e é claro por todas as madrugadas que ficou acordada me esperando;

À minha madrinha e irmã Elizete, por ser um exemplo de carinho e amor ao próximo;

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e agregados da família, por todos os momentos de alegria durante nossas reuniões familiares sempre lotadas e cheias de sorrisos;

Ao Felipp da Silveira Ferreira, pelo amor, carinho, atenção e paciência durante todo esse tempo que estamos juntos;

A minha tia Sônia Fabres e ao meu tio Aloir Fabres por todo o carinho;

À minha gata Lua por ser minha companhia nos seus cinco anos de vida, inclusive durante a elaboração dessa tese;

À amiga Janaina Macedo por todos os momentos alegres dentro e fora do laboratório;

Aos membros do laboratório Eduardo, Leonardo, Kayan, Nadia, Janaina e Lilia, por proporcionar um ótimo ambiente de trabalho;

Ao Sr. Nilton e a Dona Sônia por terem se tornado amigos muito queridos;

À amiga Ojana por ter sido minha primeira aluna, mesmo que extraoficialmente.

Foi um enorme crescimento em minha vida pessoal e profissional.

Índice

| | |
|---|------------|
| Resumo | xiv |
| Abstract | xv |
| 1- Introdução | 16 |
| 1.1- Besouro <i>Tribolium castaneum</i> | 17 |
| 1.2 - Sistema digestório de insetos | 21 |
| 1.3 - Controle do <i>Tribolium castaneum</i> | 24 |
| 1.4 – Mecanismo de defesa de plantas | 26 |
| 1.5 - Inibidores de proteases e seus efeitos no desenvolvimento de insetos | 29 |
| 2 - Objetivos | 33 |
| 2.1 - Objetivo geral..... | 34 |
| 2.2 - Objetivos específicos e metas..... | 34 |
| 3 - Materiais e Métodos | 35 |
| 3.1 - Obtenção das sementes e farinhas | 36 |
| 3.2 - Manutenção da colônia de <i>T. castaneum</i> | 36 |
| 3.3 – Avaliação da composição proteica, lipídica e glicídica das farinhas..... | 36 |
| 3.3.1 - Quantificação de proteínas das diferentes farinhas | 36 |
| 3.3.2 - Quantificação de triglicérides nas diferentes farinhas | 37 |
| 3.3.3 - Quantificação de carboidratos nas diferentes farinhas | 37 |
| 3.4 - Avaliação do desenvolvimento embrionário do <i>T. castaneum</i> mantido nas diferentes dietas - Fixação de embriões e marcação com DAPI | 38 |
| 3.5 - Avaliação da ingestão das diferentes farinhas marcadas com FITC pelas larvas de <i>T. castaneum</i> | 38 |
| 3.6 - Efeito das diferentes farinhas na sobrevivência, desenvolvimento larval, formação de pupas e adultos..... | 39 |
| 3.7 – Avaliação das dietas sobre a quantidade de proteínas, carboidratos e triglicérides das larvas | 39 |
| 3.7.1 - Quantificação de proteínas em larvas alimentadas com as diferentes dietas | 40 |
| 3.7.2 - Quantificação de carboidratos em larvas alimentadas com as diferentes dietas | 40 |
| 3.7.3 - Quantificação de triglicérides em larvas alimentadas com as diferentes dietas | 40 |
| 3.8 - Efeito das diferentes dietas sobre a atividade de enzimas digestivas das larvas de <i>T. castaneum</i> | 41 |
| 3.8.1 - Atividade da α -amilase em larvas alimentadas com diferentes farinhas..... | 41 |
| 3.8.2 - Perfil da atividade da α -amilase por eletroforese em larvas alimentadas com diferentes farinhas..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8.3 - Atividade de proteases cisteínicas | 42 |
| 3.8.4 - Atividade de proteases serínicas..... | 42 |
| 3.9 – Efeito inibitório <i>in vitro</i> de extratos de farinha de <i>G. max</i> sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas | 43 |
| 3.9.1 - Ensaio de inibição de proteases cisteínicas | 43 |
| 3.9.2 - Ensaio de inibição de proteases serínicas | 43 |
| 3.10 – Isolamento e caracterização do inibidor de proteases de cotilédones de <i>G. max</i> | 44 |
| 3.10.1 - Montagem da coluna de afinidade de papaína acoplada a Sepharose 4B para isolamento e caracterização do inibidor de proteases de cotilédones de <i>G. max</i> | 44 |
| 3.10.2 - Extração de proteínas de <i>G. max</i> e cromatografia de afinidade em papaína-Sepharose 4B | 44 |
| 3.10.3 - Perfil de proteínas retidas na coluna de afinidade a papaína..... | 45 |
| 3.10.4 - Caracterização das proteínas isoladas por espectrometria de massas | 45 |
| 3.11 - Efeito <i>in vitro</i> dos inibidores de semente de <i>G. max</i> sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas | 47 |
| 3.12 - Avaliação da transcrição das proteases cisteínicas o tipo catepsina L 1, 2 e 3 em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto. | 47 |
| 3.13 - Síntese da dsRNA da catepsina L3 e seu silenciamento em fêmeas e larvas microinjetadas | 48 |
| 3.14 - Síntese da dsRNA da catepsina L3 e seu silenciamento em fêmeas e larvas microinjetadas | 48 |
| 3.15 – Análise estatística | 49 |
| 4 - Resultados | 50 |
| 4.1 - Composição protéica, lipídica e glicídica das farinhas das dietas | 51 |
| 4.2 - Avaliação da ingestão das farinhas de <i>G. max</i> , <i>V. unguiculata</i> e <i>P. vulgaris</i> pelas larvas de <i>T. castaneum</i> | 53 |
| 4.3 - Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>T. castaneum</i> mantidos nas diferentes farinhas..... | 55 |
| 4.4 - Efeitos das diferentes farinhas na sobrevivência, desenvolvimento larval, formação de pupas e adultos..... | 57 |
| 4.5 - Efeito das dietas na quantidade de carboidratos, proteínas e triacilgliceróis das larvas. | 64 |
| 4.6 - Efeito das diferentes farinhas na atividade de enzimas digestivas das larvas..... | 66 |
| 4.7 - Efeito inibitório <i>in vitro</i> de extratos de farinha de <i>G. max</i> sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas | 72 |

| | |
|--|------------|
| 4.8 - Isolamento e caracterização do inibidor de proteases cisteínicas da farinha dos cotilédones de <i>G. max</i> | 74 |
| 4.9 - Efeitos dos inibidores de sementes de <i>G. max</i> na atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas in vitro..... | 78 |
| 4.10 - Análise da transcrição das catepsinas L em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto | 80 |
| 4.11 - Silenciamento da catepsina L3 em fêmeas e larvas microinjetadas | 86 |
| 5 - Discussão | 91 |
| 6 - Conclusões | 101 |
| 7 - Referências | 104 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| 1. Adultos e larvas de <i>T. castaneum</i> infestando farinha de trigo..... | 18 |
| 2. Ciclo de vida do <i>T. castaneum</i> a 30° C..... | 19 |
| 3. Mecanismos vegetais de defesa direta e indireta..... | 28 |
| 4. Microscopia de fluorescência do intestino de larvas alimentadas com proteínas das diferentes dietas marcadas com FITC..... | 54 |
| 5. Microscopias representativas de embriões mantidos em diferentes dietas...56 | |
| 6. Sobrevivência de larvas mantidas nas diferentes dietas..... | 58 |
| 7. Análise do tamanho de larvas alimentadas com as diferentes dietas..... | 60 |
| 8. Análise da formação de pupas a partir de larvas mantidas nas diferentes dietas..... | 62 |
| 9. Análise da emergência de adultos a partir de larvas mantidas nas diferentes dietas..... | 63 |
| 10. Estado nutricional de larvas mantidas nas diferentes dietas..... | 65 |
| 11. Atividade de α -amilase em larvas alimentadas com as diferentes dietas...67 | |
| 12. Atividade de proteases serínicas em larvas alimentadas com diferentes dietas..... | 69 |
| 13. Atividade de proteases cisteínicas em larvas alimentadas com diferentes dietas..... | 71 |
| 14. Inibição de proteases do intestino de larvas pelo extrato de <i>G. max</i> | 73 |
| 15. Isolamento de proteínas de cotilédones de <i>G. max</i> com afinidade a papaína..... | 75 |
| 16. Sequência completa do inibidor de tripsina do tipo Kunitz de <i>Glycine max</i> | 77 |
| 17. Inibição de proteases do intestino de larvas pelo inibidor isolado de <i>G. max</i> | 79 |
| 18. Alinhamento dos aminoácidos de catepsinas L de diferentes espécies..... | 81 |
| 19. Análise da transcrição das catepsina L2 em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de <i>T. castaneum</i> | 83 |
| 20. Análise da transcrição das catepsina L1 e catepsina L2 em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos..... | 84 |

| | |
|--|----|
| 21. Análise da transcrição das caatepsinas L1 e catepsina L3 em intestinos de larvas de <i>T. castaneum</i> ao longo do desenvolvimento..... | 85 |
| 22. Contagem de ovos e larvas de fêmeas microinjetadas com dsRNA para a CaTL3 e avaliação do tamanho larval..... | 88 |
| 23. Atividade de proteases cisteínicas no intestino de larvas silenciadas obtidas de fêmeas injetadas com dsRNA para a CaTL3..... | 89 |
| 24. Análise da transcrição das CaTL1 e CaTL3 no intestino de larvas silenciadas obtidas de fêmeas injetadas ou larvas injetadas com dsRNA para a CaTL3..... | 90 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| 1. Tempo de desenvolvimento das diferentes fases de vida do besouro <i>Tribolium castaneum</i> a 30°C..... | 18 |
| 2. Famílias de inibidores de proteases de plantas..... | 30 |
| 3. Quantificação de albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas, triglicerídeos e carboidratos em diferentes farinhas de cotilédones..... | 50 |
| 4. Identificação, por espectrometria de massas, dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise das bandas protéicas 1 e 2 de cotilédones de <i>Glycine max</i> retidas na cromatografia de afinidade a papaína..... | 74 |

Abreviaturas

BCA - ácido bicinconínico

CaTL - catepsina L

DAE - dias após a eclosão

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

DMSO - dimetil sulfóxido

FITC - isotiocianato de fluoresceína

g - gravidade

Gm - *Glycine max*

h - hora

kDa - kilodaltons

µg - microgramas

µL - microlitros

M - molar

mg - miligramas

mL - mililitros

min – minuto

mM - milimolar

mm - milímetro

ng - nanograma

nm - nanômetros

Pv - *Phaseolus vulgaris*

°C - graus Celsius

rpm - rotações por min

Vu – *Vigna unguiculata*

Resumo

Tribolium castaneum é uma praga de grãos estocados que causa grandes perdas econômicas. Sementes são a base da alimentação animal e estima-se que no mundo, inclusive no Brasil, grande parte das sementes coletadas seja perdida durante o armazenamento, principalmente devido ao ataque de insetos. Essas perdas alcançam percentuais de mais de 25%, em países sub desenvolvidos e em desenvolvimento, levando a prejuízos econômicos de milhões de dólares. O uso de inseticidas ainda é o principal método de proteção desses grãos armazenados, porém com eficiência cada vez mais questionada, em função de diversas desvantagens como o aparecimento de insetos resistentes e a contaminação ambiental. Sendo assim, tornam-se imprescindíveis estudos que visem o desenvolvimento de novas técnicas de controle dessas pragas. Neste trabalho demonstramos que diferentes dietas compostas de farinhas de cotilédones de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e diferentes farinhas de trigo interferem diferentemente com o desenvolvimento larval, com a formação de pupas e a sobrevivência de larvas e adultos. Demonstramos também que a atividade de proteases cisteínicas e serínicas foi reduzida quando larvas foram alimentadas com *G. max*, provavelmente pela presença de inibidor de protease nessa semente. Utilizando cromatografia de afinidade foi isolado de sementes de *G. max* uma fração contendo um inibidor capaz de inibir tanto a atividade de proteases cisteínicas como a atividade de proteases serínicas do intestino de larvas de *T. castaneum*. Por RT-PCR demonstramos a presença de uma protease cisteínica (CaTL1) em todos os tecidos, incluindo ovos e pupa enquanto outra protease cisteínica (CaTL3) foi detectada somente no intestino larval. A presença dessas proteases cisteínicas em importantes estágios de vida do inseto indicam que sua inibição pode ter consequências negativas para o desenvolvimento do inseto. Nesse contexto, estes resultados mostram que as alterações de nutrientes da dieta podem interferir com a fisiologia de insetos. Portanto, as mudanças na composição da dieta podem privar os insetos de nutrientes essenciais ou incluir compostos tóxicos podendo ser uma boa estratégia de controle para as pragas de produtos estocados.

Abstract

Tribolium castaneum is a pest of stored foods that causes serious economic losses. Seeds are the basis of animal nutrition and it is estimated that worldwide, including Brazil, most of the collected seeds is lost during storage, mainly due to insect infestation. These losses reach percentage about 25% in under developed and developing countries, leading to economic losses of millions of dollars. The use of insecticides is the major method of protecting these stored grains, but with increasingly questioned efficiency, due to several disadvantages such as the emergence of resistant insects and environmental contamination. Thus, studies become indispensable that aimed at the development of new techniques for controlling these pests. In this work we demonstrated that different diets composed of cotyledons flours from *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* and wheat interfere differently with larval development, pupal formation and survival of larvae and adults. We also showed that the activity of cysteine and serine proteases was reduced when larvae were fed on *G. max*, probably by the presence of protease inhibitor in this seed. By papain affinity chromatography was isolated from *G. max* seed a fraction containing a protease inhibitor able to inhibit both serine and cysteine protease activities from *T. castaneum* gut. By RT-PCR we showed the presence of a cysteine protease (CaTL1) in all insect tissues, including eggs and pupae while another cysteine protease (CaTL3) was detected only in larvae gut. The presence of these cysteine proteases in important life stages of the insect indicates that the inhibition of these enzymes may have negative consequences in the development of insect. Altogether, these results show that changes in dietary nutrients can interfere with insect physiology. Therefore changes in diet composition may deprive insects of essential nutrients or include toxic compounds might be a good control strategy for stored product pests.

1- Introdução

1.1- O besouro *Tribolium castaneum*

Tribolium castaneum, popularmente conhecido como besouro castanho, pertence ao filo Artropoda, classe Hexapoda, ordem Coleoptera e família Tenebrionidae. É de origem Indo-Australiana sendo encontrado principalmente em áreas temperadas, mas pode sobreviver em regiões mais frias, em abrigos aquecidos (Tripathi *et al.*, 2001). Esses besouros têm peças bucais mastigadoras e não picam ou mordem. Podem provocar respostas alérgicas (Alanko *et al.*, 2000), mas não são vetores de nenhuma doença conhecida.

Esse inseto é a principal praga que ataca produtos industrializados como farinhas, cereais, biscoitos, rações e muitos outros utilizados na alimentação humana e animal (Weston e Rattlingourd 2000; Loeck, 2002). Pode ser encontrado em grande número em meio a grãos, mas é incapaz de se alimentar de grãos íntegros, por isso é classificado como uma praga secundária se alimentando de grãos danificados ou quebrados. Eles são atraídos por alimentos com alto teor de umidade e sua infestação propicia o crescimento de fungos. Segundo Lazzari e Lazzari (2009), *T. castaneum* tem preferência por farinhas e farelos (Figura 1), mas pode atacar grande variedade de grãos de cereais e rações animais, especialmente quando estes produtos estiverem previamente deteriorados. É uma espécie que se multiplica rapidamente, apresentando tolerância aos inseticidas comumente empregados, sendo assim uma das primeiras pragas a reinfestar os grãos após tratamento com esses inseticidas (Mariano *et al.*, 2006).

Além de sua importância como praga, o *T. castaneum* é um organismo modelo para o estudo de insetos, tendo seu genoma sequenciado desde 2008 (*Tribolium* - Genome Sequencing Consortium).



Fig. 1 - Adultos e larvas de *Tribolium castaneum* infestando farinha de trigo. As larvas ficam imersas na farinha enquanto adultos ficam imersos ou caminhando pela superfície. Adultos novos são marrom claro e adultos velhos são marrom escuro.

O ciclo de vida de *T. castaneum* é completado a cada 30 dias, dependendo das condições de umidade, temperatura e disponibilidade de alimento (Tabela 1 e Figura 2). A cópula ocorre logo após a emergência da pupa para adulto. Uma fêmea é capaz de produzir uma média de 20 ovos por dia, sendo que o número de ovos produzidos depende principalmente da quantidade de alimento disponível (Bucher, 2006). Os ovos são depositados diretamente na farinha ou outros alimentos e cerca de 80% deles são viáveis, levando em torno de 3,6 dias para eclodir a 30 °C. Os ovos são pequenos, medindo aproximadamente 0,6 mm de largura por 0,3 mm de comprimento, claros e recobertos por substância viscosa (Robinson, 2005; Bucher, 2006). O estágio larval possui de 5 a 9 instares dependendo das condições de crescimento, sendo que em condições normais ocorrem 6 instares. O desenvolvimento larval é influenciado diretamente por disponibilidade de alimento, temperatura e umidade. As larvas são branco-amareladas, cilíndricas, chegando a medir até 6 mm de comprimento. Elas apresentam o aspecto típico de larva-aramé e não possuem mandíbulas muito resistentes (Gallo *et al.*, 2002). É na fase larval que essa espécie consome maior quantidade de alimento (Lorini, 2002). As pupas são formadas e abrigadas nos locais de infestação e esse estágio dura um período de 4-6 dias. Os adultos medem em torno de 3,5 mm, são de coloração marrom avermelhado e a expectativa de vida desta espécie é de até três anos (Bucher, 2006).

Tabela 1 - Tempo de desenvolvimento das diferentes fases de vida do besouro *Tribolium castaneum* a 30°C. Adaptado de Bucher, 2006.

| Embriogênese (dias) | Eclosão (%) | Larva (dias) | Mortalidade de larvas (%) | Pupa (dias) | Período total de desenvolvimento (dias) |
|---------------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|---|
| 3,6 | 88 | 17,2 | 3 | 5,5 | 27 |

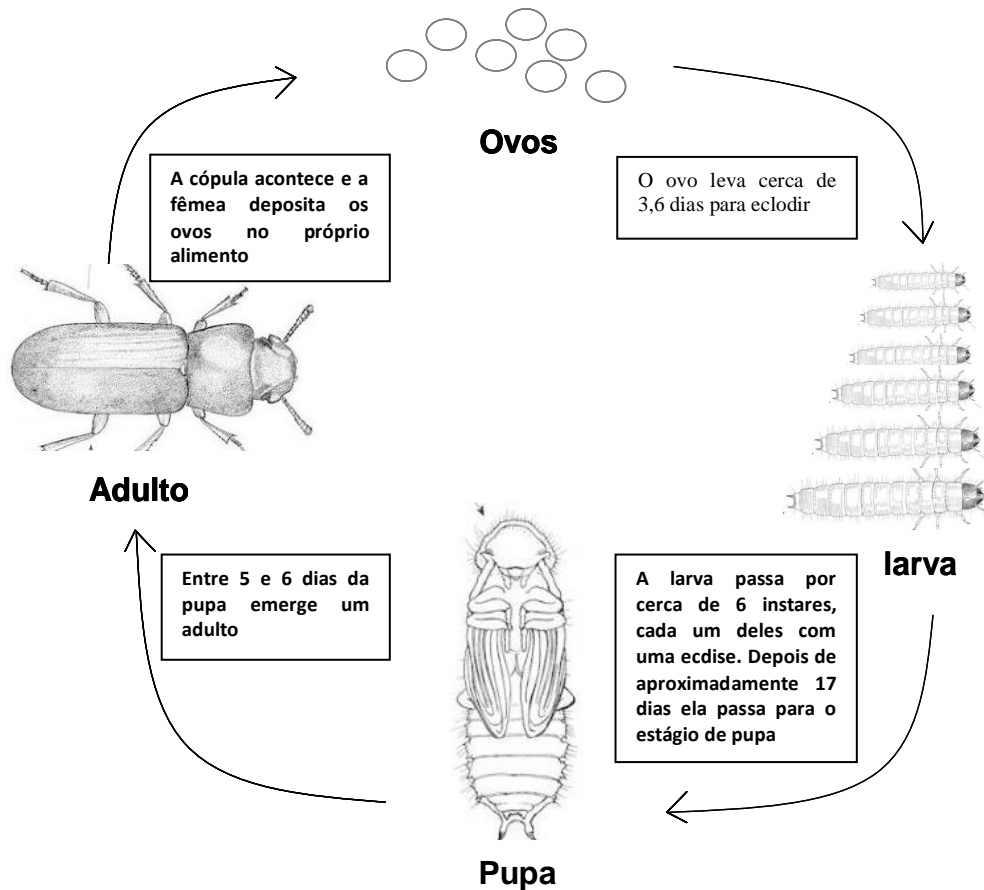


Fig. 2 – Esquema do ciclo de vida do *T. castaneum* a 30° C. Quatro fases compõem o ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio larval é dividido entre 5 e 9 instares, de tamanhos diferentes, ocorrendo uma muda entre cada instar.

1.2 - Sistema digestório de insetos

O canal alimentar dos insetos é formado por uma camada de epitélio simples com uma camada acelular de lâmina basal voltada para a hemocele. Este canal se divide em três regiões: intestino anterior, geralmente envolvido

com a ingestão, condução e estoque de alimento; médio, onde ocorre a digestão e absorção; e intestino posterior, envolvido com a excreção e eliminação do material não digerido, proveniente do intestino médio e túbulos de Malpighi (Chapman, 1998). Em algumas espécies de besouros existem grandes diferenças entre o sistema digestório de larvas e adultos, devido a diferenças de hábitos alimentares nas duas fases. No caso do *T. castaneum* não existem grandes diferenças entre estes estágios já que sua alimentação é a mesma (Ameen e Rahman, 1973).

A digestão nos insetos é dividida em três fases: inicial, intermediária e final. A digestão inicial consiste na degradação de polímeros presentes no alimento em moléculas oligoméricas através da ação de hidrolases, tais como: amilases, celulasas, hemicelulasas e proteases. Durante a digestão intermediária, os oligômeros resultantes da digestão inicial continuam sendo hidrolisados por polímerohidrolases, como amilases ou oligômero-hidrolases como aminopeptidases. Os produtos resultantes são dímeros tais como maltose, celobiose e dipeptídeos derivados. Os dímeros na digestão final são clivados em monômeros pelas dímero-hidrolases, exemplificadas pela maltase, celobiase e dipeptidase (Terra e Ferreira, 2005).

As digestões inicial e intermediária das cadeias de glicogênio são realizadas pela α -amilase e a digestão final ocorre com a ação das α -glicosidases (Terra e Ferreira, 2005). Morris *et al.* (2009) mostraram, através de análises de proteoma e transcriptoma do intestino de larvas, o nível de expressão de proteínas nesse tecido. Neste trabalho foi observada uma alta expressão de α -amilase. Assim como a *Drosophila melanogaster*, o *T. castaneum* possui duas isoformas dessa enzima. Elas possuem massa molecular bastante parecido e a de menor massa molecular tem atividade predominante (Chen *et al.*, 1992). Vários trabalhos, em insetos, demonstram que houve variação na atividade da α -amilase de acordo com a dieta (Nathan, 2013; Carlini e Grossi-se-Sá, 2002) A atividade dessa enzima foi aumentada quando a alimentação de adultos de *T. castaneum* foi suplementada com extrato de levedura, sendo que esse aumento não foi dose dependente (Wool *et al.*, 1986).

As proteases atuam na digestão inicial de proteínas e podem diferir na especificidade em relação à proteína alvo (substrato), sendo agrupadas de

acordo com o grupo presente no sítio catalítico principal nas subclasses, podendo este ser um aminoácido nas proteases serínica, cisteínica e aspartíca ou um metal nas metaloproteínas. O conjunto de proteases digestivas em coleópteros da família Tenebrionidae é bastante complexo e inclui cisteíno-proteases (catepsinas L e B), serino-proteases (tripsinas e quimiotripsinas) e aspartato-peptidases (catepsinas D) (Terra e Cristofolletti, 1996; Johnson e Rabosky, 2000; Prabhakar *et al.*, 2007).

As cisteíno-proteases compreendem um complexo grupo, de variadas propriedades físicas e bioquímicas. Estão distribuídas em 44 famílias podendo ser encontradas em bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos (Grzonka *et al.*, 2001; Barrett *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2006).

As catepsinas são as cisteíno-proteases de maior importância envolvidas na digestão em coleópteros (Vinokurov *et al.*, 2009). No genoma de *T. castaneum* é encontrado um total de 25 sequências de catepsinas L e B (Tribolium Genome Sequencing Consortium). Estudos usando transcriptoma confirmaram uma alta expressão dessas proteases no intestino, principalmente de catepsinas L, seguidas das catepsinas B (Morris *et al.*, 2009). Alguns desses genes são expressos exclusivamente em estágios onde não há alimentação, como é o caso de ovos e pupas. Outros deles são expressos exclusivamente em estágios alimentares, podendo ser encontrados somente no intestino. Isso indica que algumas dessas enzimas possuem papel somente na digestão de alimentos e outras em outros processos, como por exemplo na ecdise. Fonseca *et al.* (2012) caracterizaram uma catepsina L em *Sphenophorus levis*, um besouro de cana de açúcar, e observaram uma alta expressão do gene no intestino dessas larvas e uma baixa expressão em outros tecidos ou estágios de desenvolvimento. Em *Tenebrio molitor* foi demonstrada a transcrição diferencial de três diferentes catepsinas L, sendo uma delas transcrita exclusivamente no intestino (Cristofolletti *et al.*, 2005).

Já foram demonstrados diversos papéis para essas proteases além da digestão. Foi demonstrada uma alta expressão da catepsina L associada a ecdise e metamorfose em *Delia radicum*, sugerindo seu papel no remodelamento tecidual (Hegedus *et al.*, 2002). Em *Helicoverpa armigera* a expressão de uma catepsina L aumenta em larvas durante a ecdise (Wang *et al.*, 2010) e possui um importante papel na degradação da cutícula durante

esse processo (Liu *et al.*, 2006). Também tem sido demonstrado seu papel durante o desenvolvimento embrionário (Kageyama e Takahashi, 1990; Takahashi *et al.*, 1992; Yamamoto e Takahashi, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994) e na reprodução (Matsumoto *et al.*, 1997).

Além das diversas funções já atribuídas a catepsinas L, tais enzimas também podem ter um papel na adaptação a diferentes alimentos. A análise do transcriptoma do intestino de insetos sugere que existe aumento ou redução dessas proteases em resposta a diferentes alimentações (Zhu-Salzman *et al.*, 2003; Bown *et al.*, 2004). A complexidade do padrão da expressão de proteases digestivas presentes no intestino desses insetos fornece uma grande adaptação ao ambiente ao qual ele está sendo exposto. Oppert *et al.* (2005) demonstrou que quando larvas de *T. castaneum* foram alimentadas com inibidores de protease cisteínica aumentam a expressão de proteases serínicas de forma compensatória e quando as larvas foram alimentadas com inibidores para protease cisteínica e serínica essa compensação foi abolida. Além disso foi visto que houve um aumento da expressão de catepsina L quando larvas foram alimentadas com E-64, um inibidor de proteases cisteínicas (Oppert *et al.*, 2010).

Apesar de menos transcritas que as proteases cisteínicas, as proteases serínicas também possuem diversas funções fisiológicas durante o crescimento e desenvolvimento de coleópteros. Além de sua função durante a digestão, que é mais bem caracterizada, essas proteases também, participam de processos como ecdise, metamorfose, melanização e expressão de peptídeos antimicrobianos (Kanost *et al.*, 2004; Law *et al.*, 1977; Neurath, 1984; Srinivasan *et al.*, 2006). Assim como as proteases cisteínicas, algumas dessas proteases são expressas exclusivamente em fases alimentares e outras não. Foi demonstrado que o silenciamento de uma quimiotripsina em larvas de *T. castaneum* promoveu problemas na ecdise entre as fases larva-pupa e pupa-adulto, mostrando seu papel além da digestão (Broehan *et al.*, 2010). A administração oral de microRNA específicos para uma tripsina em *H. armigera* promoveu grande impacto no crescimento larval, na sobrevivência e fecundidade.

Assim como em outros insetos, o estado nutricional é de grande importância para o bom desenvolvimento de *T. castaneum*, sendo que algumas

fases são particularmente dependentes de uma maior quantidade de alimentos. Dados da literatura mostram que para que ocorra a oviposição a fêmea necessita se alimentar de farinha de grãos integrais. A quantidade de ovos postos decai grandemente se as fêmeas se alimentarem somente de farinha feita apenas com o endosperma da semente (farinha branca). A oviposição volta ao normal quando as fêmeas são colocadas novamente em farinha integral. Outra fase bastante dependente do estado nutricional é a fase larval, sendo que é nessa fase em que o besouro mais consome alimentos (Robinson, 2005).

O intestino anterior da larva do *T. castaneum* é dividido em duas partes, faringe e esôfago. O intestino médio é um tubo simples, sem criptas regenerativas. O intestino grosso é dividido em câmara pilórica, íleo e reto. No besouro adulto o intestino anterior é diferenciado em faringe, esôfago e papo. O intestino grosso, assim como na larva, é dividido em câmara pilórica, íleo e reto. A superfície externa do intestino (voltada para o lumen) possui vilosidades devido a presença de criptas regenerativas. A célula epitelial do intestino anterior é sincicial em ambas as fases, larva e adulto. O epitélio do intestino médio é formado por células colunares altas com células regenerativas espalhadas no epitélio. Em ambos os estágios, uma matriz peritrófica está presente no intestino.

A matriz ou membrana peritrófica (MP) é a camada acelular que envolve o bolo alimentar, separando-o do epitélio do intestino médio. Esta é composta por proteínas, proteoglicanos e quitina, sendo que, a quitina pode chegar a constituir 13% do total dessa estrutura. A matriz peritrófica protege o epitélio intestinal de toxinas, do estresse oxidativo e de microorganismos, além de manter a compartimentalização de enzimas digestivas (Chapman, 1998; Merzendorfer, 2006). O epitélio do intestino posterior é do tipo sincicial assim como no intestino anterior, em ambos os estágios. Na extremidade distal os túbulos de Malpighi se associam com a parede do reto (Ameen and Rahman, 1973).

O intestino do *T. castaneum* possui dois compartimentos com diferentes pHs e atividade de proteases. O intestino médio anterior possui um pH levemente mais ácido (5,6 – 6,0), onde predomina a atividade de cisteíno proteases enquanto o intestino médio posterior é levemente mais alcalino (7,0

– 7,5), com uma atividade um pouco mais pronunciada de serino proteases. Entre os dois compartimentos existe um terceiro pH intermediário (6,0 – 7,0), indicando a existência de um gradiente de pH ao longo de todo o intestino. Estima-se que 80% da atividade proteolítica no intestino seja de cisteíno proteases (Vinokurov *et al.*, 2009).

1.3 - Controle do *T. castaneum*

Grande parte da dieta em todo mundo consiste de cereais e sementes de leguminosas. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), 70% da alimentação humana consiste desses cereais e leguminosas e os outros 30% de animais que também consomem esses vegetais. Além disso, sementes de leguminosas representam uma importante fonte alimentar de populações de baixa renda de países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento (Moura *et al.*, 2007). As perdas médias de grãos por ataque de pragas, no Brasil, estimadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela FAO, indicam valores de, aproximadamente, 10% do total produzido anualmente. Isso representa cerca de 10 milhões de toneladas de grãos/ano (<http://www.agronline.com.br/artigos/manejo-integrado-pragas-graos-armazenados-dentificacao-controle>). O trigo, um dos cereais mais cultivados em todo o mundo, é um dos principais alimentos do besouro *T. castaneum*. As perdas durante a estocagem do trigo por infestações de insetos são estimadas em torno de 10 a 15% (Ahmad, 1980).

Os métodos físicos, como controle de temperatura, umidade, composição da atmosfera, uso de pós inertes, remoção física, radiação, luz e som, eram as principais formas de proteção de grãos antes do extensivo uso de agentes químicos sintéticos (inseticidas). Na atualidade os inseticidas são os mais utilizados e são classificados em preventivos ou curativos. Os preventivos são geralmente na forma líquida e aplicados antes da infestação das pragas; já os curativos são aplicados, geralmente na forma de gás, sobre os grãos após a infestação de pragas (Lorini, 1998). Os inseticidas apresentam vantagens, como o amplo espectro de ação, rapidez de controle, persistência

no meio e facilidades de emprego. Contudo, os efeitos adversos do uso indiscriminado desses compostos têm provocado o aparecimento de biótipos resistentes, fazendo com que o agricultor utilize dosagens cada vez maiores sem obter resultado satisfatório (Siqueira *et al.*, 2000). Apesar de sua significativa contribuição para a produção agrícola, o uso intensivo e indiscriminado destes produtos favoreceu o surgimento de pragas secundárias e não conseguiu eliminar os problemas já existentes; além disso, são altamente tóxicos, sendo prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (Lorini, 1998).

A resistência aos inseticidas está aumentando mundialmente e constitui um dos maiores problemas de controle de pragas na atualidade. Ainda na década de 90 já existiam documentadas 447 espécies de insetos e de ácaros que desenvolveram resistência a um ou mais tipos de inseticidas (Roush e Tabashnik, 1990). No Brasil já foram encontradas populações de *T. castaneum* resistentes aos inseticidas pirimifosmetil, malation, fenitrothion e fosfina (Sartori *et al.*, 1990; Pacheco *et al.*, 1990). Pimentel *et al.* (2010) demonstraram que, dentre 13 populações do *T. castaneum*, 3 eram 100% resistentes ao inseticida fosfina, amplamente utilizado para a fumigação de grãos.

Dessa forma, produtos naturais provenientes de plantas podem ser uma alternativa ao controle de pragas. Neste contexto insere-se a utilização de extratos de plantas, popularmente conhecidas como contendo atividade inseticida (Guerra, 1985), bem como estudo de seus componentes ativos no controle de insetos nocivos. Óleos essenciais de origem vegetal e seus principais componentes, muitos deles monoterpenos, tem chamado a atenção de vários pesquisadores para sua eficiência como agentes controladores de pragas, devido a sua ação inseticida, repelente e/ou anti-alimentar (Stamopoulos, 1991; Shaaya *et al.*, 1997).

Jbilou *et al.* (2008) testaram o efeito do extrato alcoólico de 7 diferentes plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae sobre o desenvolvimento larval do *T. castaneum*. Dentre as 7 espécies, em uma delas foi utilizada a semente para a preparação do extrato, nas demais foram utilizadas as folhas. Neste trabalho foi demonstrado que quando os extratos eram misturados na concentração de 10% na dieta da larva elas sofriam uma redução no peso e aumento na mortalidade. Diversos outros trabalhos têm demonstrado o efeito inseticida ou repelente de extratos ou óleos essenciais vegetais sobre *T. castaneum* (Liu *et*

al., 2011; Zhang *et al.*, 2011; Ukeh e Umoetok, 2011). Esses estudos demonstraram a ação tóxica de componentes de tecidos vegetais contra este besouro.

Meios alternativos de controle de insetos são também necessários por causa de preocupações ambientais e efeitos negativos provocados pelo uso desses inseticidas sobre insetos benéficos como polinizadores e insetos insetívoros (Lewis *et al.*, 1997).

1.4 – Mecanismo de defesa de Plantas

Na natureza, pragas devastadoras raramente ocorrem, apesar da presença abundante de insetos herbívoros. Isto se deve a uma multiplicidade de defesas que as plantas podem usar para se proteger contra esses insetos. Embora aparentemente indefesas frente ao ataque desses agressores ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. O mecanismo de defesa de plantas contra patógenos e herbívoros envolve uma variedade de respostas (Smith e Clement, 2012).

Essa grande variedade de mecanismos de defesa foram moldadas ao longo da evolução por pressões evolutivas. As diferenças na seleção natural resultaram na presença de populações de plantas com diferentes níveis de resistência, que vão desde espécies altamente susceptíveis, até àquelas totalmente resistentes para algumas espécies de herbívoros (Ranger *et al.*, 2007; Murugan *et al.*, 2010).

Estima-se que a grande maioria das espécies de plantas resistentes encontradas na natureza não é domesticada, sendo por isso raramente utilizadas na agricultura. Entretanto essas plantas podem ser usadas para estudos que visem a identificação de genes relacionados a essa resistência. O desenvolvimento de técnicas moleculares associadas ao estudo do genoma dessas espécies pode propiciar o desenvolvimento futuro de espécies cultivadas mais resistentes. Um exemplo de diferença no grau de resistência de

diferentes espécies foi demonstrado por Belchol e Teixeira (2007). Nesse trabalho foi testada a preferência alimentar do *T. castaneum* pelo milho, trigo e soja. As larvas mantidas na farinha de soja tiveram um crescimento grandemente reduzido em comparação às larvas da farinha de trigo ou milho. O número médio de descendentes também foi grandemente reduzido quando os besouros foram mantidos em farinha de soja. Isso demonstra que possivelmente a soja possui substâncias tóxicas ou anti digestivas para *T. castaneum*. Outro exemplo foi demonstrado por Bostam e Naeem (2002) onde foram testadas a resistência entre seis diferentes cultivares de trigo ao *T. castaneum*. Nesse último trabalho foi demonstrado que existe entre eles uma grande diferença na suscetibilidade ao *T. castaneum* entre cultivares de uma mesma espécie.

O elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas contra pragas e agentes patogênicos é composto de barreiras físicas ou químicas podendo atuar de três formas: uma delas é a resistência induzida localizada, que é ativada no ponto onde ocorre a agressão; a resistência sistêmica adquirida, que protege as demais partes da planta (diferentes do local de ataque), contra ataques subsequentes; e uma terceira que é a resistência constitutiva, formada por estruturas e compostos que já se encontram presentes ou depositados no tecido ou órgão, mesmo sem a ação prévia de agentes agressores (Broekgaarden *et al.*, 2011). As defesas constitutivas tornam as plantas não susceptíveis aos predadores, independente do prévio contato com eles (Macedo *et al.*, 1993; Broekgaarden *et al.*, 2011). Destacam-se como estruturas físicas de defesa pêlos, espinhos, tricomas, bem como a presença de ceras recobrando principalmente a superfície de folhas, caules e frutos. Nas sementes além dessas estruturas, o próprio tegumento, através de sua rigidez e espessura desempenha também função de barreira física de defesa (Bowles, 1990). Entre os arsenais químicos de defesa estão compostos do metabolismo secundário como terpenos, fenóis, alcalóides e do metabolismo primário, como proteínas e peptídeos de defesa.

A resistência de plantas pode ainda ser classificada como um mecanismo direto ou indireto (Schoonhoven *et al.*, 2005). A defesa direta envolve características físicas ou químicas presentes na planta que interferem diretamente na capacidade de desenvolvimento do agressor. Para insetos, por

exemplo, destaca-se a interferência na oviposição, penetração ou desenvolvimento do herbívoro. Esse tipo de defesa é destacado como um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da resistência contra insetos (Figura 3). A defesa indireta envolve mecanismos químicos ou físicos capazes de atrair predadores naturais dos agressores. Substâncias voláteis atrativas de tais predadores são tidas como os principais componentes desse tipo de defesa (D'Alessandro e Turlings, 2006).

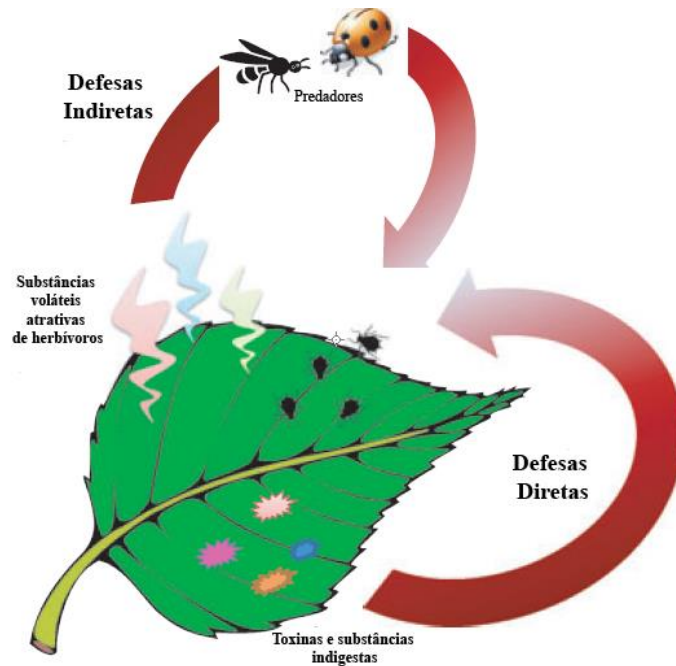


Fig. 3 – Esquema dos mecanismos de defesa direta e indireta de plantas. A defesa indireta envolve mecanismos químicos ou físicos. A defesa direta envolve características físicas ou químicas presentes na planta. Adaptado de Broekgaarden *et al.* (2011).

Os mecanismos de defesa direta comprometem negativamente a preferência (seleção de plantas hospedeiras, oviposição e comportamento alimentar) e/ou performance (crescimento, desenvolvimento e sucesso reprodutivo) de herbívoros em determinadas espécies resistentes, resultando em um maior sucesso da planta em um ambiente hostil (Howe e Schaller, 2008).

Dentre os órgãos e tecidos das plantas, as sementes se destacam dentre os órgãos preferenciais ao ataque de uma grande diversidade de insetos. A riqueza nutricional baseada em reservas proteicas, lipídicas e glicídicas faz das sementes uma importante fonte de alimento para animais,

incluindo o homem, e também para os insetos praga. As sementes maduras por se apresentarem em estado de quiescência dependem exclusivamente de defesas constitutivas, sendo dessa forma, uma importante fonte para o estudo da defesa constitutiva. Entre os componentes da defesa constitutiva de sementes estão proteínas de reserva (vicilinas e albuminas), quitinases, glucanases, peptídeos antimicrobianos e diferentes inibidores de amilases e proteases.

1.5 - Inibidores de proteases e seus efeitos no desenvolvimento de insetos

Inibidores de proteases são moléculas que tem a capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas. Esses inibidores formam um complexo estável com as proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (Macedo *et al.*, 2007). Eles estão presentes na maior parte dos organismos vivos e desempenham diversas funções, como a regulação da proteólise de enzimas endógenas e exógenas. Aproximadamente 1 a 10% do total de proteínas presentes em plantas são inibidores de protease que podem atuar por exemplo reduzindo os danos causados por insetos (Xavier-Filho, 1992; Ryan, 1991; Solomon *et al.*, 1999; Ussuf *et al.*, 2001; Lawrence e Koundal, 2002).

Inibidores de protease de plantas têm sido estudados a um longo tempo. Esses estudos tiveram início quando foi percebido que larvas de alguns insetos não conseguiam se desenvolver em produtos derivados de soja (Mickel e Standish, 1947). Um dos primeiros inibidores a ser isolado e cristalizado foi um inibidor de protease serínica de sementes de soja chamado de Kunitz no ano de 1945 (Kunitz, 1945).

Os inibidores de proteases geralmente são proteínas pequenas ou peptídeos que estão principalmente em tecidos de reserva como raízes ou sementes, mas podem ser encontrados em outros tecidos da planta. Eles comportam-se como pseudosubstratos enzimáticos com especificidade variada. (Tscheche, 1974; Laskowski e Kato, 1980; Richardson, 1991). Eles podem inibir somente uma enzima de uma determinada classe, podem ter atividade contra várias enzimas de uma classe ou de classes diferentes e

outros podem ainda inibir proteases de diferentes origens como, por exemplo, vegetal e microbiana.

Baseado na homologia da estrutura primária, localização das pontes dissulfeto e posição de aminoácidos presentes nos sítios de ligação, os inibidores de proteases de plantas têm sido agrupados em famílias distintas. Estas famílias podem diferir em peso molecular, conteúdo de pontes dissulfeto, estrutura tridimensional e agentes que causem desnaturação (Macedo *et al.*, 2007) (Tabela 2).

Tabela 2 - Famílias de inibidores de proteases de plantas (Retirado de Migliolo, 2008).

| Proteases | Classe | Família de Inibidores |
|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Serínicas | Inibidores de proteases serínicas | Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de cereais Taumatina |
| Cisteínicas | Inibidores de proteases cisteínicas | Fitocistatinas |
| Aspárticas | Inibidores de proteases aspárticas | Inibidores de proteases aspárticas |
| Metalo-proteases | Inibidores de metalo-proteases | Inibidores de carboxipeptidases A e B |

Vários estudos têm investigado inibidores de carboidrases e proteases como candidatos e/ou ferramentas para o controle de pragas. Inibidores de diversas proteases como tripsina e/ou quimiotripsina, de catepsinas D e L e papaína têm sido purificados de leguminosas e cereais (Suh *et al.*, 1991; Mares *et al.*, 1989; Strukelj *et al.*, 1992; Valueva *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1994) e utilizados como potenciais meios de controle de insetos. A redução da

atividade de proteases cisteínicas e serínicas pode levar a uma mudança drástica nos parâmetros de crescimento do inseto.

Estudos mostraram a presença desses inibidores em sementes de leguminosas, incluindo *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*. Alguns desses inibidores já foram caracterizados como potencialmente tóxicos contra insetos. Um inibidor de protease cisteínica de sementes de *G. max* foi incorporado na dieta de *C. maculatus* e foi capaz de atrasar o desenvolvimento larval (Koiwa *et al.*, 1998). Um inibidor de tripsina também de sementes de *G. max* foi capaz de reduzir o crescimento de *Helicoverpa armigera* (Johnston *et al.*, 1993). Ainda em sementes de *G. max* foi isolado um inibidor do tipo Kunitz que reduziu significativamente o peso de larvas de *Mamestra brassicae* quando incorporados à dieta a uma concentração de 0,5% (Chougule *et al.*, 2008). Um inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* causou grande redução no peso e sobrevivência larval de *Ephestia kuehniella* (Macedo *et al.*, 2010).

Um inibidor de proteases serínicas de *V. unguiculata* causou redução no peso larval, aumentou a mortalidade e modificou as células do epitélio intestinal quando foi incorporada na dieta de *Anthonomus grandis* (Franco *et al.*, 2003). Uma cistatina recombinante de *V. unguiculata*, um inibidor de protease cisteínica, causou uma redução significativa no peso larval e aumentou a mortalidade de adultos de *Acanthocelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (Aguiar *et al.*, 2006).

Inibidores de proteases serínicas e cisteínicas também já foram descritos em sementes de plantas do gênero *Phaseolus* (Galasso *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010). Um inibidor de protease serínica do tipo Bowman-Birk de *Phaseolus coccineus* demonstrou uma alta inibição à enzima do tipo tripsina do intestino de *Hypothenemus hampei* (Pereira *et al.*, 2007).

A combinação de inibidores de protease serínica e cisteínica administrada na dieta de *T. castaneum*, teve efeito deletérico sinérgico no crescimento larval (Oppert *et al.*, 1993). Outros estudos têm demonstrado que a combinação de inibidores previne uma resposta adaptativa de larvas (Oppert *et al.*, 2003; Oppert *et al.*, 2005). Uma combinação de três inibidores (inibidor recombinante de protease cisteínica de *G. max*, inibidor de protease aspártica e inibidor de *G. max* do tipo Kunitz), incorporada na dieta de *C. maculatus*,

aumentou seu tempo de desenvolvimento quando comparada à administração dos inibidores isolados (Amirhusin *et al.*, 2007).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de dietas contendo farinhas de sementes de trigo, *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* sobre o desenvolvimento do besouro *T. castaneum*.

2.2 - Objetivos específicos e metas

- Avaliar a ingestão de farinhas de cotilédones de sementes de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* por larvas de *T. castaneum*;
- Avaliar a toxicidade das farinhas de cotilédones de sementes de trigo, *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* sobre o desenvolvimento embrionário de *T. castaneum*;
- Avaliar a toxicidade das farinhas sobre o desenvolvimento larval, formação de pupas, emergência de adultos e sobrevivência;
- Avaliar os efeitos das farinhas sobre o estado nutricional das larvas;
- Avaliar o efeito da alimentação com as diferentes dietas sobre a atividade de α -amilase, proteases serínicas e proteases cisteínicas das larvas;
- Isolar e caracterizar inibidores de proteases de cotilédones de *G. max*;
- Avaliar a inibição *in vitro* de proteases do intestino de larvas por inibidor(es) isolado(s) de *G. max*;
- Avaliar a transcrição das proteases cisteínicas do tipo catepsina L1, catepsina L2 e catepsina L3 em ovos, larvas e pupas do inseto;
- Realizar o silenciamento através de RNA de interferência da catepsina L encontrada somente no intestino de larvas;

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Obtenção das sementes e farinhas

Sementes de *Vigna unguiculata* (cv. fradinho), *Phaseolus vulgaris* (cv vermelho) e *Glycine max* (marca PV produtos naturais) foram obtidas comercialmente. As sementes foram armazenadas a -20°C por 3 dias, posteriormente foram descascadas e os cotilédones triturados para a obtenção das farinhas que foram peneiradas em peneira de 0,3 mm. Farinhas de trigo (*Triticum aestivum* L) foram obtidas comercialmente de 4 diferentes produtores e denominadas trigo 1, 2, 3 e 4 (T1, T2, T3 e T4). As farinhas de trigo foram mantidas a -70 °C por 12 horas e subsequentemente mantidas a 60°C por 12 horas para esterilização. Antes do uso, as farinhas foram colocadas a temperatura ambiente e peneiradas em peneira de 0,3 mm.

3.2 - Manutenção da colônia de *T. castaneum*

Os besouros foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de química e função de proteínas e peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense em estufa a 30° C com umidade relativa de 70%. Larvas e adultos foram mantidos em farinha de trigo 1. Para obtenção de ovos os adultos foram colocados em farinha de trigo branca e deixados por 24 horas. Após esse período os adultos foram retirados e a farinha foi peneirada em peneira de 0,3 mm para a retenção dos ovos. Os ovos de 0-24h de idade foram utilizados nos ensaios descritos abaixo.

3.3 - Avaliação da composição proteica, lipídica e glicídica das farinhas

3.3.1 - Quantificação de proteínas nas diferentes farinhas

Proteínas de farinhas das diferentes sementes foram separadas nas diferentes classes: albumina, globulina, prolamina e glutelina. Para obter a fração de albumina, as farinhas foram homogeneizadas em água na proporção de 1:10 (peso/volume) durante 30 min a 4 °C e centrifugadas a 12.000 X g por 15 min. O sobrenadante constituiu a fração de albuminas e o sedimento foi

usado para o isolamento das globulinas. O sedimento foi homogeneizado em fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,6 na proporção de 1:10 (peso/volume) durante 30 min a 4 °C e centrifugado a 12.000 X g por 15 min para obtenção do sobrenadante (globulinas). A fração de prolaminas foi extraída pela homogeneização do sedimento em etanol 70% na proporção de 1:10 (peso/volume) durante 30 min a 4 °C e centrifugadas a 12000 X g por 15 min. O sobrenadante (prolamina) foi reservado e o sedimento foi homogeneizado em NaOH 0,1 M na proporção de 1:10 (peso/volume) por 30 min a 4 °C e centrifugadas por 12.000 X g por 15 min. O sobrenadante obtido foi denominado como glutelina. A quantificação de proteínas de cada fração foi determinada de acordo com o método de Smith *et al.* (1985) usando ácido bicinconínico (BCA). As amostras foram adicionadas ao reagente de BCA (sigma) e incubadas a 37 °C por 30 min. As absorbâncias foram lidas em leitor de placas a 560 nm. Para a determinação da concentração foi utilizada uma curva de albumina sérica bovina pura (BSA).

3.3.2 - Quantificação de triglicerídeos nas diferentes farinhas

A quantificação de triglicerídeos livres foi feita usando o kit Triglicérides 120 (Doles), seguindo as recomendações do fabricante. As farinhas (3 mg) foram diluídas em 100 µl de Tween 0,05%, agitadas por 1 h a temperatura ambiente e centrifugadas a 2.000 X g por 5 min (Hildebrandt *et al.*, 2011). Uma alíquota de 25 µl do sobrenadante foi usada em cada dosagem. As absorbâncias foram lidas a 510 nm em espectrofotômetro. A concentração foi determinada usando uma curva de glicerol como padrão.

3.3.3 - Quantificação de carboidratos nas diferentes farinhas

As farinhas (3 mg) foram dissolvidas em 100 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8, agitadas por 1 h a 4°C e centrifugadas a 2.000 X g por 5 min. A determinação da concentração de carboidratos foi realizada através da metodologia descrita por Miller (1959), com modificações. Para a realização do ensaio foi preparado um reativo de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Uma

alíquota de 25 µl do sobrenadante foi adicionada a 200 µl de DNS e fervida por 5 min. Depois da fervura foram adicionados 200 µl de água em cada amostra, as quais foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. As concentrações foram calculadas a partir de uma curva padrão de maltose.

3.4 – Avaliação do desenvolvimento embrionário do *T. castaneum* mantido nas diferentes dietas - Fixação de embriões e marcação com DAPI

Ovos de 0-24 horas foram colocados nas diferentes farinhas na concentração de 100%. Foram fixados ovos de 0-24 horas mantidos na farinha de trigo 1 e ovos de 24-48, 48-72 horas mantidos nas farinhas de trigo 1, *G. max*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. Para a fixação os ovos foram lavados em cloro comercial (2-2,5% de hipoclorito de sódio) por 3 min, seguido de repetidas lavagens com água. Depois de lavados os ovos foram transferidos para um recipiente contendo a solução de fixação (3,8 ml de PBS, 1,2 ml de formaldeído 37% e 5 ml de heptano). Os ovos em solução fixadora foram agitados em plataforma rotatória por 1 h a 220 rpm. Depois da fixação a fase contendo PBS e formaldeído (fase inferior) foi removida, foram adicionados 5 ml de metanol e a mistura foi agitada vigorosamente. Os embriões precipitados foram retirados e lavados 3 vezes com metanol. Para a visualização da morfologia os embriões foram marcados com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Inicialmente os embriões foram reidratados com PBST (PBS contendo 0,1% de Tween 20) e incubados com DAPI na concentração de 1 mg/ml por 5 min. Os embriões foram lavados 3 vezes com PBST para retirar o DAPI não ligado. Os embriões foram então colocados em glicerol 70%, transferidos para lâminas e visualizados por microscopia de fluorescência com filtro de excitação a 405 nm.

3.5 – Avaliação da ingestão das diferentes farinhas marcadas com FITC pelas larvas de *T. castaneum*

Proteínas totais solúveis de cotilédones de sementes de *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max* foram extraídas usando fosfato de sódio 0,1M acrescido de NaCl 0,15 M pH 7,0 por 1 h a 4°C. A mistura foi centrifugada a 340 X g por 5

min. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Uma solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (50 mg/ml em dimetilsulfóxido) foi adicionada ao sobrenadante em uma relação de 1 µg de FITC para 110 µg de proteína e agitadas por 16h a 4°C. O FITC que não se ligou às proteínas foi removido por diálise contra água destilada durante 24h a 4°C. A solução resultante foi liofilizada. As proteínas marcadas com FITC foram misturadas com farinha de trigo 2 (não marcada com FITC) numa proporção de 50%. Ovos de 0-24 h foram colocados nessa mistura e 21 DAE (dias após a eclosão) o intestino de larvas foi dissecado e visualizado por microscopia de fluorescência. Para o controle, ovos foram colocados somente em farinha de trigo 2 (não marcada com FITC).

3.6 - Efeito das diferentes farinhas na sobrevivência, desenvolvimento larval, formação de pupas e adultos

Para a avaliação do desenvolvimento larval, ovos de 0-24h foram colocados nas farinhas de trigo, *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max* em diferentes concentrações (descritas abaixo). A sobrevivência de larvas foi avaliada 11 e 17 dias após a eclosão (DAE) através da contagem de larvas vivas. O percentual de sobrevivência foi calculado a partir do número de ovos inicial que foi de 100 ovos. A análise do tamanho de larvas foi realizada 11 e 17 DAE usando o programa ImageJ. O total de larvas medidas (incluindo os três experimentos) foi: 11 DAE (n T1=178; T2=141; T3=156; T4=123; Gm 50%=100; Gm 100%=100; Vu 50%=100; Vu 100%=85; Pv 50%=100; Pv 100%=25). 17 DAE (n T1=169; T2=125; T3=148; T4=100; Gm 50%=100; Gm 100%=100; Vu 50% =78; Vu 100%= 81; Pv 50%= 85). As pupas formadas foram contadas a cada 4 dias e transferidas para um novo recipiente até as larvas completarem 58 DAE. Os adultos emergidos foram contados no mesmo período. Para obter a concentração de 50% de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* essas farinhas foram misturadas a 50% da farinha de trigo 2 (T2).

3.7 – Avaliação das dietas sobre a quantidade de proteínas, carboidratos e triglicerídeos das larvas

3.7.1 - Quantificação de proteínas em larvas alimentadas com as diferentes dietas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 na proporção de 1:100 (peso/volume), agitadas por 1h a 4°C e centrifugadas a 2000 x g por 5 min. Uma alíquota de 10 µl do sobrenadante foi utilizada para a dosagem. A quantificação de proteína foi determinada de acordo com o método de Smith *et. al* (1985) usando BCA como descrito acima no item 3.3.1.

3.7.2 - Quantificação de carboidratos em larvas alimentadas com as diferentes dietas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 na proporção de 1:100 (peso/volume), agitadas por 1 h a 4°C e centrifugadas a 2.000 X g por 5 min. Uma alíquota de 5 µl do sobrenadante de cada amostra foi utilizada para a dosagem. A quantificação de carboidratos foi feita de acordo com Miller *et al.* (1959) como descrito acima no item 3.3.3.

3.7.3 - Quantificação de triglicerídeos em larvas alimentadas com as diferentes dietas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas em Tween 0,05% na proporção de 1:100 (peso/volume), agitadas por 1 h a temperatura ambiente e centrifugadas a 2000 x g por 5 min. A quantificação de triglicerídeos foi realizada como descrito anteriormente no item 3.3.2, utilizando 15 µl do sobrenadante de cada amostra.

3.8 – Efeito das diferentes dietas sobre a atividade de enzimas digestivas das larvas de *T. castaneum*

3.8.1 - Atividade da α -amilase em larvas alimentadas com diferentes farinhas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 na proporção de 2:100 (peso/volume), agitadas por 1 h a 4°C, centrifugadas a 2.000 X g por 5 min e o sobrenadante usado para a quantificação. A determinação da atividade da enzima α -amilase foi realizada através da metodologia descrita por Miller (1959), com modificações. Para a realização do ensaio foi preparado um reativo de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). O ensaio foi constituído de 5 μ l do extrato de larvas adicionados de 6 μ l de uma solução de amido 1 %, usado como substrato. Os tubos foram incubados a 37 °C por 45 minutos e após esse período, foram adicionados 100 μ l do reativo de DNS. As soluções foram fervidas por 5 min, diluídas com 100 μ l de água destilada e a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro. Para calcular a atividade de α -amilase nas amostras, foi feita uma curva padrão utilizando maltose.

3.8.2 - Perfil da atividade da α -amilase por eletroforese em larvas alimentadas com diferentes farinhas

Larvas 15 DAE alimentadas com farinha trigo 2, farinha de cotilédone *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8 na proporção 1:100 (peso/volume). O homogenato de cada amostra foi agitado por 1 h a 4 °C e centrifugado a 2000 x g por 5 min. 10 μ l deste homogenato foram adicionados a 10 μ l de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6.8, SDS 10% (peso/volume), glicerol 50% (v/v) e azul de bromofenol 0.01%) e aplicados em SDS-PAGE 12% de acordo com Laemmli (1970). A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 100 V durante aproximadamente 3 horas. O gel foi lavado duas vezes com Triton X-100 1% (v/v) por 30 min para a remoção do SDS. O gel foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente com uma solução de amido (1% de amido, acetato de sódio 20 mM, cloreto de cálcio 100 mM e NaCl 0,2 mM). O gel foi corado com reagente lugol (Sigma) e a imagem obtida com sistema de fotodocumentação.

3.8.3 - Atividade de proteases cisteínicas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas em tampão citrato fosfato (fosfato de sódio 100 mM, citrato fosfato 100 mM, triton X-100 0,1% e DTT 1,5 mM) pH 5,6 na proporção de 0,6:110 (peso/volume), agitadas por 1 h a 4 °C, centrifugadas a 2.000 X g por 5 min e o sobrenadante usado para a quantificação enzimática. O ensaio foi baseado na metodologia desenvolvida por Michaud *et al.*, (1996), usando uma curva padrão de papaína pura como referência para o cálculo das atividades das amostras. Azocaseína foi utilizada como substrato para a enzima. Os ensaios de atividade de proteases cisteínicas foram feitos incubando-se 80 µl da solução azocaseína 1% com 30 µl dos extratos das larvas e 10 µl de tampão citrato-fosfato pH 5,6. Após a incubação a 37 °C em banho-maria por 1 hora, foram adicionados 300 µl de TCA 10%. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 3000 x g e 350 µl do sobrenadante foram misturados com 300 µl de NaOH 1 M. A leitura das amostras resultantes foi realizada em comprimento de onda de 440 nm em espectrofotômetro.

3.8.4 - Atividade de proteases serínicas

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl pH 8,0 na proporção de 1:110 (peso/volume), agitadas por 1h a 4°C, centrifugadas a 2000 x g por 5 min e o sobrenadante usado para a quantificação. O ensaio de atividade foi baseado na metodologia de Demartini *et al.* (2007). Uma curva padrão de tripsina pura (Sigma) foi realizada usando-se BApNA como substrato para a enzima. O ensaio de atividade foi realizado incubando-se o substrato com 50 µl de cada um dos extratos por 1h a 37° C. A reação foi parada com a adição de 150 µl ácido acético 30%. A leitura foi feita em comprimento de onda de 440 nm em espectrofotômetro.

3.9 – Efeito inibitório *in vitro* de extratos de farinha de *G. max* sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas

3.9.1 - Ensaio de inibição de proteases cisteínicas

Os intestinos de larvas 15 DAE, alimentadas com a farinha de trigo 1, foram dissecados, homogeneizados em tampão citrato-fosfato (fosfato de sódio 100 mM, citrato fosfato 100 mM, Triton X-100 0,1% e DTT 1,5 mM) pH 5,6 na proporção de 5 intestinos para 400 µl de tampão, agitados por 1 h a 4 °C e centrifugados a 2.000 X g por 5 min. Farinhas de trigo 1 e *G. max* foram homogeneizadas em tampão citrato-fosfato na proporção 1:10 (peso/volume) e agitadas e centrifugadas como descrito para as larvas. Em separado, 20 µl do sobrenadante do extrato de intestinos ou 20 µl de papaína (10 µg) foram incubadas com 20 µl do extrato de farinhas por 30 min a 37 °C. A atividade de proteases cisteínicas foi determinada como descrito no item 3.12.3. A atividade de proteases cisteínicas do intestino ou da papaína sem a adição dos extratos das farinhas foi considerada como 100% de atividade.

3.9.2 - Ensaio de inibição de proteases serínicas

Os intestinos de larvas 15 DAE alimentadas com a farinha de trigo 1 foram dissecados, homogeneizados em tampão Tris-HCl pH 8,0 na proporção de 10 intestinos para 400 µl de tampão, agitados por 1 h a 4 °C e centrifugados a 2000 X g por 5 min. Farinhas de trigo 1 e *G. max* foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl na proporção 1:10 (peso/volume) e agitadas e centrifugadas como descrito para as larvas. Em separado, 20 µl do sobrenadante do extrato de intestinos ou 20 µl de tripsina (10µg) foram incubadas com 20 µl do extrato de farinhas por 30 min a 37 °C. A atividade de proteases serínicas foi determinada como descrito no item 3.12.4. A atividade de proteases serínicas do intestino ou da tripsina sem a adição dos extratos das farinhas foi considerada como 100% de atividade.

3.10 - Isolamento e caracterização do inibidor de proteases de cotilédones de *G. max*

3.10.1 - Montagem da coluna de afinidade de papaína acoplada a Sepharose 4B

Uma coluna de afinidade (Sepharose 4B-papaína) foi montada de acordo com metodologia descrita por Cuatrecasas (1970). Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (2 g) foi embebida em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 durante 16 h, a 4 °C. Posteriormente, uma solução de 25 mg de papaína pura (Sigma) dissolvida no tampão acima foi adicionada à matriz e deixada sob agitação lenta por, 4 h, a temperatura ambiente. A suspensão foi mantida a 4 °C, por 16 horas, para aumento da eficiência de ligação. Posteriormente, a resina foi agitada levemente com bicarbonato de sódio 100 mM, glicina 100 mM, pH 9,0, por 3 horas, a temperatura ambiente e em seguida filtrada e lavada com ácido acético 100 mM, pH 3,0 e novamente filtrada. Após cada lavagem, os eluídos foram medidos e a concentração de proteína nesses eluídos foi determinada por Bradford (1976). A quantidade de proteína eluída nas lavagens foi diminuída da quantidade inicial de proteínas na solução de papaína (também estimada por Bradford, 1976). Pela diferença, pode-se determinar a quantidade de proteína retida na coluna. A resina foi lavada exaustivamente com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 e conservada a 4 °C.

3.10.2 - Extração de proteínas de *G. max* e cromatografia de afinidade em papaína-Sepharose 4B

Proteínas solúveis dos cotilédones de *G. max* foram extraídas usando bicarbonato de sódio 0,1 M acrescido de NaCl 0,1 M pH 9,0 sob agitação por 1 h a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 10.000 X g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante incubado por 1 h a temperatura ambiente com o gel de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio ligado à papaína. Após a incubação a resina misturada ao extrato protéico foi utilizada para a montagem da coluna de cromatografia. Após empacotamento, a resina foi lavada exaustivamente com bicarbonato de sódio 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9,0 a um fluxo

de 1,2 ml/min para a retirada das proteínas não retidas. As proteínas retidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M pH 3,0 a um fluxo de 1,2 ml/min. As absorbâncias das frações não retidas e retidas foram lidas a 280 nm. O material retido foi dialisado contra água destilada (em membrana de diálise que exclui proteínas com massa molecular abaixo de 8.000 Da) durante 24 h a 4 °C e posteriormente recuperado por liofilização.

3.10.3 - Perfil de proteínas retidas na coluna de afinidade à papaína

Proteínas retidas da coluna de afinidade à papaína foram ressuspendidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10% (peso/volume), glicerol 50% (v/v) e azul de bromofenol 0,01%) e submetidas a separação por SDS-PAGE 12% de acordo com Laemmli (1970) com modificações. A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 100 V durante aproximadamente 3 h. Após a eletroforese o gel foi corado com uma solução corante (0,8 g de Azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 ml de ácido acético) e descorado por uma solução descorante contendo 35% de metanol e 10% de ácido acético.

3.10.4 - Caracterização das proteínas isoladas por espectrometria de massas

As bandas protéicas retidas na coluna de afinidade a papaína que foram visualizadas no SDS-PAGE foram recortadas e submetidas a caracterização através de espectrometria de massa em espectrômetro MALDI-TOF. Esses experimentos foram realizados no laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ-RJ em colaboração com o Dr. André Teixeira da Silva Ferreira e Dr. Jonas Perales.

As bandas protéicas foram recortadas do gel e lavadas com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50 mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min para descoloração das bandas. Posteriormente o gel foi desidratado pela adição de 200 µl de acetonitrila por 5 min e seco por centrifugação a vácuo. As amostras foram reduzidas com 100 µl de DTT 65 mM por 30 min a 56 °C e alquiladas com 100 µl de iodoacetamida 200 mM por 30 min a

temperatura ambiente. A solução de iodoacetamida foi removida e as bandas foram lavadas com bicarbonato de amônia 100 mM pH 8,0 e desidratadas novamente com 200 μ l de acetonitrila por 5 min. O solvente foi removido e as bandas re-hidratadas com 10 μ l de uma solução gelada de tripsina (20 ng/ μ l) em tampão bicarbonato de amônia 50 mM pH 8,0 por 45 min sob refrigeração. Posteriormente 20 μ l do tampão bicarbonato de amônia 50 mM pH 8,0 foram adicionados e a amostra incubada por 16 h a 37 °C. Após digestão, os peptídeos foram extraídos pela adição de 15 μ l de tampão bicarbonato de amônia 50 mM pH 8,0, sob ultrasonicação por 10 min. As soluções foram submetidas a redução de volume por centrifugação a vácuo, até o volume de 10 μ l. Ponteiras do tipo C18 ZipTip para micropipetas foram usadas para dessalinizar os peptídeos obtidos. As ponteiras foram ativadas com acetonitrila e equilibradas com TFA 0,1% (v/v) em água. As amostras foram aspiradas e dispensadas por oito ciclos seguidos e posteriormente as ponteiras foram lavadas com TFA 0,1%. Os peptídeos retidos nas mesmas foram eluídos com 1 μ l de acetonitrila 50% em TFA 0,1%. Um volume de 0,3 μ l dessa amostra foi depositado sobre a placa de aço do espectrômetro MALDI (ABI 192-target MALDI plate) e esta foi co-cristalizada com 0,3 μ l de matriz α -ciano-4-ácido-hidroxi-cinâmico (CHCA), preparada a 10 mg/ml em solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% (v/v).

O espectro de massas foi adquirido usando o analisador ABI 4700 Proteomics (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, U.S.A.) no modo refletor. Foram usadas como referência uma curva de calibração com bradicinina (757.39 Da), angiotensina II (1046.54 Da), P14R (1533,85 Da) e fragmento de ACTH 18–39 (2465,19 Da). A lista de picos monoisotópicos foi gerada usando-se o software 4000 Series Explorer version 3.0 RC1. Filtros foram aplicados para se excluírem massas inferiores a 900 Da. Picos de massa com sinal de 20 ou acima (noise ratio) foram usados para pesquisa em bancos de dados (NCBI) usando-se MASCOT. Os dados foram considerados quando mostraram “score” superior a 40.

3.11 – Efeito *in vitro* dos inibidores de semente de *G. max* sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas

O ensaio de inibição das atividades de proteases intestinais das larvas foi feito de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.16 e 3.17, utilizando nesse caso o inibidor purificado. Para a atividade de proteases cisteínicas o inibidor foi ressuspenso em tampão citrato-fosfato pH 5,6 e para a atividade de proteases serínicas foi utilizado o tampão tris-HCl pH 8,0. As proteínas retidas correspondentes a uma corrida cromatográfica foram ressuspendidas em 40 µL e metade desse volume foi utilizada em cada uma das replicatas do ensaio de inibição.

3.12 - Avaliação da transcrição das proteases cisteínicas do tipo catepsina L 1, 2 e 3 em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto

Os iniciadores específicos para as catepsinas L1 (CaTL1), catepsina L2 (CaTL2) e catepsina L3 (CaTL3) foram desenhados a partir do genoma de *T. castaneum*, disponível nos bancos de dados do NCBI e BeetleBase utilizando o programa Primer3. Os iniciadores usados foram: CatL1F: 5'-GAGTGCTGGTGTGAGTTGGA-3'; CatL1R: 5'-AAAAGACACGGCTTGACTGC-3'; CatL2F: 5'-GTGAAGTGCGTAAAATCTGGAA-3'; CatL2R: 5'-AAATCAGAGTGGGGTTGGAA-3'; CatL3F: 5'-GCTTACGTCAACCGTGGTCT-3' e CatL3R: 5'-GGTTTGCCAGACTTGACGA-3'. O RNA total foi extraído de ovos de 0-72 horas, do intestino de larvas 9 e 15 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 e de uma mistura de todos os tecidos (com exceção do intestino) de larvas de 15 DAE e de pupas de 48 h após a formação. O RNA foi extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen), como descrito pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total. A reação foi realizada na presença de RT random primer e transcriptase reversa (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Depois da transcrição reversa, 200 ng do produto de cada reação foram

utilizados para a reação de PCR usando-se iniciadores específicos e a Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas). As condições de amplificação utilizadas foram: 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. O controle negativo (branco) foi feito não colocando na reação nenhum cDNA e foi realizado um controle para cada iniciador. A proteína ribossomal RPS3 foi usada como normalizador para o PCR semi quantitativo (Toutges *et al.*, 2010). Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% utilizando como marcador fluorescente o reagente safer dye (Kasvi). A densitometria das bandas foi realizado através do programa ImageJ.

3.13 - Síntese da dsRNA da catepsina L3 seu silenciamento em fêmeas e larvas microinjetadas

Os primers para a CaTL3 contendo a sequência do promotor T7 foram utilizados para a amplificação da sequência alvo por PCR. O amplicon gerado foi purificado utilizando-se o kit QIAEX II (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após purificação, o amplicon foi utilizado para a transcrição *in vitro* da dsRNA, usando-se o kit T7 Ribomax Express RNAi System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Para o silenciamento, fêmeas adultas foram anestesiadas em gelo e microinjetadas com 0,12 µl de dsRNA na concentração de 1 µg/µl da dsRNA. Após a microinjeção, as fêmeas foram colocadas juntamente com os machos. Ovos de 0-24h foram coletados e mantidos em farinha de trigo 1. As larvas de 5 DAE foram microinjetadas com 20 nl de dsRNA na concentração de 0,2 µg/µl. Após a microinjeção as larvas foram mantidas em farinha de trigo 1. Foi realizada a extração de RNA do intestino de larvas oriundas de fêmeas microinjetadas e do intestino de larvas microinjetadas para a avaliação do silenciamento por PCR. O fenótipo foi avaliado através do acompanhamento da oviposição, eclosão, desenvolvimento larval, formação de pupas e adultos. Como controle, um grupo de cada experimento foi microinjetado com PBS.

3.14 – Análise estatística

Em todos os experimentos, média e desvio padrão foram calculados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância one-way (ANOVA) com seguimento do teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4 - Resultados

4.1 - Composição protéica, lipídica e glicídica das farinhas das dietas

A quantificação das proteínas totais, carboidratos e triglicerídeos das farinhas dos quatro diferentes trigos (T1, T2, T3 e T4), *V. unguiculata* (Vu), *P. vulgaris* (Pv) e *G. max* (Gm) foi feita para uma melhor caracterização das diferenças existentes nas dietas. Nossos resultados mostraram que existem grandes diferenças, principalmente entre as classes de proteínas analisadas. Foram observadas diferenças significativas tanto na qualidade quanto na concentração de cada das classes (Tabela 3). As farinhas de cotilédones das leguminosas, *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max* apresentaram maiores concentrações de proteínas totais, principalmente albuminas e globulinas.

Entre os trigos estudados os que apresentaram maior concentração de proteína total foram os trigos 1 e 2. Como esperado os quatro trigos analisados apresentaram uma maior concentração de glutelina, principalmente os trigos 1 e 2. As glutelinas já são descritas como majoritárias em sementes de trigo (Sramková *et al.*, 2009). Diferentemente dos demais trigos, o trigo 1 apresentou uma concentração considerável de albumina.

A concentração de triglicerídeos também foi analisada nas diferentes farinhas e os resultados mostraram que a maior concentração se encontra nas sementes de *G. max*. As demais amostras apresentaram concentrações bem inferiores de triglicerídeos.

Com relação aos carboidratos, foi observada pouca variação entre as amostras, com exceção de *G. max* que apresentou uma concentração superior as demais farinhas (Tabela 3).

Tabela 3 – Composição protéica, lipídica e glicídica das farinhas das dietas

| | Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de farinha) | | | | | Triglicerídeo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de farinha) | Carboidrato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de farinha) |
|-----------|---|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|--|--|
| | Albumina | Globulina | Prolamina | Glutelina | Proteína total | | |
| T1 | 32,51 ($\pm 0,13$) ^a | 16,32 ($\pm 0,84$) ^a | 5,51 ($\pm 0,26$) ^a | 84,04 ($\pm 1,68$) ^a | 138,08 | 0,42 ($\pm 0,025$) ^a | 15,3 ($\pm 0,30$) ^a |
| T2 | 15,96 ($\pm 0,75$) ^{a,c} | 13,45 ($\pm 1,71$) ^a | 7,67 ($\pm 0,04$) ^{a,c} | 85,65 ($\pm 0,53$) ^a | 122,72 | 0,32 ($\pm 0,01$) ^a | 14,47 ($\pm 0,07$) ^b |
| T3 | 1,26 ($\pm 0,66$) ^b | 8,53 ($\pm 0,73$) ^a | 8,96 ($\pm 0,63$) ^{b,c} | 33,88 ($\pm 0,68$) ^b | 52,63 | 0,37 ($\pm 0,014$) ^a | 12,97 ($\pm 0,05$) ^c |
| T4 | 12,08 ($\pm 1,37$) ^c | 10,2 ($\pm 1,53$) ^a | 14,64 ($\pm 0,51$) ^d | 40,04 ($\pm 0,94$) ^{b,c} | 76,96 | 0,46 ($\pm 0,041$) ^a | 13,32 ($\pm 0,046$) ^c |
| Vu | 627,7 ($\pm 7,11$) ^d | 89,92 ($\pm 11,2$) ^b | 4,50 ($\pm 0,38$) ^a | 44,77 ($\pm 0,75$) ^{c,d} | 806,89 | 0,96 ($\pm 0,002$) ^b | 15,46 ($\pm 0,07$) ^d |
| Pv | 493,5 ($\pm 8,88$) ^e | 97,65 ($\pm 1,86$) ^b | 5,00 ($\pm 0,24$) ^a | 47,8 ($\pm 0,66$) ^d | 607,95 | 0,95 ($\pm 0,011$) ^b | 16,07 ($\pm 0,14$) ^d |
| Gm | 634,0 ($\pm 12,44$) ^d | 122,0 ($\pm 4,66$) ^c | 5,12 ($\pm 0,18$) ^a | 42,86 ($\pm 3,55$) ^e | 803,98 | 54,67 ($\pm 9,19$) ^c | 23,25 ($\pm 1,14$) ^e |

Os resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Diferentes letras indicam uma diferença significativa entre as farinhas em um mesmo composto. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-Way ANOVA.

4.2 - Avaliação da ingestão das farinhas de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* pelas larvas de *T. castaneum*

Para demonstrar que as larvas ingeriram as farinhas de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, as proteínas dessas amostras foram extraídas e marcadas com FITC. Após o processo de marcação e liofilização essas proteínas foram misturadas com farinha de trigo 2 numa proporção de 50% (peso/peso) e usadas na alimentação de larvas. Os intestinos de larvas de 21 DAE foram dissecados e visualizados por microscopia de campo claro (Fig. 4A, B, C e D) e de fluorescência (Fig. 4A', B',C' e D'). Como controle, larvas foram alimentadas somente com farinha de trigo 2 não marcada (Fig. 4A e A').

Os resultados mostraram fluorescência no intestino de larvas alimentadas com a mistura de proteínas marcadas e trigo para os todos os cultivares de leguminosas, *G. max* (Figure 4B'), *V. unguiculata* (Figure 4C') e *P. vulgaris* (Figure 4C'). Diferentemente das larvas controle (alimentadas somente com trigo não marcado) (Fig. A'). Esses resultados comprovam que as larvas ingerem indiscriminadamente os componentes da dieta, não fazendo distinção entre a farinha de trigo (alimento preferencial) e as outras farinhas adicionadas.

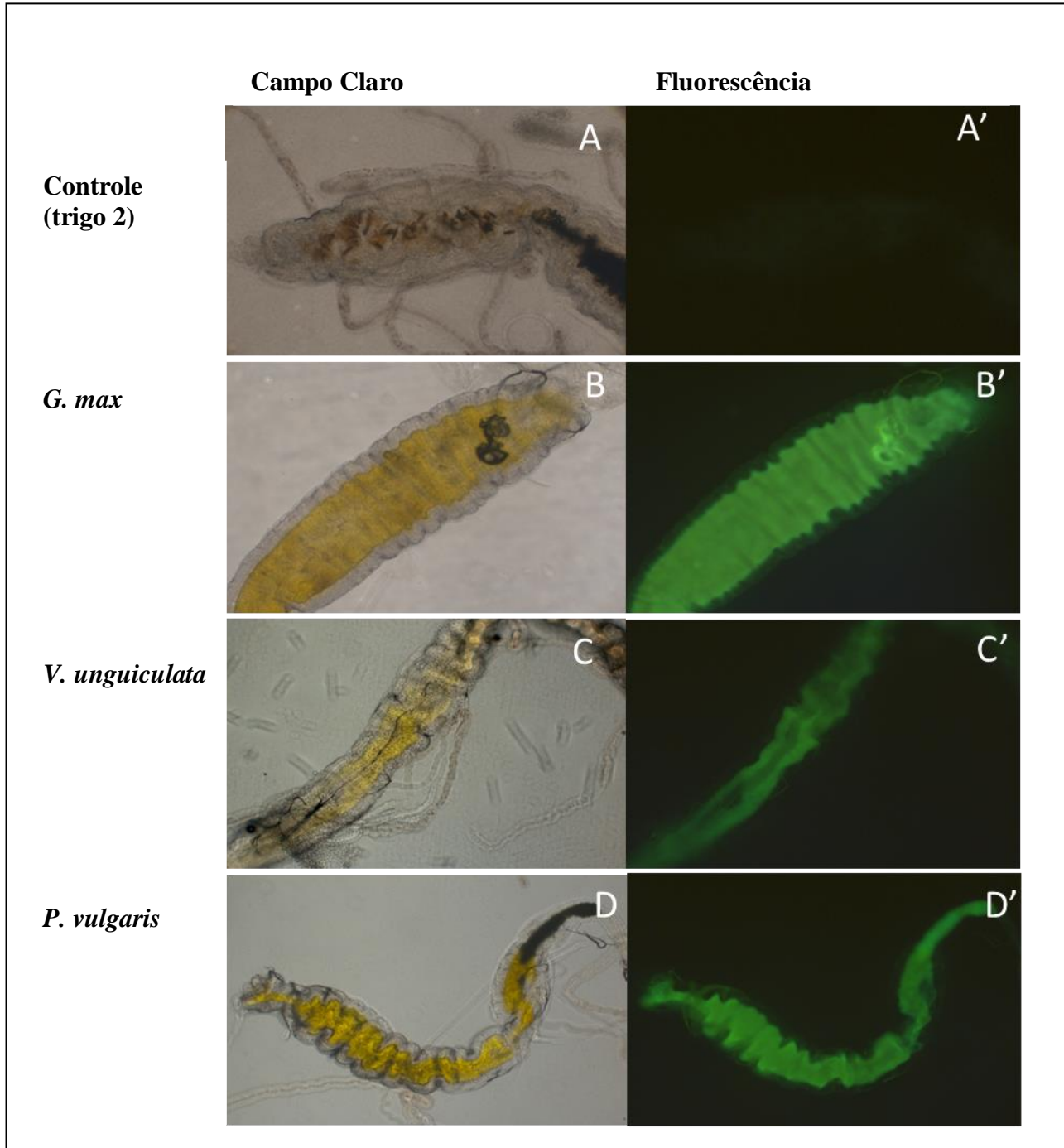


Fig. 4 – Microscopia de fluorescência do intestino de larvas alimentadas com proteínas das diferentes dietas marcadas com FITC. Intestino de larvas de 21 DAE alimentadas com proteínas de diferentes farinhas conjugadas com FITC e misturadas com farinha de trigo 2. O intestino foi visualizado por microscopia de campo claro (A, B, C e D) e por microscopia de fluorescência (A', B', C' e D'). **A e A'**: intestino de larvas alimentadas com trigo 2 (20x); **B e B'**: intestino de larvas alimentadas com proteínas de *G. max* marcadas com FITC misturadas a 50% de trigo 2 (20X); **C e C'**: intestino de larvas alimentadas com proteínas de *V. unguiculata* marcadas com FITC misturadas a 50% de trigo 2 (10X); **D e D'**: intestino de larvas alimentadas com proteínas de *P. vulgaris* marcadas com FITC misturadas a 50% de trigo 2 (10X);

4.3 - Avaliação do desenvolvimento embrionário em ovos de *T. castaneum* mantidos nas diferentes farinhas

Para demonstrar se as dietas interferem no desenvolvimento embrionário foi feita a análise morfológica de embriões mantidos nas farinhas de trigo 1, *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* na concentração de 100%. Para isso, embriões foram fixados nos tempos de 0-24 horas (mantidos somente na farinha de trigo 1), 24-48 horas (mantidos durante 24 horas em contato com as diferentes farinhas) e de 48-72 horas (mantidos durante 48 horas em contato com as farinhas). Depois de fixados os embriões foram marcados com DAPI e sua morfologia foi visualizada por microscopia de fluorescência.

A Figura 5 mostra um painel representativo dos embriões mantidos nessas diferentes farinhas. De 0-24 h foram observados embriões no estágio de blastoderma celular (Fig. 5A), durante a gastrulação (Fig. 5B), início da extensão da banda germinal (Fig. 5C) e quase total extensão da banda germinal (Fig. 5D). De 24-48h foram observados embriões entre o final da extensão e início da retração da banda germinal (Fig. 5E) e também foram observados embriões com maior retração da banda germinal (Fig. 5F). Embriões com a banda germinal quase totalmente retraída (Fig. 5G) e iniciando o fechamento dorsal foram observados de 48-72h (Fig. 5H). Esses resultados mostraram que não há diferenças morfológicas nos embriões mantidos nas diferentes dietas durante todo o desenvolvimento embrionário (Figura 5). As fotos selecionadas foram similares às obtidas independente da farinha usada. Todos os estágios de desenvolvimento descritos acima foram observados nos respectivos tempos independentemente da dieta. Esses dados mostram que as dietas estudadas não interferem no processo de desenvolvimento embrionário do besouro *T. castaneum*.

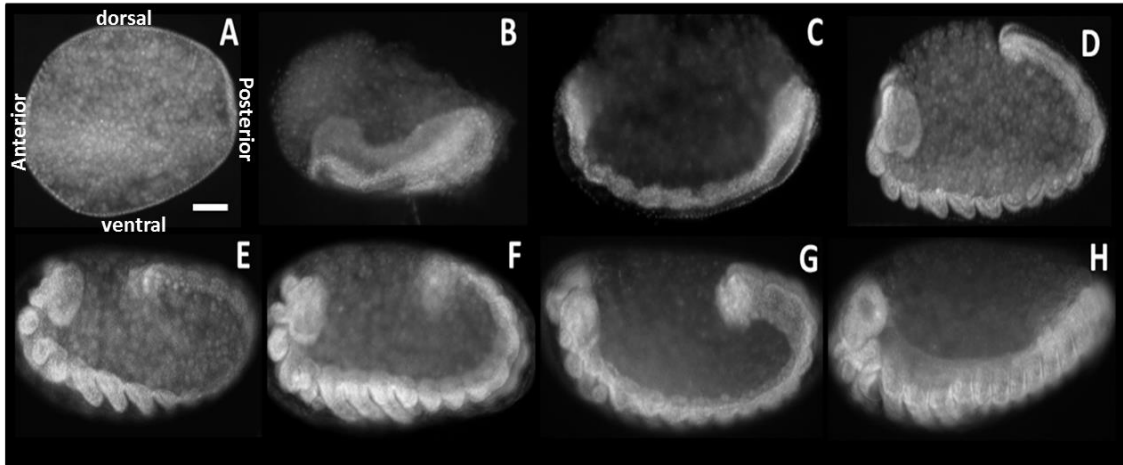


Fig. 5 – Microscopia de fluorescência representativa de embriões mantidos em diferentes dietas. Embriões de diferentes idades mantidos nas diferentes farinhas foram fixados, marcados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência. **A, B, C e D** - embriões 0-24h na farinha de trigo 1; **E, F** – embriões de 24-48h na farinha de *P. vulgaris*; **G, H** - embriões 48-72h na farinha de *G. max*. Barra de escala = 100 mm.

4.4 - Efeitos das diferentes farinhas na sobrevivência, desenvolvimento larval, formação de pupas e adultos

Mudanças na alimentação podem alterar a sobrevivência de insetos. Por isso, foi avaliada a sobrevivência de larvas alimentadas com quatro diferentes farinhas de trigo (T1, T2, T3 e T4), farinhas de *G. max* (Gm), *V. unguiculata* (Vu) e *P. vulgaris* (Pv), nas concentrações de 50 e 100% (Fig. 6). Para isso, 100 ovos foram colocados nas diferentes farinhas e as larvas vivas foram contadas 11 e 17 DAE. O cálculo da porcentagem foi feito a partir do número de ovos colocados inicialmente.

Em larvas 11 DAE (Fig. 6A) alimentadas com trigo 1 e 2, *G. max* 50 e 100%, *V. unguiculata* 50% e *P. vulgaris* 50%, sobrevivência de 80 a 85% foram observadas. Observamos uma sobrevivência de aproximadamente 63% em larvas alimentadas com farinha de trigo 3, farinha de trigo 4 e de *V. unguiculata* a 100%. A maior redução na sobrevivência de larvas 11 DAE foi vista na alimentação com *P. vulgaris* a 100%, onde somente 10% de larvas conseguiram sobreviver. Larvas 17 DAE (Fig. 6B) apresentaram uma menor sobrevivência quando alimentadas com farinha de trigo 4 (sobrevivência de aproximadamente 41%), *G. max* e *V. unguiculata* na concentração de 100% (sobrevivência de aproximadamente 61%). As larvas 17 DAE alimentadas com 100% de *P. vulgaris* não conseguiram sobreviver (Fig. 6B).

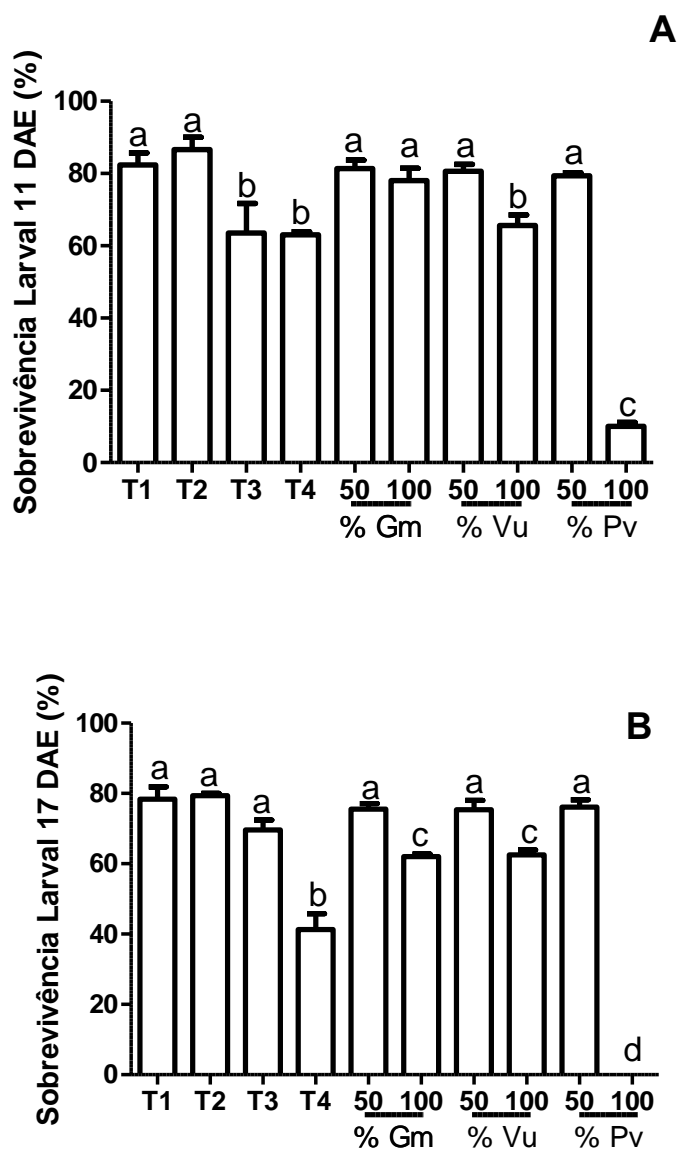


Fig. 6 – Sobrevivência de larvas mantidas nas diferentes dietas. Larvas 11 (A) e 17 DAE (B) alimentadas com as diferentes farinhas: T1, T2, T3 e T4 (100% de farinha de trigo 1, 2, 3 ou 4); Gm (*G. max*); Vu (*V. unguiculata*); Pv (*P. vulgaris*) em concentrações de 50% ou 100%. O calculo da porcentagem foi realizado a partir do número inicial de ovos. Resultados são expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas usando-se o teste One-Way ANOVA.

Para demonstrar a influência da alimentação com as diferentes dietas no crescimento larval, larvas 11 (Fig. 7A) e 17 (Fig. 7B) DAE mantidas nas 4 farinhas de trigo, farinha de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* nas concentrações de 50 e 100% foram fotografadas e medidas através do programa ImageJ. O maior tamanho foi observado em larvas 11 e 17 DAE alimentadas com a farinha de trigo 1. As demais larvas, tanto no período de 11 como 17 DAE, alimentadas com as outras dietas apresentaram redução de tamanho quando comparadas com as larvas alimentadas com trigo 1. Larvas alimentadas com farinhas de outros trigos curiosamente tiveram reduções de crescimento, em torno de 15% e 20%, para os estágios de 11 e 17 DAE respectivamente (Figura 7 A e B). Larvas alimentadas com 100 % das farinhas de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* apresentaram as maiores reduções de tamanho, principalmente quando comparadas ao trigo 1, onde as larvas apresentaram melhor desempenho. Larvas 11 e 17 DAE alimentadas com 100% de *G. max* tiveram uma redução de aproximadamente 50 e 60%, respectivamente. Para a alimentação com *V. unguiculata* a 100% observamos reduções próximas a 50% em 11 DAE e 60%, 17 DAE. Larvas 11 DAE alimentadas com *P. vulgaris* 100% apresentaram uma redução de 55%. Como não houve sobrevivência de larvas 17 DAE alimentadas com 100% de *P. vulgaris* não foi possível realizar a medição (Fig. 6B). A figura 7C mostra uma imagem representativa das larvas alimentadas com as diferentes farinhas.

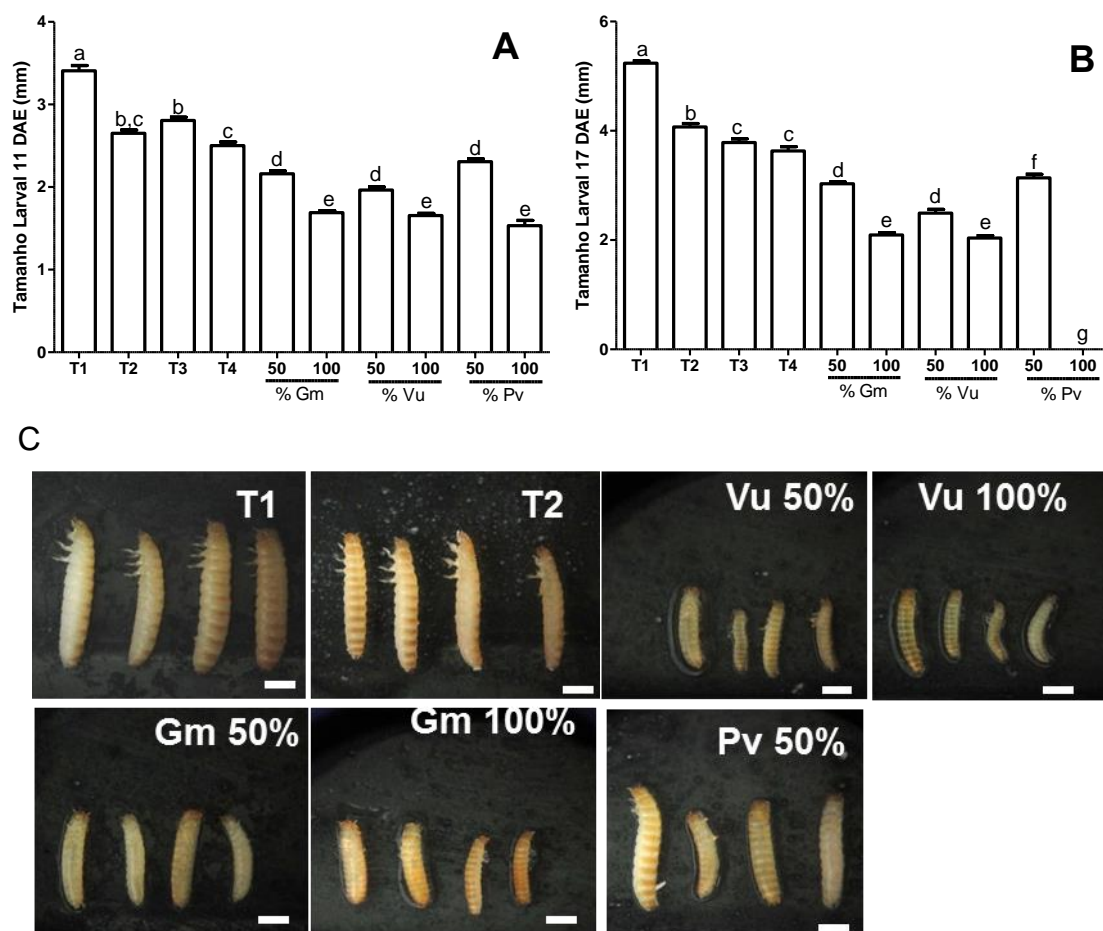


Fig. 7 – Análise do tamanho de larvas alimentadas com as diferentes dietas: T1, T2, T3 e T4 (100% de farinha de trigo 1, 2, 3 ou 4); Gm (*G. max*); Vu (*V. unguiculata*); Pv (*P. vulgaris*). Larvas foram medidas 11 (A) e 17 DAE (B). C, foto representativa de larvas 17 DAE. Barra de escala = 1mm. Resultados foram expressos como média (\pm SEM) do número de larvas medidas (incluindo os três experimentos). 11 DAE (n T1=178; T2=141; T3=156; T4=123; Gm 50%=100; Gm 100%=100; Vu 50%=100; Vu 100%=85; Pv 50%=100; Pv 100%=25). 17 DAE (n T1=169; T2=125; T3=148; T4=100; Gm 50%=100; Gm 100%=100; Vu 50%=78; Vu 100%=81; Pv 50%=85). Diferentes letras indicam diferenças significativas (teste One-Way ANOVA).

A transição da fase larval para pupa também foi avaliada nas diferentes dietas (Figura 8). Para isso, foi realizada a contagem de pupas formadas de 4 em 4 dias do 18º ao 58º DAE (Fig. 8). No 18º dia já foram observadas 44 pupas formadas de larvas alimentadas com a farinha de trigo 1 (Fig. 8A). Surpreendentemente, larvas alimentadas com a farinha de trigo 4 apresentaram além de um grande atraso, um menor número de pupas formadas quando comparada às outras farinhas de trigo (Fig. 8A). A formação de pupas de larvas alimentadas com as dietas contendo *G. max*, *V. unguiculata* ou *P. vulgaris* em todas as concentrações também apresentaram atraso (Fig. 8B). Entre as alimentações com as farinhas das leguminosas, uma redução significativa no número total de pupas formadas foi observada, ao final do 58 DAE, para larvas alimentadas com *V. unguiculata* 100%.

A emergência de adultos também foi um parâmetro que variou bastante entre as diferentes dietas (Fig. 9A e B). Foi observada uma redução do número esperado de adultos emergidos em relação ao número de pupas (Fig. 8) de uma forma geral, mostrando que existe uma mortalidade significativa na passagem entre esses dois estágios de desenvolvimento. Surpreendentemente, a redução mais pronunciada foi observada em larvas alimentadas com farinha de trigo 2, seguida pela alimentação com farinha de *V. unguiculata* (Figura 9B). Outro dado inesperado, foi o aumento do número de adultos formados quando *G. max* e *P. vulgaris* foram misturados com a farinha de trigo 2 na concentração de 50% (Fig. 8B).

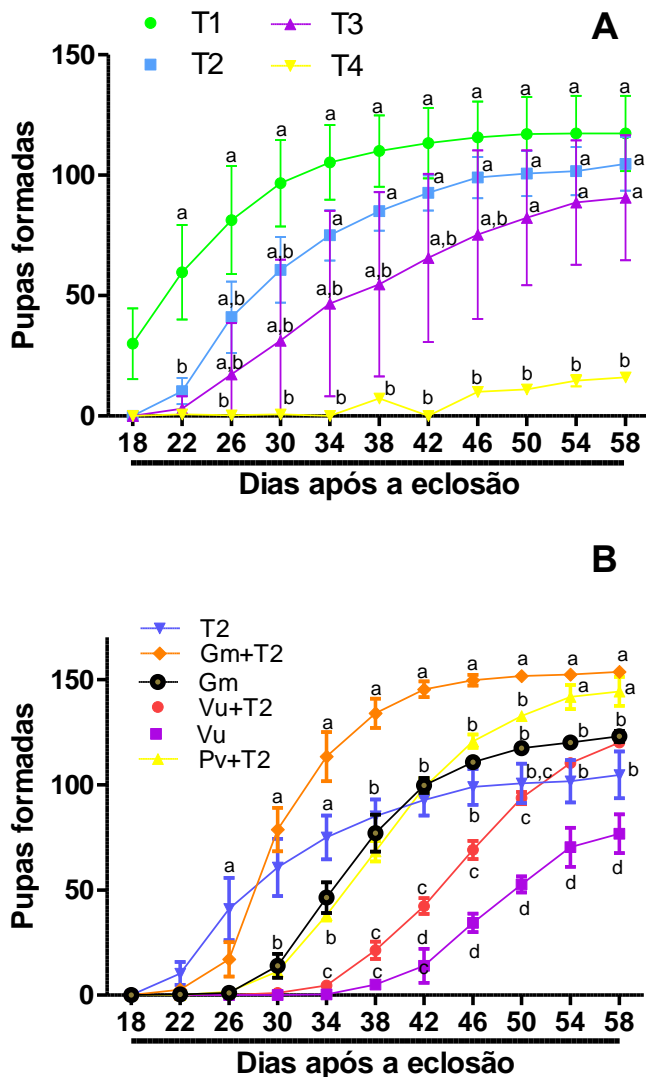


Fig. 8 – Análise da formação de pupas a partir de larvas mantidas nas diferentes dietas. A: larvas alimentadas com as quatro farinhas de trigo (T1, T2, T3 e T4); **B:** larvas alimentadas com *G. max* 50% (Gm 50%), *G. max* 100% (Gm 100%), *V. unguiculata* 50% (Vu 50%), *V. unguiculata* (Vu 100%) e *P. vulgaris* 50% (Pv 50%). 200 ovos foram colocados nas diferentes farinhas e as pupas foram contadas ao longo do tempo. Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Diferentes letras indicam diferença significativa no mesmo dia de avaliação (teste One-Way ANOVA).

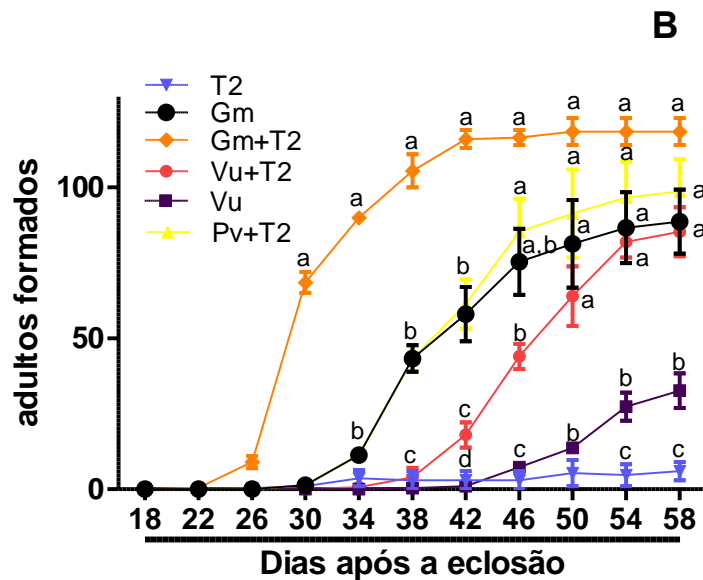
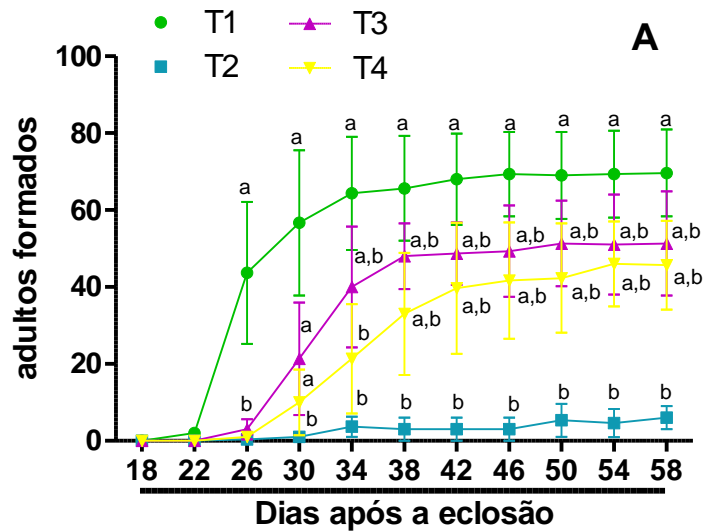


Fig. 9 – Análise da emergência de adultos a partir de larvas mantidas nas diferentes dietas. A: emergência de adultos de larvas alimentadas com as quatro farinhas de trigo (T1, T2, T3 e T4); **B:** emergência de adultos de larvas alimentadas com *G. max* 50% (Gm 50%), *G. max* 100% (Gm 100%), *V. unguiculata* 50% (Vu 50%), *V. unguiculata* 100% (Vu 100%) e *P. vulgaris* 50% (Pv 50%). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Diferentes letras indicam diferenças significativas no mesmo dia de avaliação (teste One-Way ANOVA).

4.5 - Efeito das dietas na quantidade de carboidratos, proteínas e triacilgliceróis das larvas

Para analisar o estado nutricional das larvas mantidas nas diferentes dietas, larvas foram alimentadas com a farinha de trigo 1, farinha de trigo 2, farinha de *G. max* 100%, *V. unguiculata* 100%, *P. vulgaris* 50% misturada com a farinha de trigo 1 e farinha de *P. vulgaris* 50% misturadas com a farinha de trigo 2. A concentração de proteínas solúveis e carboidratos foi determinada nessas larvas (Fig. 10A e B). Também foi realizada a quantificação de triglicerídeo em larvas alimentadas com farinha de trigo 1, farinha de trigo 2 e *V. unguiculata* 100% (Fig. 10C). As quantificações foram realizadas em larvas 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE (Fig. 10A).

A maior concentração de proteínas foi encontrada em larvas 9 DAE, independente da dieta. A partir de 11 DAE foi observada uma redução na quantidade de proteínas das larvas. Essa quantidade se tornou relativamente estável nas larvas dos demais dias após a eclosão. Praticamente não foram observadas diferenças significativas em larvas alimentadas com as diferentes dietas, com algumas poucas exceções. Um aumento foi observado em larvas 17 DAE alimentadas com dieta 100% de *G. max*. Esses resultados indicam de um modo geral que essas dietas não afetaram de modo significativo os conteúdos protéicos totais das larvas (Fig. 10A).

Com relação à quantificação de carboidratos nas larvas, de modo geral, houve uma grande variação na concentração de carboidratos entre as dietas e entre os diferentes dias após a eclosão (DAE). Observamos uma tendência de aumento da concentração de carboidratos se compararmos larvas de 9 e 21 DAE alimentadas com as diferentes dietas. Uma redução significativa, em todas as idades analisadas, foi observada em larvas alimentadas com *V. unguiculata* 100% (Fig. 10B).

Quando foi analisada a quantidade de triglicerídeo larval, observamos uma tendência de aumento da concentração ao longo do tempo em larvas alimentadas com a farinha de trigo 1. A concentração de triglicerídeos mostrou-se menor em larvas alimentadas com a farinha de trigo 2 e *V. unguiculata* 100%, a partir de 15 e 13 DAE, respectivamente (Fig. 10C).

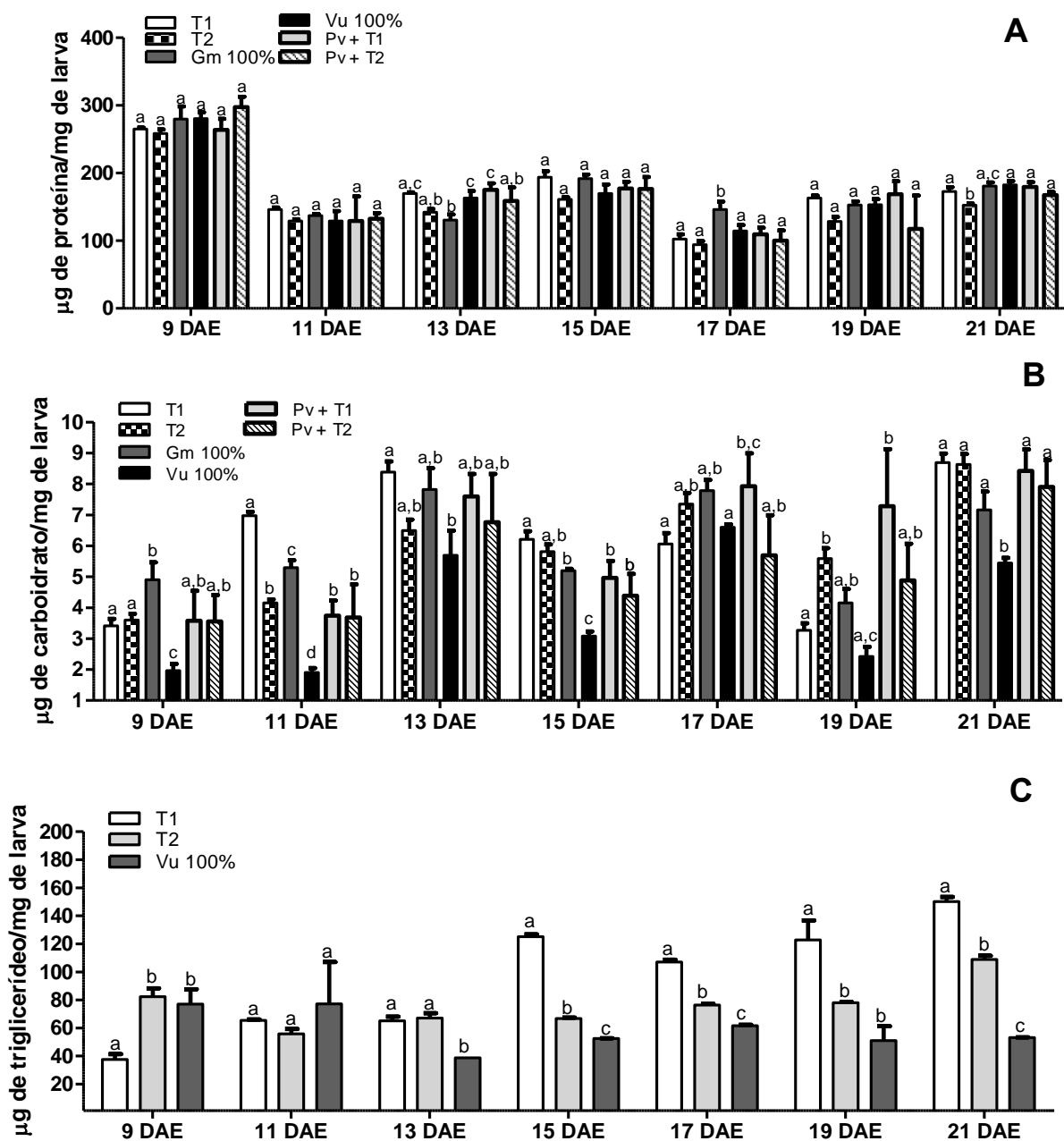


Fig. 10 – Estado nutricional de larvas mantidas nas diferentes dietas. Quantificação de proteínas (A) e carboidratos (B) em larvas alimentadas com trigo 1 (T1), trigo 2 (T2), *G. max* 100% (Gm 100%), *V. unguiculata* 100% (Vu 100%), *P. vulgaris* 50% misturados com trigo 1 (Pv+T1) e *P. vulgaris* 50% misturado com trigo 2 (Pv+T2); (C) quantificação de triglicérido em larvas alimentadas com trigo 1 (T1), trigo 2 (T2) e *V. unguiculata* 100% (Vu 100%). A quantificação foi realizada em larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre larvas de mesma idade (teste One-Way ANOVA).

4.6 - Efeito das diferentes farinhas na atividade de enzimas digestivas das larvas

Insetos que se alimentam de sementes ricas em açúcares dependem de maneira significativa da atividade de enzimas do tipo α -amilase. Sendo assim foi avaliada a atividade de α -amilases em larvas alimentadas com farinha de trigo 1, farinha de trigo 2 e *G. max* nas concentrações de 50 e 100% ao longo do desenvolvimento do 9º ao 21º DAE (Fig. 11A). Nossos resultados mostraram pouca variação da atividade durante o período analisado (9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE), havendo somente redução em larvas alimentadas com trigo 2 no 19º e 21º dias e em larvas alimentadas com trigo 1 no 19º dia.

A atividade de α -amilases também foi determinada em larvas 15 DAE alimentadas com *V. unguiculata* nas concentrações de 50 e 100% e *P. vulgaris* na concentração de 50% misturadas a farinha de trigo 1 ou 2 (Fig. 11B). Houve um aumento da atividade quando larvas foram alimentadas com *V. unguiculata* nas duas concentrações analisadas e em larvas alimentadas com *P. vulgaris* misturado com o trigo 2. Em larvas alimentadas com *P. vulgaris* misturado com trigo 1, houve redução na atividade desta enzima.

O perfil de atividade de α -amilases também foi avaliado através de eletroforese (Fig. 11C) em larvas 15 DAE alimentadas com farinha de trigo 1, farinha de trigo 2, *G. max* 50 e 100%, *V. unguiculata* 100% e *P. vulgaris* 50%. Nossos resultados mostraram a presença de uma banda de atividade majoritária e uma segunda banda com intensidade inferior. Dados da literatura já relataram a presença de duas isoformas da enzima em *T. castaneum* (Chen *et al.*, 1992). Ambas as isoformas foram detectadas em larvas alimentadas com todas as dietas, com exceção de larvas alimentadas com *P. vulgaris* 50% misturada a farinha de trigo 1, onde não foi detectada a isoforma de maior peso molecular (Fig. 11C).

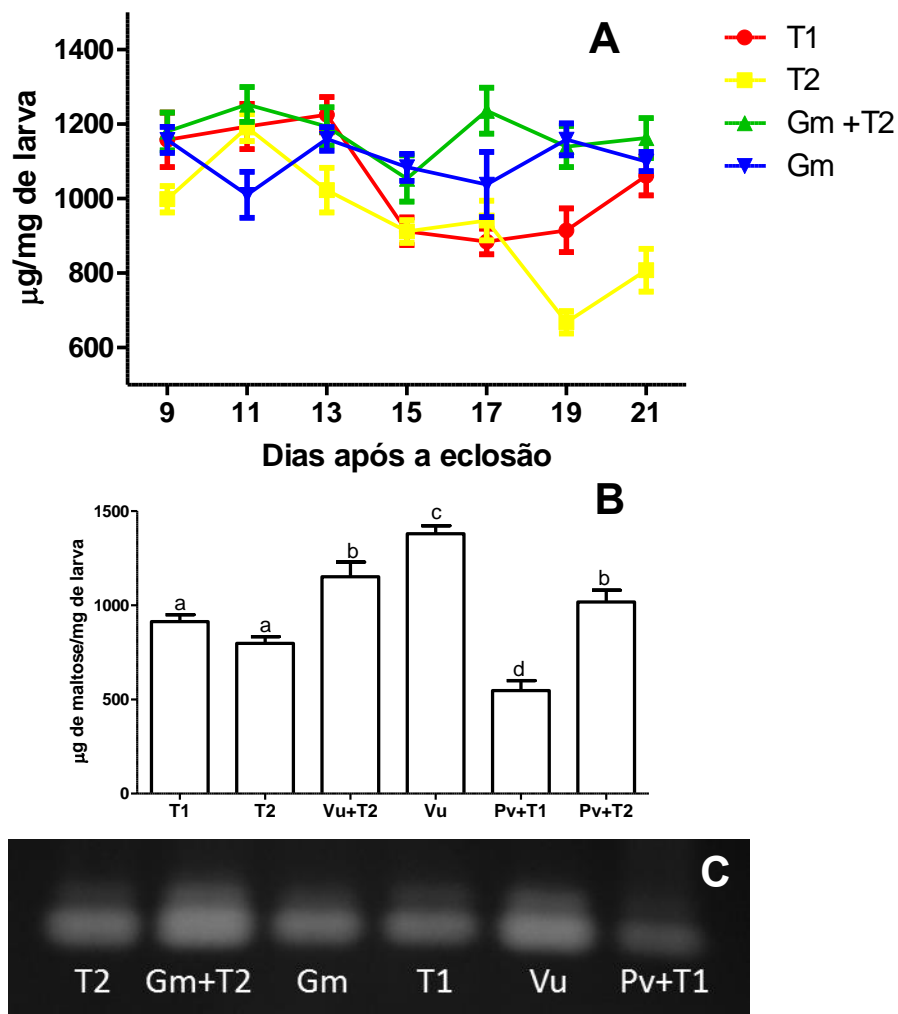


Fig. 11 – Atividade de α -amilases em larvas alimentadas com as diferentes dietas. **A:** atividade de α -amilase total durante o desenvolvimento larval em larvas alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *G. max* 50% misturada com farinha de trigo 2 (Gm+T2) e *G. max* 100% (Gm); **B:** atividade de α -amilase total em larvas 15 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *V. unguiculata* 50% misturada com farinha de trigo 2 (Vu+T2), *V. unguiculata* 100% (Vu), *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 1 (Pv+T1) e *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 2 (Pv+T2); **C:** Atividade de α -amilase por eletrofosere em larvas alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *G. max* 100% (Gm), *V. unguiculata* 100% (Vu), *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 1 (Pv+T1) e *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 2 (Pv+T2). Resultados foram expressos como média de 3 experimentos independente. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste One-Way ANOVA)

A atividade de proteases serínicas também foi avaliada ao longo do desenvolvimento em larvas alimentadas com farinha de trigo 1, farinha de trigo 2 e *G. max* nas concentrações de 50 e 100% (Fig. 12A). Larvas alimentadas com trigo 2 tiveram a atividade de proteases serínicas aumentada nos 15^o e 17^o dias em relação às larvas 9 DAE alimentadas com a mesma dieta. Após esse período a atividade foi reduzida. Somente houve diferença significativa entre larvas alimentadas com trigo 1 e 2, 15 e 17 DAE. Larvas alimentadas com *G. max* 50 e 100% tiveram a atividade de proteases serínicas reduzida até o 13^o dia, em relação às larvas alimentadas com a farinha de trigo. Após esse período larvas alimentadas com *G. max* 100% não apresentaram diferença significativa em relação as larvas alimentadas com trigo 1. Surpreendentemente, larvas 21 DAE alimentadas com *G. max* 50% apresentaram um aumento na atividade de proteases serínicas em relação as larvas alimentadas com as outras dietas (Fig. 12A).

A dosagem de proteases serínicas em larvas 15 DAE alimentadas com *V. unguiculata* 50%, *V. unguiculata* 100% e *P. vulgaris* 50% misturadas com farinhas de trigo 1 ou 2 também foi avaliada (Fig. 12B). Larvas alimentadas com farinha de trigo 2 e *P. vulgaris* misturado com trigo 1 apresentaram uma atividade maior que larvas alimentadas com farinha de trigo 1. Larvas alimentadas com as outras dietas não apresentaram diferença significativa em relação às larvas alimentadas com a farinha de trigo 1.

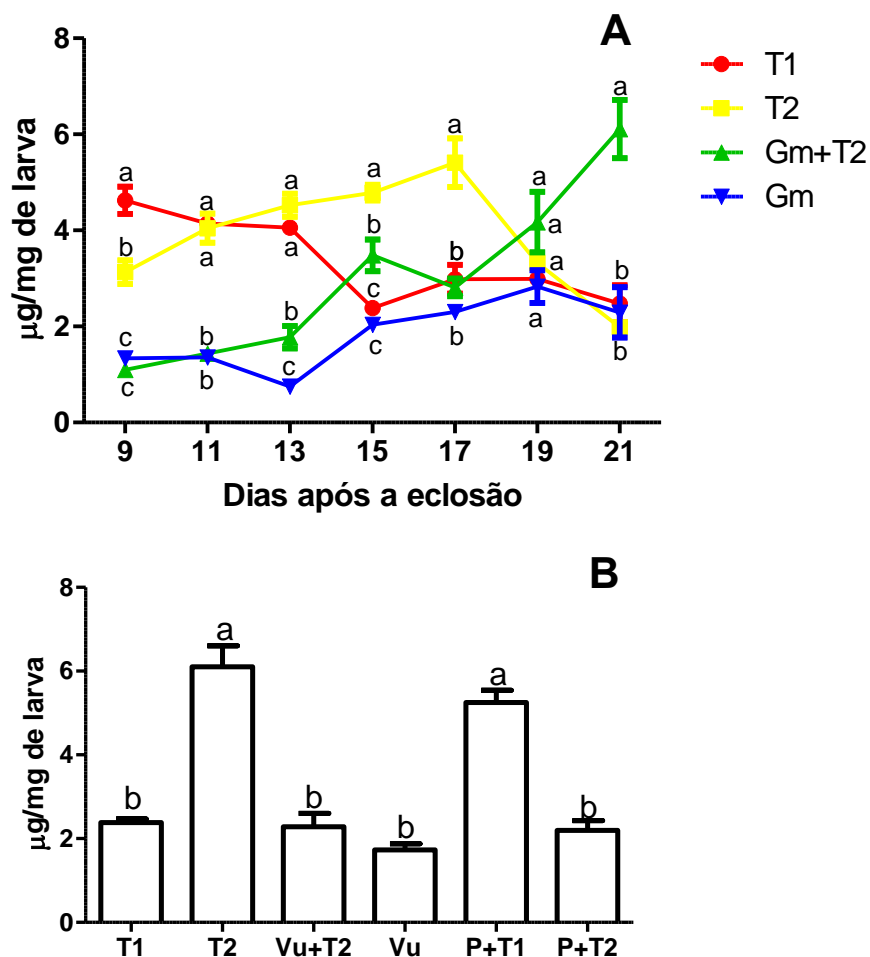


Fig. 12 – Atividade de proteases serínicas em larvas alimentadas com diferentes dietas. A: Atividade em larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *G. max* 50% misturado com farinha de trigo 2 (Gm+T2) e *G. max* 100% (Gm). **B:** atividade de proteases serínicas em larvas 15 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *V. unguiculata* 50% misturada com farinha de trigo 2 (Vu+T2), *V. unguiculata* 100% (Vu), *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 1 (Pv+T1) e *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 2 (Pv+T2); Resultados foram expressos como média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste One-Way ANOVA)

A atividade de proteases cisteínicas foi determinada em larvas ao longo do desenvolvimento submetidas a alimentação com farinha de trigo 1, trigo 2 e *G. max* nas concentrações de 50 e 100% (Fig. 13A). Larvas alimentadas com *G. max* 50% tiveram sua atividade reduzida até o 13º dia em relação às larvas alimentadas com trigo 1 e 2. Larvas alimentadas com *G. max* 100% tiveram sua atividade reduzida até o 19º dia em relação às larvas alimentadas com farinha de trigo 1 e 2. As maiores reduções foram de 74% e 72% em larvas 9 DAE quando comparadas com as larvas alimentadas com trigo 2 e 1 respectivamente (Fig. 13A).

Também foi realizada a dosagem de proteases cisteínicas em larvas 15 DAE alimentadas com *V. unguiculata* 50%, *V. unguiculata* 100% e *P. vulgaris* 50% misturado com farinha de trigo 1 ou 2 (Fig. 13B). Somente houve diferença significativa em larvas alimentadas com *P. vulgaris* misturado com trigo 1, onde a atividade foi aumentada em relação às larvas alimentadas com as outras dietas.

Quando comparadas às atividades de proteases serínicas (Fig. 12) e cisteínicas (Fig. 13) foi observado que a atividade de proteases cisteínicas é cerca de 10 vezes maior que a atividade de proteases serínicas. Esses resultados indicam que as proteases do tipo cisteínicas são as enzimas digestivas majoritárias na digestão protéica de larvas de *T. castaneum* como já demonstrado em outros trabalhos (Oppert et al., 2005; Vinokurov et al., 2009) .

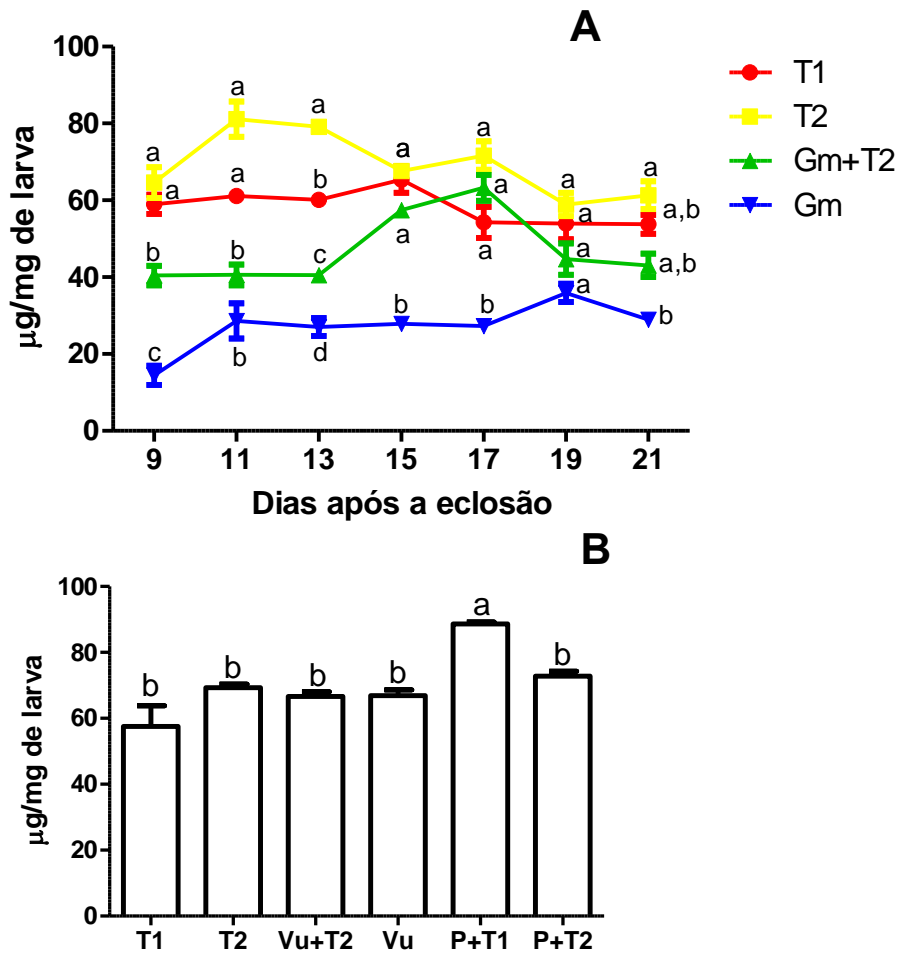


Fig. 13 – Atividade de proteases cisteínicas em larvas alimentadas com diferentes dietas. A: Atividade em larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *G. max* 50% misturado com farinha de trigo 2 (Gm+T2) e *G. max* 100% (Gm). **B:** atividade de proteases cisteínicas em larvas 15 DAE alimentadas com farinha de trigo 1 (T1), farinha de trigo 2 (T2), *V. unguiculata* 50% misturada com farinha de trigo 2 (Vu+T2), *V. unguiculata* 100% (Vu), *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 1 (Pv+T1) e *P. vulgaris* 50% misturada com trigo 2 (Pv+T2). Resultados foram expressos como média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste One-Way ANOVA)

4.7 - Efeito inibitório *in vitro* de extratos de farinha de *G. max* sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas

Para demonstrar a presença, nas sementes de *G. max*, de compostos capazes de inibir as proteases do intestino das larvas de *T. castanuem*, extrato total dessa farinha foi incubado com extrato dos intestinos de larvas e posteriormente a atividade proteolítica foi quantificada (Fig. 14). Quando o extrato da farinha de *G. max* foi incubado com o extrato de intestino de larvas 15 DAE foi observada uma redução superior a 50% em relação à de proteases intestinais do intestino puro (sem adição – SA) ou incubado com o extrato de farinha de trigo 1 (Fig. 14A). Como controle positivo o extrato de farinha de *G. max* foi incubado com papaína pura (Sigma) onde confirmamos a inibição de cerca de 95% dessa protease pelo extrato de *G. max*. Constatou-se ainda que, apesar de o extrato de farinha de trigo 1 ter inibido em cerca de 20% a atividade da papaína comercial, está não demonstrou ação inibitória contra proteases intestinais das larvas.

A inibição de proteases serínicas intestinais pelo extrato de sementes de também foi observada (Fig. 14B). Novamente, a farinha de *G. max*, causou redução de aproximadamente 80% da atividade proteolítica intestinal. A atividade de tripsina pura (Sigma), usada como controle positivo, também foi praticamente abolida pelo extrato de sementes de *G. max* (Fig 14B). Quando comparamos a atividade de proteases serínicas inicial do intestino com a atividade do intestino após incubação com extrato de farinha de trigo 1 observamos uma redução de aproximadamente 20%.

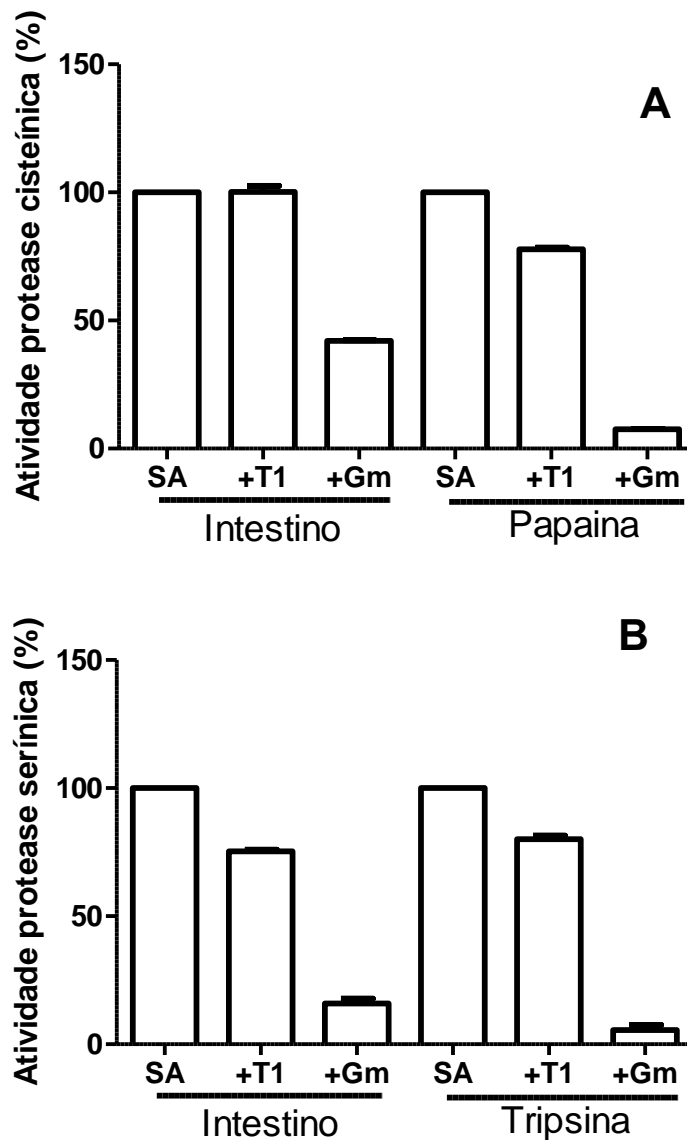


Fig. 14 – Inibição de proteases do intestino de larvas 15 DAE pelo extrato de *G. max*. Atividade de proteases de extratos de intestinos incubados com extrato de farinhas de *G. max*. **A:** atividade de proteases cisteínicas; **B:** atividade de proteases serínicas; Atividade de proteases foram mensuradas depois da incubação do extrato de intestino ou das proteases comerciais (papaína e tripsina) com as farinhas de trigo 1 (+T1) ou *G. max* (+Gm) por 30 min a 37°C A porcentagem das atividades foi calculada em relação a atividade das proteases (papaína ou tripsina) ou à atividade presente somente no intestino (sem adição – SA). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes

4.8 - Isolamento e caracterização do inibidor de proteases cisteínicas da farinha dos cotilédones de *G. max*

O inibidor de proteases cisteínicas foi isolado de sementes de *G. max* utilizando-se uma coluna de afinidade preparada com resina Sepharose 4B ligada à papaína. A amostra foi pré-incubada com a resina por 30 min e após a retirada das proteínas não retidas, as proteínas retidas foram eluídas com ácido acético 0,1M pH 3,0 (Fig. 15A) e visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig.15B). O perfil eletroforético apresentou bandas protéicas abaixo de 30 kDa (apontadas por setas). Essas bandas foram recortadas e identificadas por espectrometria de massas (Tabela 4). As bandas 1 e 2 originaram os mesmos peptídeos e ambos tiveram similaridade de 100% com um inibidor do tipo Kunitz de *G. max*, um clássico inibidor de proteases serínicas de massa molecular de 24,15 kDa. Os dois peptídeos obtidos somam 29 aminoácidos dos 216 aminoácidos da proteína completa, dando uma cobertura de 13%. A Figura 16 mostra a sequência de aminoácidos do inibidor do tipo Kunitz de *G. max* e em negrito estão evidenciados os peptídeos obtidos na espectrometria. A partir da banda 3 obtivemos um peptídeo similar à papaína (dados não mostrados). Acreditamos que a eluição de papaína juntamente com o inibidor se deve ao fato do nosso método de eluição com ácido acético pH 3,0 ter sido muito forte.

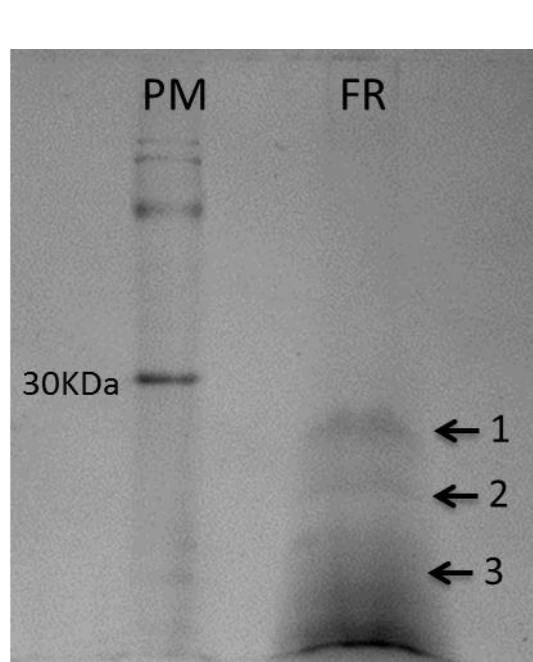
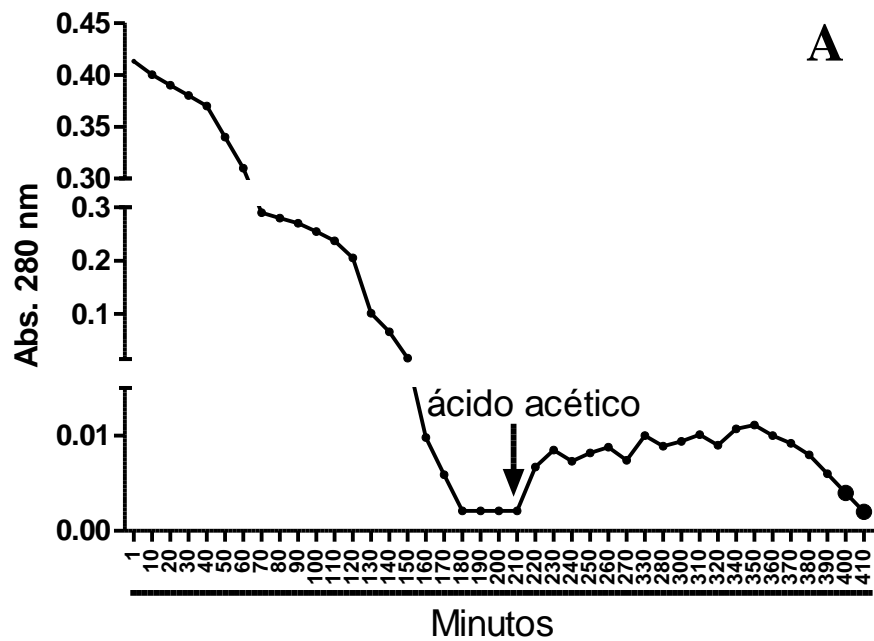


Fig. 15 - Isolamento de proteínas de cotilédone de *G. max* com afinidade à papaina. **A:** perfil cromatográfico da lavagem e eluição da coluna de afinidade; **B:** SDS-PAGE das proteínas retidas na coluna de afinidade a papaína, coradas com Coomassie. PM, padrão de peso molecular; FR, fração retida da coluna de afinidade; 1, 2 e 3, local onde bandas forma recortadas para sequenciamento.

Tabela 4 - Identificação, por espectrometria de massas, dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise das bandas proteicas 1 e 2 (Fig 15) de cotilédones de *Glycine max* retidas na cromatografia de afinidade a papaína.

| No. da banda proteica | Seqüência do peptídeo | Íon score | ID GenBank |
|-----------------------|-----------------------|-----------|--------------|
| Banda 1 | NELDKGIGTISSPYR | 126.8 | gi/ 13375349 |
| Banda 2 | IGENKDAMDGWFR | 108.7 | gi/ 13375349 |

MKSTIFFALFLFCAFTTSYLPSAIADFVLDNEGNPLENGGTYIILSDITAFGGIRA
 APTGNERCPLTVVQSR**NELDKGIGTISSPYR**IRFIAEGHPLSLKFDSFAVIMLC

GIPTWSVVEDLPEEHAVK**IGENKDAMDGW**FLERVSDDDEFNNYKLVFCPQQ
AEDDKCGDIGISIDHDDGTRRLVVFKNKPLVVQFQKLDKESLAKKNHGLSRSE

Fig. 16 – Sequência completa do inibidor de tripsina do tipo Kunitz (gi|13375349) de *Glycine max* mostrando, destacados em negrito, os peptídeos obtidos da fração retida na coluna de afinidade a papaína. Massa molecular 24,150.3 Da; 29/216 aminoácidos totais (13 % de cobertura).

4.9 - Efeitos *in vitro* dos inibidores de sementes de *G. max* sobre a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino de larvas *in vitro*

Para demonstrar o efeito da fração enriquecida com o inibidor de semente de *G. max* sobre a atividade de proteases do intestino de larvas de *T. castaneum*, foi realizada a incubação dessa fração com o extrato de intestino de larvas 15 DAE ou com tripsina pura (controle positivo). Após a incubação, a dosagem de proteases serínicas foi realizada e observamos uma redução na atividade intestinal de aproximadamente 70%. A atividade da tripsina também foi diminuída na mesma proporção (Fig. 17 A). O efeito da fração enriquecida com o inibidor de *G. max* sobre a atividade das proteases cisteínicas intestinais de larvas 15 DAE e da papaína pura também foi analisado. Os resultados mostraram uma inibição próxima a 40% da atividade de proteases cisteínicas do intestino do inseto. A inibição da atividade da papaína foi ainda mais evidente, alcançando diminuição superior a 60% (Fig. 17 A).

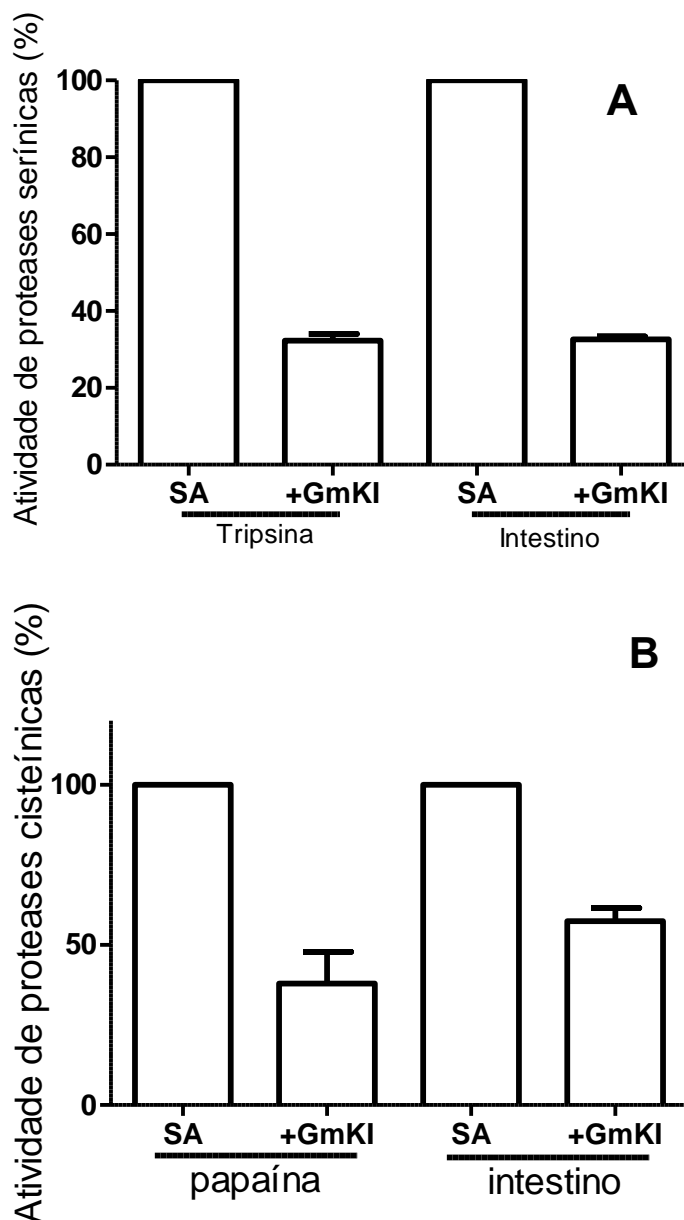


Fig. 17 - Inibição de proteases do intestino de larvas pelo inibidor de protease de *G. max* (GmKI). Atividade de proteases de extratos de intestinos incubados com inibidores isolados de *G. max*. **A:** atividade de proteases serínicas; **B:** atividade de proteases cisteínicas. Atividade de proteases foram mensuradas depois da incubação do intestino de larvas 15 DAE ou das proteases com a fração contendo o inibidor (+GmKI) por 30 min a 37°C. A porcentagem de atividade foi calculada em relação a atividade das proteases (papaína ou tripsina) ou da atividade presente somente no intestino (Sem adição - SA). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes.

4.10 – Avaliação da transcrição da transcrição das proteases cisteínicas do tipo catepsina L 1, 2 e 3 em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto

A atividade de proteases cisteínicas é predominante no intestino de coleópteras, sendo que as catepsinas são as proteases cisteínicas de maior importância na digestão desses insetos (Vinokurov *et al.*, 2009). No genoma de *T. castaneum* são encontrados cerca de 25 sequências de catepsinas L e B (Tribolium Genome Sequencing Consortium). Estudos usando transcriptoma confirmaram uma alta expressão dessas proteínas no intestino (Morris *et al.*, 2009). Nesse trabalho foi demonstrado que três catepsinas L tinham a maior expressão no intestino de larvas, nós as denominamos catepsina L1 (CaTL1-gi|91092014), catepsina L2 (CaTL2-gi|91085670) e catepsina L3 (CaTL3-gi|281427379).

As sequências de aminoácidos dessas três catepsinas foram comparadas às catepsinas L de outras espécies através do alinhamento de aminoácidos (Fig. 18). O peptídeo sinal das diferentes sequências foi localizado utilizando o site Signal P e é mostrado marcado em verde. No alinhamento estão destacadas características da família de proteases cisteínicas a qual as catepsinas pertencem. Em roxo, estão marcados os resíduos de aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica (Cys, His e Asn). Dois domínios conservados dessa família de proteases também foram encontrados e se encontram marcados em azul e vermelho (Barrett *et al.*, 2004).

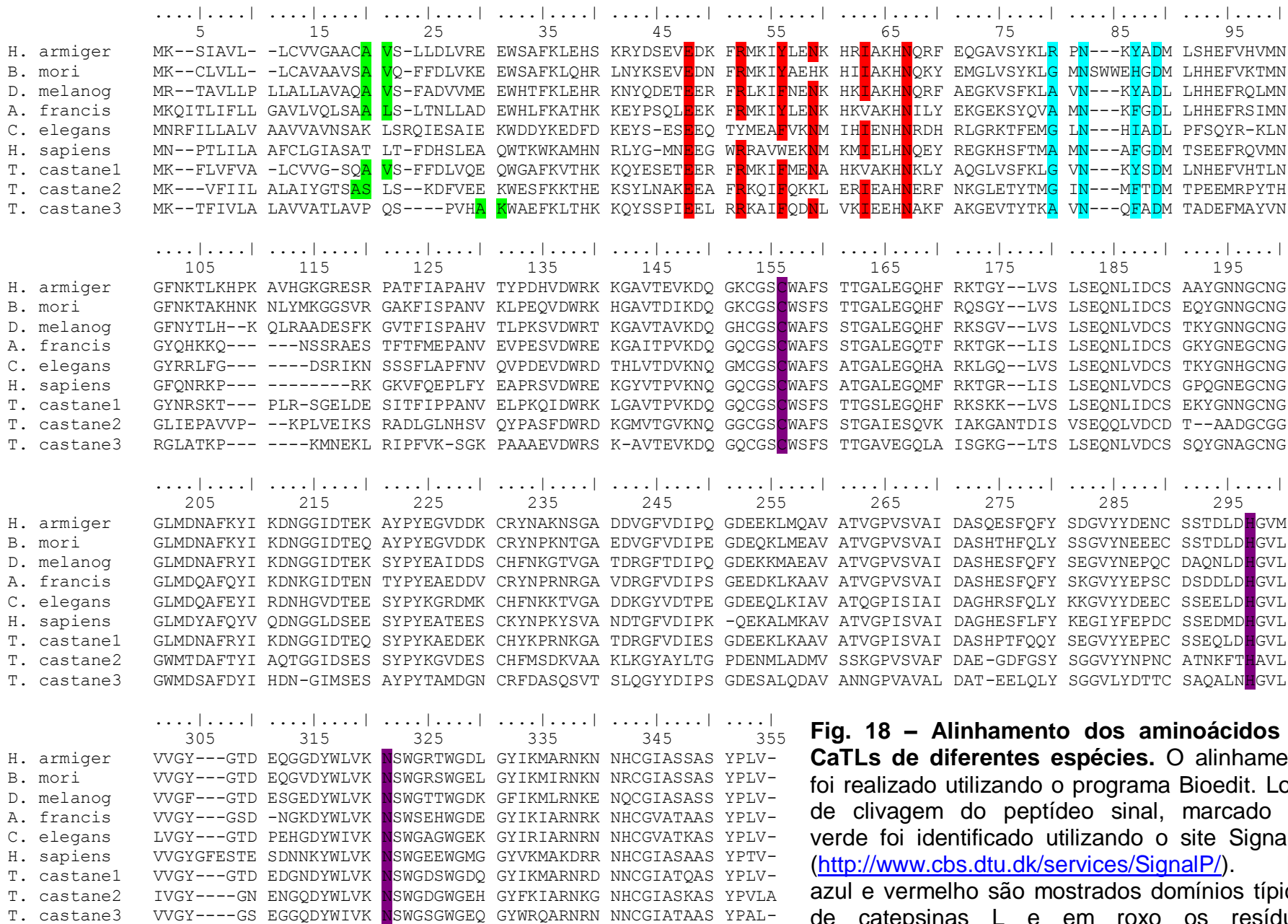


Fig. 18 – Alinhamento dos aminoácidos de CaTLs de diferentes espécies. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Bioedit. Local de clivagem do peptídeo sinal, marcado em verde foi identificado utilizando o site Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Em azul e vermelho são mostrados domínios típicos de catepsinas L e em roxo os resíduos catalíticos.

Para analisar a expressão dessas catepsinas em *T. castaneum* foi feita a extração de RNA de uma mistura de ovos de 0-72 h, para que todas as fases do desenvolvimento embrionário fossem incluídas, intestino de larvas de 9 e 15 DAE, todos os tecidos da larva 15 DAE com exceção do intestino e pupa. Primers específicos para cada uma das três catepsinas L de *T. castaneum* foram desenhados e foi realizada a amplificação por PCR comum para detectar sua presença nos diferentes tecidos. Não foi possível detectar a presença da CaTL2 em nenhum dos tecidos analisados (Fig. 19A). Para demonstrar que a não amplificação dessa catepsina não foi causada por nenhum problema no desenho dos primers fizemos sua amplificação usando como molde o DNA genômico do *T. castaneum*, e nessas amostras houve amplificação do amplicon de tamanho esperado (Fig. 19B).

A CaTL1 foi detectada em todos os tecidos analisados, inclusive em estágios onde não há alimentação, como é o caso de ovos e pupa (Fig. 20A). A CaTL3 somente foi detectada no intestino de larvas (Fig. 20B mostra a amplificação da CaTL3 somente no intestino e a Fig. 20C mostra somente a amplificação da CaTL1 nos tecidos da larva). Não houve amplificação dessa protease em ovos, pupa ou qualquer outro tecido de larvas. Isso indica que ela é exclusivamente expressa no intestino do inseto.

O nível da transcrição da CaTL1 e 3 no intestino do inseto ao longo do desenvolvimento larval foi analisado através de PCR semi quantitativo (Fig. 21). Em todos os tempos analisados (9, 11, 13, 15 e 17 DAE) foi observada a expressão das duas proteases. A CaTL1 (Fig. 21A) parece diminuir sua transcrição no 13^o DAE e 15^o DAE. A CaTL3 (Fig. 21B) parece diminuir ao longo do tempo a partir do 13^o DAE. A figura 21D e E são as análises de densitometria das bandas dos géis das figuras 21 A e B respectivamente. A transcrição da proteína ribossomal RPS3 foi utilizada como normalizador (Fig. 21C). Os níveis de transcrição da CaTL3 no intestino ao longo do desenvolvimento larval apresentou um comportamento similar ao observado para a atividade total de proteases cisteínicas em larvas alimentadas com dietas a base de trigo (Fig. 13A).

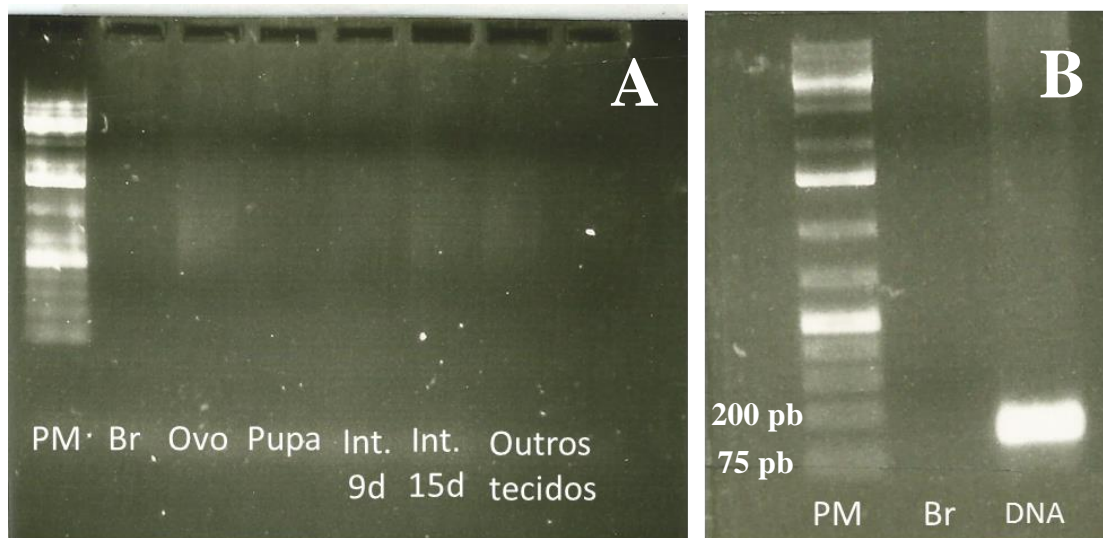


Fig. 19 - Análise da transcrição da catepsina L2 (CaTL2) em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de *T. castaneum*. A: PCR da CaTL2 em ovo, pupa, intestino de larvas de 9 e 15 DAE (Int. 9d e Int. 15d) e uma mistura de todos os tecidos com exceção do intestino; **B:** PCR da CaTL2 usando como molde DNA genômico. O branco da reação de PCR foi realizado não adicionando o cDNA ou DNA (Br). O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose. PM = padrão de peso molecular.

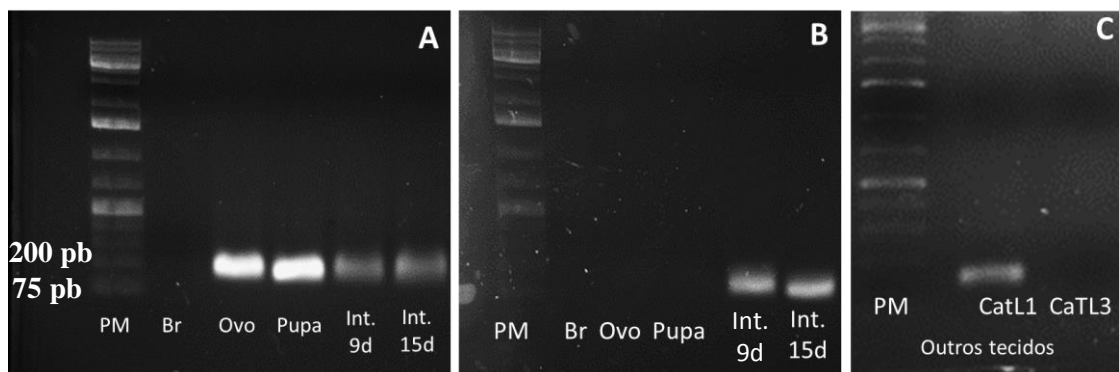


Fig. 20 – Análise da transcrição da catepsina L1 (CaTL1) e catepsina L3 (CaTL3) em diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de *T. castaneum*. **A:** PCR da CaTL1 em ovo, pupa e intestino de larvas de 9 e 15 DAE (Int. 9d e Int. 15d); **B:** PCR da CaTL3 em ovo, pupa e intestino de 9 e 15 dias; **C:** PCR da CaTL1 e CaTL3 do cDNA de uma mistura de todos os tecidos da larva com exceção do intestino. O branco da reação de PCR foi realizado não adicionando cDNA (Br). O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose. PM = padrão de peso molecular.

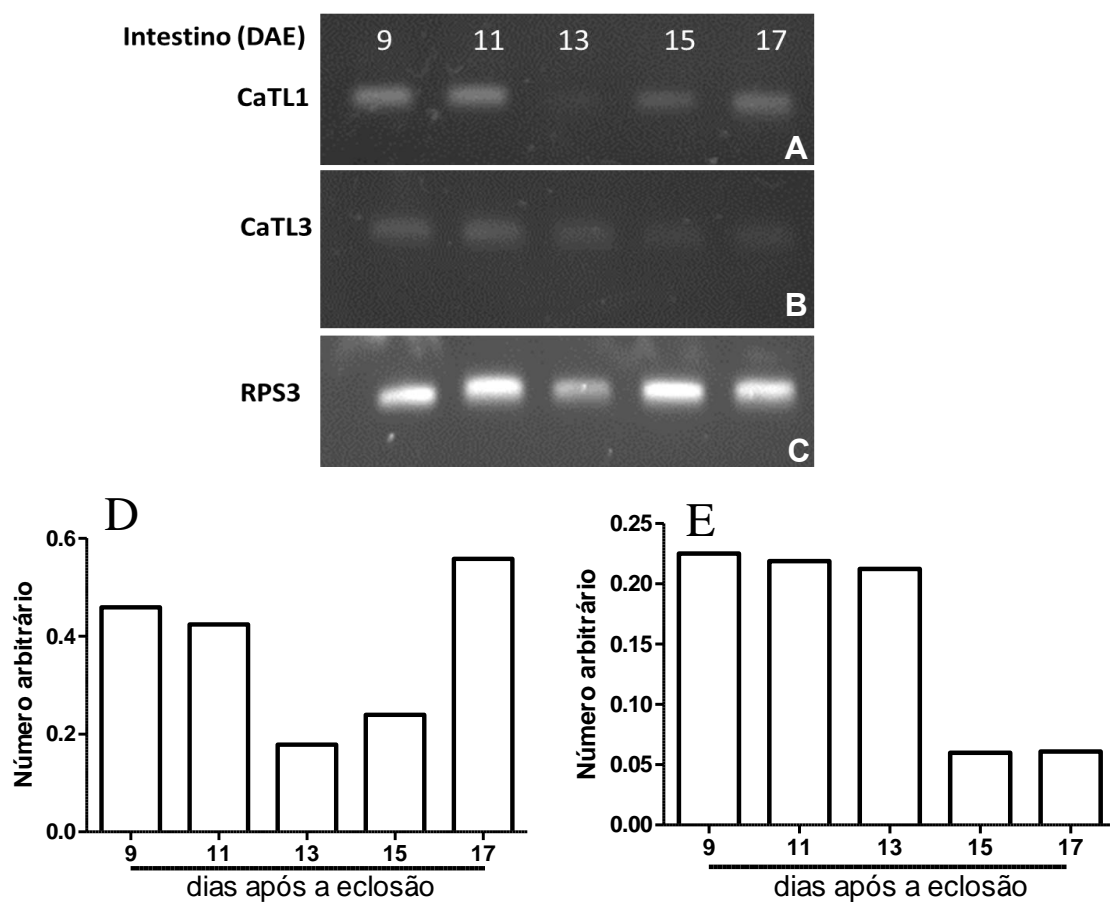


Fig. 21 - Análise da transcrição das CaTL1 e CaTL3 em intestinos de larvas de *T. castaneum* ao longo do desenvolvimento. O RNA do intestino de larvas de 9, 11, 13, 15 e 17 DAE foi extraído, o cDNA foi sintetizado e a reação de PCR foi realizada com 25 ciclos. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose. **A:** CaTL1; **B:** CaTL3; **C:** RPS3; **D:** densitometria das bandas do gel da CaTL1; **E:** densitometria das bandas do gel da CaTL3;

4.11 - Silenciamento da catepsina L3 em fêmeas e larvas microinjetadas

Para a realização do silenciamento da CaTL3 pupas foram sexadas e mantidas separadas até emergirem como adultos. Fêmeas adultas virgens foram microinjetadas com a dsRNA específica para a CaTL3. Como controle, fêmeas foram microinjetadas com o mesmo volume de PBS. Após a injeção, as fêmeas foram colocadas junto com os machos. Os ovos postos por essas fêmeas foram coletados e contados a cada 24 horas, durante 4 dias. Nossos resultados mostraram uma grande redução na oviposição de fêmeas que foram microinjetadas com a dsRNA para a CaTL3 em relação as fêmeas que foram injetadas somente com PBS. Essa redução foi observada em todos os dias avaliados e chegou a aproximadamente 50% (Fig. 22A).

Além da oviposição, foi avaliada a eclosão de larvas. Para isso, 100 ovos foram colocados em farinha de trigo e as larvas foram contadas 9 DAE (Fig. 22B). Não observamos diferença na eclosão de larvas obtidas a partir de fêmeas injetadas com dsRNA para a CaTL3 e fêmeas microinjetadas com PBS, nesse estágio analisado.

Além do silenciamento em fêmeas adultas, realizamos a microinjeção em larvas 5 DAE da dsRNA da CaTL3 na concentração de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ em um volume de 20 nl. Larvas provenientes dos ovos de fêmeas injetadas e larvas injetadas com dsRNA para a CaTL3 foram fotografadas e medidas 11 DAE. Não foi observada diferença no tamanho de larvas obtidas a partir de fêmeas microinjetadas com dsRNA para a CaTL3 ou larvas injetadas diretamente com a mesma dsRNA (Fig. 22C).

Para a confirmação do silenciamento, larvas 9 DAE foram dissecadas e seu intestino utilizado para a dosagem da atividade de proteases cisteínicas. Surpreendentemente houve um pequeno aumento da atividade de proteases cisteínicas no intestino de larvas obtidas a partir de fêmeas injetas com dsRNA para a CaTL3 (Fig. 23).

Para verificar o nível de expressão da CaTL3 e se houve silenciamento cruzado da CaTL1 foi realizado PCR do material extraído do intestino de larvas obtidas a partir ovos de fêmeas microinjetadas com dsRNA para a CaTL3 (Fig. 24A) e larvas microinjetadas 9 DAE (Fig. 24B). Através de análises por

densitometria dos géis observamos que, não houve alteração na amplificação da CaTL3 no intestino de larvas obtidas a partir de ovos postos por fêmeas microinjetadas, mostrando que não ocorreu silenciamento ou ele ocorreu de forma transitória (24B e 24E). Observamos uma redução de aproximadamente 40% da expressão CaTL3 no intestino de larvas microinjetadas com a dsRNA para a CaTL3 (24A e 24D). Não observamos alteração na amplificação da CaTL1 no intestino de larvas obtidas a partir de fêmeas microinjetadas ou em larvas microinjetadas com a dsRNA para a CaTL3 (Fig. 24D e 24E).

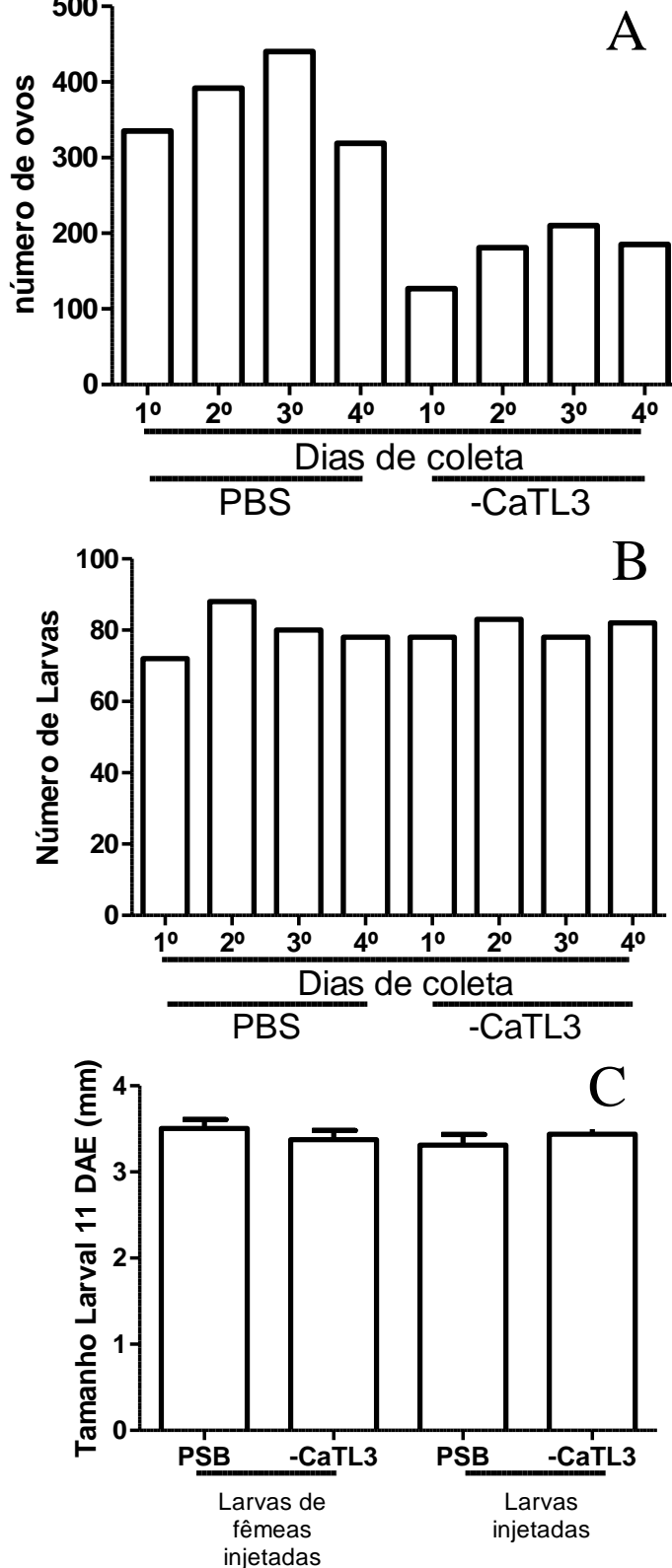


Fig. 22 – Contagem de ovos e larvas de fêmeas microinjetadas com dsRNA para a CaTL3 e avaliação do tamanho larval. Fêmeas foram microinjetadas com dsRNA específico para a CaTL3 (-CaTL3) ou PBS e colocadas junto com os machos. A: Ovos foram coletados e contados por 4 dias a cada 24 horas. B: avaliação da eclosão dos ovos de fêmeas microinjetadas. Para a avaliação da eclosão, 100 ovos de cada dia foram colocados em farinha de trigo e 9 DAE larvas foram contadas. C: avaliação do tamanho das larvas obtidas a partir dos ovos de fêmeas microinjetadas com dsRNA e larvas microinjetadas para a dsRNA. Larvas 11 DAE foram fotografadas e medidas com o programa Image J.

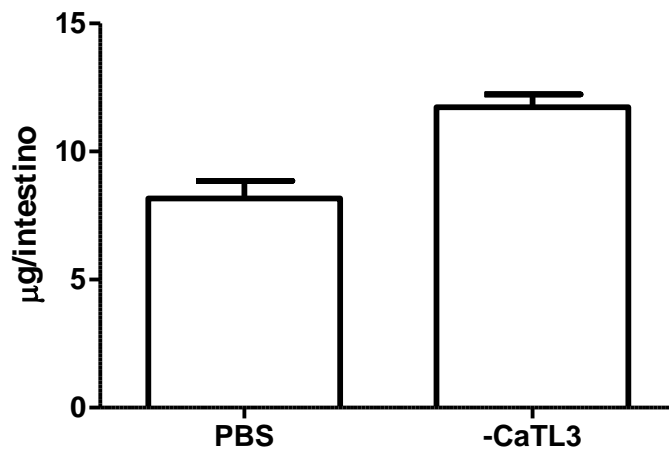


Fig. 23 - Atividade de proteases cisteínicas no intestino de larvas obtidas de fêmeas injetadas com dsRNA para a CaTL3. O intestino de larvas 9 DAE foi dissecado e utilizado na dosagem de proteases cisteínicas. O substrato utilizado foi a azocaseína.

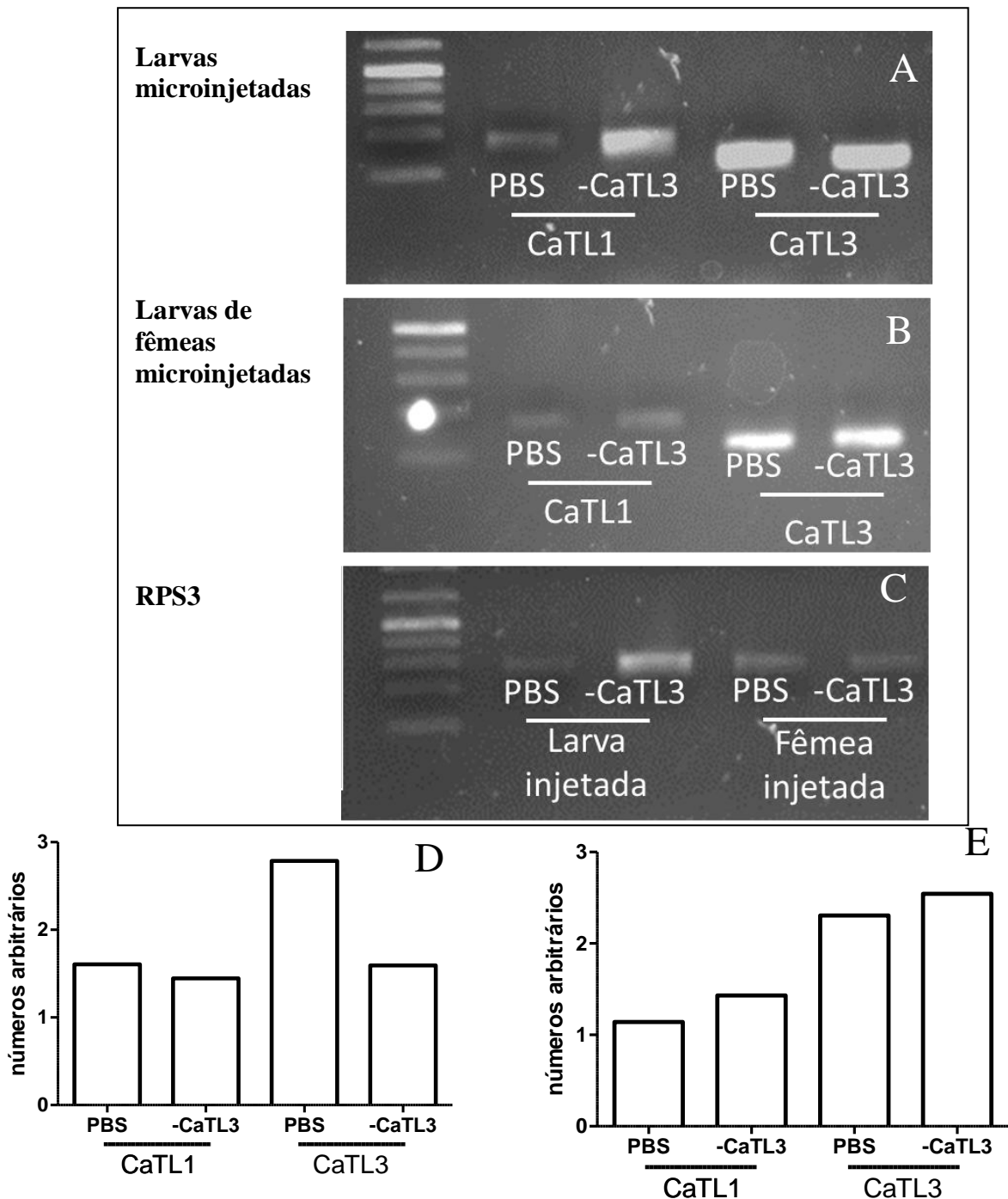


Fig. 24 – Análise da transcrição da CaTL1 e 3 no intestino de larvas obtidas a partir de fêmeas microinjetadas com dsRNA para a CaTL3 e larvas microinjetadas. O intestino de larvas 9 DAE foi dissecado e usado na extração de RNA e PCR utilizando primers para a CaTL1, CaTL3 e RPS3. **A**, gel de agarose do PCR da CaTL1 e 3 do intestino de larvas injetadas com dsRNA para a CaTL3; **B**, gel de agarose do PCR da CaTL1 e 3 do intestino de larvas obtidas de fêmeas injetadas com dsRNA para a CaTL3; **C**, gel de agarose do gene constitutivo RPS3 usando como amostra o intestino de larvas controle (PBS), larvas microinjetadas ou larvas obtidas de fêmeas microinjetadas; **D**, densitometria do gel A; **E**, densitometria do gel B; A densitometria foi realizada através do programa ImageJ onde a amplificação dos genes alvos (CaTL1 e 3) foi dividida pela amplificação do gene constitutivo RPS3 correspondente de cada amostra.

5 - Discussão

As sementes são a base da alimentação animal e estima-se que no mundo, inclusive no Brasil, grande parte das sementes coletadas seja perdida durante o processo de armazenamento, principalmente devido ao ataque de insetos bruquídeos (Moura *et al.*, 2007). Essas perdas alcançam percentuais de mais de 10% em países sub desenvolvidos e em desenvolvimento, levando a prejuízos econômicos de milhões de dólares (Lorini, 2002). Embora o uso de inseticidas ainda seja o principal método de controle para grandes infestações, problemas ambientais como contaminação do solo e alimentar, intoxicação animal, pouca eficiência de proteção são pontos que se contrapõem à utilização desses compostos (Lorini, 1998). Dentre as novas técnicas propostas para o controle dessas pragas está a utilização de compostos naturais, principalmente oriundos de plantas, associados a técnicas de biologia molecular para a geração de plantas mais resistentes a esses ataques. Para que essas novas abordagens de controle tenham êxito, estudo aprofundado sobre a fisiologia dos insetos praga, bem como sobre seu comportamento e adaptação frente a mudanças alimentares são de fundamental importância.

Tribolium castaneum é uma praga que causa grandes perdas econômicas na área alimentícia por atacar grãos estocados e alimentos industrializados como biscoitos, farinhas, rações, etc. (Lorini, 1998). Até os dias atuais o principal método de proteção contra o ataque de *T. castaneum* ainda é à base de defensivos químicos (Lorini, 1998). Entretanto a eficiência dos inseticidas contra esse inseto é cada vez mais questionada por causa do aparecimento de populações de insetos resistentes e principalmente pela contaminação alimentar (Lorini, 1998). Sendo assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos que visem novas técnicas de controle dessa praga. O entendimento dos requerimentos nutricionais assim como o efeito de diferentes dietas no ciclo de vida do *T. castaneum* pode fornecer ferramentas para o desenvolvimento de novas estratégias de controle. Baseado nisso, o objetivo desse projeto foi avaliar os efeitos de diferentes dietas contendo farinhas de sementes de trigo, *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* sobre o desenvolvimento de *T. castaneum*, bem como identificar algum composto químico com potencial para o controle desse inseto.

Em geral, *T. castaneum* pode se desenvolver em alimentos contendo diferentes níveis nutricionais, contudo, para um crescimento ótimo, eles necessitam de uma dieta relativamente balanceada. Trabalhos anteriores têm mostrado que variações na quantidade e qualidade dos nutrientes da dieta podem promover grandes efeitos no desenvolvimento de insetos, inclusive de *T. castaneum* (Fields, 2006; Ming and Cheng, 2012; Wong and Lee, 2011; Razmjou *et al.*, 2013).

Os resultados da composição dos principais macronutrientes, carboidratos, triacilgliceróis e proteínas das sementes em estudo estão de acordo com o previamente descrito na literatura. As farinhas das sementes de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris* apresentaram uma alta concentração de proteínas, principalmente albuminas e globulinas, quando comparadas às sementes de trigo, que são ricas em glutelinas (Belderok *et al.*, 2000). Jae *et al.* (2004) relataram que em cultivares de *G. max* a quantidade de proteína total pode chegar a 43% do seu conteúdo. As sementes de *G. max* também mostraram a maior concentração de triglicerídeos. Os carboidratos totais pouco variaram na maioria das amostras, com exceção do cotilédono de que apresentou uma concentração significativamente superior.

Com relação ao comportamento do inseto nas diferentes dietas, nossos resultados mostraram uma considerável variação nos parâmetros de desenvolvimento analisados como desenvolvimento larval, formação de pupas, emergência de adultos e sobrevivência em diferentes dietas, inclusive em dietas a base de farinhas de trigo.

Quando larvas foram alimentadas com proteínas de *G. max*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* marcadas com FITC misturadas a farinha de trigo foi observada uma alta fluorescência no intestino dessas larvas. Estes resultados demonstram que as larvas de *T. castaneum* não conseguem distinguir entre os componentes da dieta, podendo se alimentar de diferentes farinhas ou de uma mistura de farinhas. Isso pode validar uma estratégia de controle em que se vise a incorporação de farinhas tóxicas ou compostos tóxicos ao alimento natural do inseto. Este método de controle poderia representar uma alternativa menos agressiva do que a aplicação de inseticidas em alimentos.

Trabalhos anteriores mostraram que frações ricas em proteínas de sementes foram tóxicas para vários insetos pragas (Hou *et al.*, 2004a, 2004b, Fields, 2006). Uma fração rica em proteínas de *Pisum sativum* misturada com trigo foi tóxica para nove diferentes insetos coleópteros, incluindo *T. castaneum*. Frações ricas em proteínas foram mais tóxicas que frações ricas em fibras ou amido (Fields, 2006). Uma mistura de extrato de neem (*Azadirachta indica*) e uma fração rica em proteína de *Pisum sativum* atuou de forma sinérgica contra o *T. castaneum* (Hou *et al.*, 2004a). Uma combinação de uma fração rica em proteína de *Pisum sativum* e parasitoides reduziu a população de *Sitophilus oryzae* e *Cryptolestes ferrugineus* para 98% e 75%, respectivamente (Hou *et al.*, 2004b).

Foi observada uma redução da sobrevivência de larvas 11 DAE mantidas em duas farinhas de trigo, *V. unguiculata* e *P. vulgaris*. Como as larvas de *T. castaneum* recém-eclodidas são muito pequenas e ficam misturadas à farinha, cujos grãos são facilmente confundidos com as larvas recém eclodidas, a verificação da eclosão se tornou inviável. Desta forma não foi possível distinguir ovos que não eclodiram e larvas que morreram antes de 11 DAE. Para tentar minimizar esse problema e identificar possíveis interferências na formação da larva, foi realizada a análise do desenvolvimento embrionário. Nossos resultados mostraram não haver alterações significativas na embriogênese em ovos mantidos nas diferentes farinhas. Isso confirma que a mortalidade realmente ocorreu após a eclosão. Além disso, dados da literatura indicam que a porcentagem de eclosão de ovos de *T. castaneum* mantidos a 30°C é próxima a 88% (Bucher, 2006). Valores aproximados aos citados na literatura foram observados nos nossos resultados de número de larvas 11 DAE alimentadas com farinha de trigo 1.

Embora o besouro *T. castaneum* seja conhecido por se desenvolver em diversas dietas, as dietas a base de farinha de trigo são consideradas preferenciais para o seu desenvolvimento. Entretanto, os níveis de infestação de sementes e alimentos a base de trigo podem variar enormemente em diferentes variedades ou cultivares dessas sementes (Renteria *et al.*, 2000; Bostan e Naeem, 2002; Nehra *et al.*, 1985; Ali *et al.*, 2011). Os dados obtidos no nosso trabalho estão de acordo com essas observações da literatura. Estudando 4 farinhas de trigo de fabricantes diferentes, nós observamos que

algumas dessas farinhas provocam altas taxas de mortalidade larval. Aproximadamente 55% das larvas alimentadas com farinha de trigo 4 estavam mortas 17 DAE. Dentre as dietas a base de leguminosas, a dieta mais tóxica foi a farinha de *P. vulgaris* que matou 100% das larvas 17 DAE. O crescimento larval foi reduzido em todas as dietas quando comparadas ao crescimento de larvas alimentadas com a farinha de trigo 1. Além disso, foi observado um atraso na formação de pupas. Esses dados demonstram que o *T. castaneum* é sensível a variações na composição da alimentação. Ming e Cheng (2012) demonstraram que o tamanho de larvas, o tempo de desenvolvimento e o peso de adultos de machos de *T. castaneum* alimentados com diferentes quantidades de nutrientes variou significativamente. Já o enriquecimento da dieta com extrato de levedura melhorou consideravelmente o desenvolvimento do inseto (Sokoloff *et al.*, 1966). Wong e Lee (2011) demonstraram uma relação entre a quantidade de proteína e carboidratos em uma dieta e a emergência de adultos. Nesse trabalho eles demonstraram que a emergência de adultos aumentou significativamente em dietas ricas em proteínas e diminuiu em dietas ricas em carboidratos. O canibalismo de ovos promovido por larvas de *T. castaneum* também variou grandemente de acordo com a dieta (Via, 1999). Nesse trabalho o autor sugere que esse comportamento seria resultado da tentativa da larva de compensar alguma deficiência nutricional (Via, 1999). Machos de *T. castaneum* alimentados com dietas de baixo valor nutricional também tiveram a produção do feromônio 4, 8-dimethyldecanal reduzida (Ming e Lewis, 2010). A redução na qualidade da dieta ou privação alimentar, além de causar redução no peso larval e atraso na emergência de adultos, ainda contribuiu para aumentar a infestação de fungos no ambiente onde se encontrava o *T. castaneum* (Lord, 2010). Óleos essenciais de folhas de espécies de *Chrysanthemum* também afetaram os índices nutricionais de *Tribolium confusum* (Haouas *et al.*, 2012).

Parâmetros do ciclo de vida de outros insetos também se mostraram sensíveis às mudanças na dieta. Dietas contendo ervilha, feijões ou tomate interferiram no tempo de desenvolvimento de larvas e pupas e na fertilidade de fêmeas de *Helicoverpa armigera* (Razmjou *et al.*, 2013). Dietas contendo *Triticum aestivum*, *Phoenix dactylifera*, *Sorghum vulgare* e *Hordeum vulgare*

interferem diferentemente no peso larval, mortalidade, formação de pupas e emergência de adultos de *Plodia interpunctella* (Bouayad *et al.*, 2008).

O amido é considerado um dos principais componentes da dieta do inseto *T. castaneum*, visto que esse açúcar pode representar até 60% do peso seco das sementes de alguns cultivares de trigo (Sramková *et al.*, 2009). Insetos que se alimentam de grãos ricos em amido dependem da atividade de carboidrases, dentre elas α -amilases, para o sucesso da digestão e aproveitamento desses compostos como fonte de energia. Desta forma essas enzimas são consideradas essenciais para o crescimento e desenvolvimento desses insetos. A atividade de α -amilase foi então determinada ao longo do desenvolvimento em larvas alimentadas com farinha de trigo 1, farinha de trigo 2 e *G. max* e também foi determinada em larvas 15 DAE alimentadas com *V. unguiculata* e *P. vulgaris*. As únicas dietas que causaram redução na atividade da α -amilase foram o trigo 2 para larvas 19 DAE e a farinha de *P. vulgaris* misturada com farinha de trigo 1. A redução da atividade em larvas alimentadas com a farinha de *P. vulgaris* 50% foi confirmada quando realizamos também a dosagem de atividade por eletroforese. Vimos ainda que essa redução foi principalmente na isoforma com menor peso molecular. Em *P. vulgaris* já foram identificados inibidores de α -amilase que possuem um efeito negativo sobre o desenvolvimento de bruquídeos levando a uma redução no crescimento larval (Ishimoto e Kitamura, 1989; Pueyo *et al.*, 1995, Moreno e Chrispeels, 1989). A não sobrevivência das larvas em dieta à base de *P. vulgaris*, observada em nosso trabalho, pode ser devida à inibição da atividade dessa enzima causada por inibidores presentes na farinha.

Outra classe de enzimas bastante importante no desenvolvimento de insetos é a das proteases. Conseqüentemente a inibição dessas enzimas pode causar grande impacto no ciclo de vida dessas pragas. Em alguns coleópteros a maior parte da atividade de proteases detectadas é do tipo cisteínica, seguida das proteases serínicas (Oppert *et al.*, 2003). Trabalhos anteriores mostraram que a digestão de proteínas em larvas de *T. castaneum* é feita principalmente por proteases cisteínicas, localizadas no intestino anterior, cujo pH é conhecidamente ácido, com uma pequena contribuição de proteases serínicas

do intestino posterior onde o pH é alcalino (Oppert *et al.*, 2005; Vinokurov *et al.*, 2009).

Baseados nesses dados, as atividades dessas proteases foram detectadas em larvas desenvolvidas em farinha de trigo e *G. max* ao longo de todo o desenvolvimento larval. Nossos resultados mostraram que a atividade das proteases cisteínicas foi reduzida principalmente em larvas alimentadas com 100% de *G. max*. Uma redução na atividade de proteases serínicas em larvas alimentadas com *G. max* até o 13 DAE também foi observada. Surpreendentemente larvas alimentadas com *G. max* na concentração de 50% tiveram a atividade de proteases serínicas aumentada do 19^o ao 21^o DAE. Acreditamos que esse aumento pode se dever a um efeito compensatório já demonstrado em outros trabalhos, onde a alimentação com fontes contendo inibidores de proteases provoca o aumento da transcrição das proteases como um mecanismo de tentar compensar a inibição (Oppert *et al.*, 2005).

Para confirmar que a redução da atividade vista em larvas alimentadas com *G. max* foi devida aos inibidores presentes nessa semente, realizamos a incubação do extrato do intestino de larvas com o extrato de farinha de *G. max* seguido do ensaio de atividade de proteases serínicas e cisteínicas. A atividade das duas classes de proteases intestinais de *T. castaneum* foi reduzida na presença do extrato de *G. max*. Como a atividade de proteases cisteínicas é cerca de 10 vezes maior que a de proteases serínicas, partimos então com a estratégia de isolar um possível inibidor de protease cisteínica através de cromatografia de afinidade a papaína. Surpreendentemente, quando realizamos, por espectrometria de massas, a análise das 3 bandas protéicas majoritárias retidas na coluna de afinidade, obtivemos similaridade de duas bandas com um inibidor de *G. max* do tipo Kunitz, um clássico inibidor de proteases serínicas (Kunitz, 1945). A terceira banda, com massa molecular inferior, apresentou similaridade com papaína, mostrando que nosso método de eluição também eluiu a papaína ligada a Sepharose.

Como esperado, a fração enriquecida com o inibidor foi capaz de inibir a atividade de proteases serínicas e cisteínicas presentes no intestino das larvas de *T. castaneum*. As proteases serínicas e cisteínicas puras, usadas como controle positivo (tripsina e papaína respectivamente), também tiveram suas atividades inibidas pela fração retida na coluna de afinidade. Um caso similar

de um inibidores com dupla função sobre a inibição de proteases cisteínicas e serínicas foi relatado na literatura. Oliveira *et al.* (2007) purificaram um inibidor do tipo kunitz de sementes de *Pithecellobium dumosum* que também foi capaz de inibir ambas as classes de proteases. Esse inibidor foi capaz de reduzir a atividade de proteases digestivas de vários insetos praga como *Zabrotes subfasciatus*, *Ceratitidis capitata*, *Plodia interpunctella*, *Alabama argillaceae* e *Callosobruchus maculatus* (Oliveira *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos têm demonstrado a influência negativa de inibidores de proteases nos processos digestivos de insetos pragas. Os dados obtidos no nosso trabalho sobre a existência, em sementes de *G. max*, de um inibidor de proteases, com dupla função de inibição e que foi eficiente contra proteases cisteínicas e serínicas do intestino de *T. castaneum*, apontam para uma alternativa promissora para futuros estudos do controle dessa praga. A estratégia de inibir simultaneamente as duas proteases mais importantes para a digestão do inseto pode reduzir a capacidade de adaptação dos insetos quando são alimentados com inibidores de somente uma das classes (Oliveira *et al.*, 2007). Embora esse dado seja promissor, um conhecimento mais aprofundado sobre a importância dessas proteases na digestão e ainda nas mais diversas fases de vida do *T. castaneum*, é fundamental para a validação da eficiência dessa estratégia.

No ranking de expressão e transcrição de proteínas no intestino de larvas de *T. castaneum* elaborado através de proteoma e transcriptoma (Morris *et al.*, 2009) as CaTL 1, 2 e 3 são as proteases com maior transcrição, sendo que entre elas a CaTL3 tem o maior nível. Tem sido demonstrado que essas proteases tem importante papel em diversos processos fisiológicos de insetos, além da digestão (Hegedus *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006; Kageyama e Takahashi, 1990; Matsumoto *et al.*, 1997). Em um trabalho utilizando *T. molitor* como modelo foi demonstrado que cada uma das isoformas dessa protease é transcrita diferencialmente de acordo com o estágio de desenvolvimento ou tecido (Cristofolletti *et al.*, 2005).

Para demonstrar a localização da transcrição de cada uma das isoformas foi realizada a análise de suas transcrições em diversos estágios de desenvolvimento do inseto e em diferentes tecidos. A transcrição da CaTL1 foi observada em todos os tecidos analisados, inclusive em tecidos onde não

há alimentação, como ovos e pupa. Isso demonstra que essa protease tem papéis que vão além do processo digestivo clássico de alimentos. Uma possibilidade é que a protease expressa em ovos possa estar envolvida na degradação do vitelo durante o desenvolvimento embrionário, como já descrito para outros insetos (Kageyama e Takahashi, 1990; Takahashi *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994). Durante o estágio de pupa, alguns processos podem requerer a atividade de proteases, como o remodelamento tecidual. Trabalhos prévios tem demonstrado que a CaTL possui papel importante durante esse processo (Kurata *et al.*, 1992; Homma *et al.*, 1994; Hegedus *et al.*, 2002).

Apesar da CaTL2 ter sido descrita previamente como tendo uma alta transcrição no intestino (Morris *et al.*, 2009), no nosso trabalho não conseguimos detectá-la em nenhum dos estágios e tecidos analisados. Isso pode ser explicado pelo fato de não termos feito análise da transcrição no intestino de larvas com idades inferior a 9 DAE ou superior a 17 DAE. Como no trabalho realizado por Morris *et al.* (2009), não é descrita a idade das larvas utilizadas no transcriptoma, não temos como saber a fase larval onde foi observada essa alta transcrição de CaTL2.

CaTL3 é a protease descrita com tendo a maior transcrição no intestino de larvas de *T. castaneum* (Morris *et al.*, 2009). Em nossos resultados nós observamos que a transcrição dessa enzima somente foi detectada no intestino das larvas. Em *Tenebrio molitor* existe uma isoforma da catepsina L que também é expressa exclusivamente no intestino. Isso pode indicar que essa isoforma tem papel exclusivo na digestão.

Para demonstrar a importância da CaTL3 durante o desenvolvimento do *T. castaneum*, realizamos o seu silenciamento utilizando a técnica de RNA de interferência, já bastante estabelecida neste modelo (Posnien *et al.*, 2009). Quando realizamos o silenciamento da CaTL3 em fêmeas adultas, somente observamos fenótipo diferente ao controle com relação a oviposição. Observamos uma redução do número de ovos em torno de 50% em fêmeas silenciadas para a CaTL3. Com relação ao desenvolvimento de larvas obtidas a partir desses ovos, não foi observada nenhuma diferença fenotípica em relação às larvas controle. Também não houve diminuição na atividade de proteases cisteínicas e nem na expressão da CaTL3 no intestino dessas larvas. Esses resultados mostram que o silenciamento não ocorreu nessa fase de vida ou

não ocorreu de modo parental. O silenciamento pode ter ocorrido somente nas próprias fêmeas injetadas, já que o único fenótipo visualizado foi na oviposição. A utilização de dsRNA maiores ou concentrações superiores são alternativas a serem testadas no futuro. Para obtermos um silenciamento específico para essa isoforma foi necessário o desenho de primers que geram amplicons em torno de 100 pb. Já foi demonstrado que, em insetos, dupla fita de RNAs grandes são mais eficazes em induzir o silenciamento, apesar de ainda não haver uma relação direta (Belles, 2010). Experimentos visando a análise da expressão em fêmeas injetadas, ovos e em fases do ciclo de desenvolvimento larval inferior a 9 DAE também são necessários para confirmar se houve ou não silenciamento em algum desses estágios. Outra possibilidade para a não observação do silenciamento é que pode ter ocorrido uma redução na expressão transitória.

Também realizamos a injeção da dsRNA para a CaTL3 em larvas 5 DAE e com essa estratégia observamos uma redução de aproximadamente 40% da expressão da CaTL3 no intestino de larvas 9 DAE, ou seja 4 dias após a injeção. Embora tenha havido o silenciamento não observamos alteração no tamanho larval. Nenhum silenciamento cruzado da expressão da CaTL1 no intestino de larvas microinjetadas foi observado, mostrando que o silenciamento foi específico para a CaTL3.

O estudo de parâmetros nutricionais diante de diferentes dietas assim como o comportamento e/ou a falta de proteínas tão importantes, como as enzimas digestivas, para o desenvolvimento de um inseto pode fornecer ferramentas para o desenvolvimento de estratégias de controle desse besouro.

6 - Conclusões

- As larvas de *T. castaneum* ingerem indiscriminadamente dietas de diferentes origens, não fazendo distinção entre as farinhas de trigo, *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris*;
- As diferentes dietas não interferiram no desenvolvimento embrionário do *T. castaneum*;
- Embora sementes de trigo sejam o alimento preferencial de *T. castaneum* farinha de trigo de diferentes origens afetaram negativamente alguns parâmetros de desenvolvimento como sobrevivência das larvas e pupas;
- A sobrevivência, tamanho das larvas e a formação de pupas também foram afetados pelas diferentes dietas, principalmente pelas compostas por 100% de farinhas de *G. max*, *V. unguiculata* e *P. vulgaris*;
- As atividades de proteases serínicas e cisteínicas de *T. castaneum* se mostraram mais baixas em larvas alimentada com a farinha de *G. max*;
- Uma fração enriquecida com um inibidor de proteases foi isolada a partir da farinha de cotilédones de *G. max*. Esse inibidor teve a capacidade de inibir, *in vitro*, proteases serínicas e cisteínicas do intestino de larvas de *T. castaneum*, além das enzimas puras tripsina e papaína;
- Análise por espectrometria de massas mostrou que a sequência de aminoácidos de duas bandas presentes nessa fração enriquecida com inibidor são idênticos ao inibidor do tipo Kunitz de *G. max*;
- A análise da transcrição da protease cisteínica CaTL1 demonstrou que essa enzima está presente em todos os estágios de desenvolvimento e tecidos de *T. castaneum* analisados;
- A transcrição da protease cisteínica CaTL2 não foi observada em nenhum dos tecidos e tempos analisados;
- A análise da transcrição da CaTL3 demonstrou que ela é expressa exclusivamente no intestino das larvas de *T. castaneum*;

- Somente observamos o silenciamento da CaTL3 em larvas microinjetadas, porém não foi observada nenhuma alteração fenotípica em comparação às larvas controle;

7 - Referências

- Aguiar JM, Franco OL, Rigden DJ, Bloch C Jr, Monteiro AC, Flores VM, Jacinto T, Xavier-Filho J, Oliveira AE, Grossi-de-Sá MF, Fernandes KV, 2006. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. [Proteins](#) 15, 662-70
- Ahmad FU, 1980. Insect pests and their control in stored wheat. *Pak Agric* 3, 9-10
- Alanko K, Tuomi T, Vanhanen M, Backas MP, Kanerva L, Havu K, Saarinen, Bruynzeel DP, 2000. Occupational IgE-mediated allergy to *Tribolium confusum* (confused flour beetle). *Allergy* 55, 879-882
- Ali A, Sarwar M, Khanzada S, Abro GH, 2011. Evaluating resistance of wheat germplasms to attack by red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera). *Pak J Zool* 43, 793-797
- Alves M, Chaves I, Carrilho D, Veloso M, Ricardo CP, 2010. Detection of novel trypsin inhibitors in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* seeds. *J Plant Physiol* 167, 848–854
- Ameen MU, Rahman MF, 1973. Larval and adult digestive tracts of *Tribolium castaneum* (herbst) (coleoptera: tenebrionidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 2, 137-152
- Amirhusin B, Shade RE, Koiwa H, Hasegawa PM, Bressan RA, Murdock LL, Zu-Salzman K, 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *J Insect Physiol* 53, 734–74
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, 2004. Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier Academic Press
- Belchol FS, Teixeira IRV, 2007. Preferência alimentar, performance e aceitabilidade de *Tribolium castaneum* (coleóptera, tenebrionidae) na farinha de soja integral. *Revista Analytica* 28, 38-41
- Belderok B, Mesdag H, Donner DA, 2000. Bread-Making Quality of Wheat. Springer, New York
- Belles X, 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects. *Annual. Review of Entomology* 55, 11–28

- Bostan N, Naeem M, 2002. Evaluating Resistance of Wheat Germplasms to Attack by Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera). Asian Journal of Plant Sciences 1, 95-98
- Bouayad N, Rharrabe K, Ghailani N, Sayah F, 2008. Effects of different food commodities on larval development and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera:Pyralidae). J Stored Prod Res 44, 373–378
- Bown DP, Wilkinson S, Gatehouse JA, 2004. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. Physiol Entomol 29, 278–290
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72, 248–254
- Broekgaarden C, Snoeren TAL, Dicke M, Vosman B, 2011. Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. Plant Biotechnology Journal 9, 819–825;
- Broehan G, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan, Merzendorfer H, 2010. Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: A role in molting revealed by RNA interference. Insect Biochem Mol Biol 40 274-283
- Bowles DJ, 1990. Defense-related proteins in higher plants. Annual review of biochemistry 59, 873-907
- Bucher G., 2006. The Beetle Book;
- Carlini CR, Grossi-de-Sá MF, 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40, 1515-1539
- Chapman RF, 1998. The Insects: Structure and Function. Cambridge University Press 4th edition
- Chen MS, Feng G, Zen KC, Richardson M, Valdes-Rodriguez S, Reeck GR, Kramer KJ, 1992. α -amylases from three species of stored grain coleopteran and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. Insect Biochem Mol Biol 22, 261–268

- Chougule NP, Doyle E, Fitches E, Gatehouse JA, 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assay. *J Insect Physiol* 54, 563–572
- Cristofoletti PT, Ribeiro AF, Terra WR, 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 883-901
- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 245: 3059-3065.
- D'Alessandro M, Turlings TCJ, 2006. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *Analyst* 131, 24–32
- Demartini DR, Wlodawer A, Carlini CR, 2007. A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. *J Exp Bot* 58, 521–532
- Fields PG, 2006. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. *J Stored Prod Res* 42, 86-96
- Fonseca FPP, Soares-Costa A, Ribeiro AF, Rosa JC, Terra WR, Henrique-Silva F, 2012. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (SI-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. *Insect Biochem Mol Biol* 42, 58-69
- Franco OL, Santos RC, Batista JAN, Mendes ACM, Araujo MAM, Monnerat RG, Grossi-de-Sa MF, Freitas SM, 2003. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* 63, 343-349
- Galasso I, Piergiovanni AR, Lioi L, Campion B, Bollini R, Sparvoli F, 2009. Genome organization of Bowman–Birk inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* 23, 617–624
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C, 2002. *Entomologia agrícola, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz* 10, 920;

- Guerra MS, 1985. Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos. Brasília: Embrater, 166
- Guglielminetti L, Loreti E, Perata P, Alpi A, 1999. Sucrose synthesis in cereal grains under oxygen deprivation. *J Plant Res* 112, 353–359
- Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasp Rzykowski R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerzak E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskolski M, Grubb A, 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica* 48, 1-20
- Haouas D, Cioni PL, Halima-Kamel MB, Flamini G, Hamouda MHB, 2012. Chemical composition and bioactivities of three *Chrysanthemum* essential oils against *Tribolium confusum* (duVal)(Coleoptera: Tenebrionidae). *J Pest Sci* 85, 367–379
- Hegedus D, O’Grady M, Chamankhah M, Baldwin D, Gleddie S, Braun L, Erlandson M, 2002. Changes in cysteine protease activity and localization during midgut metamorphosis in the crucifer root maggot (*Delia radicum*). *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1585–1596
- Hildebrandt A, Bickmeyer I, Kuhnlein RP, 2011. Reliable drosophila body fat quantification by a coupled colorimetric assay. *Plos One* 6, 1-6
- Homma K, Kurata S, Natori S, 1994. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs. *J Biol Chem* 269, 15258–15264
- Hou XP, Fields P, Taylor, 2004a. Combination of protein-rich pea flour and pea extract with insecticides and enzyme inhibitors for control of stored-product beetles. *Can Entomol* 136, 581-590
- Hou XP, Fields P, Flinn J, Perez-Mendoza, Baker J, 2004b. Control of stored-product beetles with combinations of protein-rich pea flour and parasitoids. *Environ Entomol* 33, 671-680
- Howe GA, Schaller A, 2008. Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores. *Induced Plant Resistance to Herbivory*, Chapter 1

- Ishikawa A, Ohta S, Matsuoka K, Hattori T, Nakamura KA, 1994. Family of Potato Genes That Encode Kunitz-Type Proteinase-Inhibitors - Structural Comparisons and Differential Expression. *Plant Cell Physiol* 35, 303-312
- Ishimoto M, Kitamura K, 1989. Growth inhibitory effects of alpha amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L) on 3 species of bruchids (Coleoptera, Bruchidae). *Appl Ent Zool* 24, 281–286
- Jae HL, Marjory R, Ronald JF, Steve K, Marrtin ST, Steven, Schwartz J, Yae IV, 2004. Isoflavone characterisation and antioxidante activity of ohiosoy beans. *J Agric Food Chem* 52, 2647-2651
- Jbilou R, Amri H, Bouayad N, Ghailani N, Ennabili A, Sayah F, 2008. Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, a-amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). *Bioresource Technology* 99, 959–964
- Johnston K, Gatehouse J, Anstee JJ, 1993. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Physiology* 39, 657–64
- Johnson KS, Rabosky D, 2000. Phylogenetic distribution of cysteine proteinases in beetles: evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae. *Comp Biochem Physiol* 126, 609–619
- Jorge LAC, manejo integrado de pragas de grãos armazenado. Agronline. Disponível em: <www.agronline.com.br/artigos/manejo-integrado-pragas-graos-armazenados-identificacao-controle>. Acesso em: 10 de junho de 2012
- Kageyama, Takahashi, 1990. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *Eur J Biochem* 193, 203-210
- Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev* 198, 97-105
- Koiwa H, Shade RE, Zhu-Salzman K, Subramanian L, Murdock LL, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM, 1998. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal* 14, 371–379
- Kurata S, Saito H, Natori S, 1992. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *sarcophaga*. *Dev Biol* 153, 115–121

- Kunitz M, 1945. Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean. Science 101, 668-6697
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 . Nature 227, 680 - 685
- Laskowski MJR, Kato I, 1980. Protein inhibitors of proteinases. Annual Review Biochemistry 49, 593-626
- Law JH, Dunn PE, Kramer KJ, 1977. Insect proteases and peptidases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 45, 389-425
- Lawrence PL, Koundal KR, 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Eletronics Journal of Biotechnology 5, 93-109
- Lazzari SMN, Lazzari, FA, 2009. Insetos-praga de grãos armazenados. Biecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 667 – 721;
- Lewis WJ, Van Lenteren JC, Phatak SC, Tumlinson JH, 1997. A total system approach to sustainable pest management. Proc Natl Acad Sci USA 94, 12243–12248
- Liu J, Shi GP, Zhang WQ, Zhang GR, Xu WH, 2006. Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Insect Mol Biol 15, 823–834
- Liu ZL, Chu SS, Jiang GH, 2011. Toxicity of Schizonpeta multifida essential oil and its constituent compounds towards two grain storage insects. J Sci Food Agric 91, 905–909
- Loeck AE, 2002. Principais pragas que atacam produtos armazenados. In: Loeck, A. E. (ed.) Pragas de produtos armazenados. Pelotas, cap. 7, p.35-59;
- Lord JC, 2010. Dietary Stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*. J Econ Entomol 103, 1542-1546
- Lorini I, 1998. Controle Integrado de Pragas de Grãos Armazenados. Embrapa.
- Lorini I, 2002. Armazenagem de grãos. Campinas. IBG. 2002;
- Macedo MLR, 1993. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Comparative Biochemistry and Physiology 105, 88-94

- Macedo MLR, Garcia VA, Freire MGM, Richardson M, 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry* 68, 1104-1111
- Macedo ML, Durigan RA, da Silva DS, Marangoni S, Freire MG, Parra JR, 2010. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 73, 213-231
- Mares M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V, Baudys M, 1989. Primary Structure of Cathepsin-D Inhibitor from Potatoes and Its Structure Relationship to Soybean Trypsin-Inhibitor Family. *FEBS Lett* 251, 94-98
- Mariano FD, Santos S, Santos FF, 2006. Utilização de terra de diatomácea como alternativa no controle de insetos em grãos de trigo armazenados. *Revista Analytica* 24, 60-64
- Matsumoto I, Emori Y, Abe K, Arai S, 1997. Characterization of a gene Family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. *J Biochem* 121, 464-476
- Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 176, 1-15
- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Vrain T, Fong D, Yelle S, 1996. Response of digestive cysteine proteinases from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A. *Arch Insect Biochem Physiol* 31, 451-464
- Miller GL, 1959. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *J Anal Chem* 31, 426-428
- Ming QL, Lewis AM, 2010. Pheromone production by male *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) is influenced by diet quality. *J Econ Entomol* 103, 1915-1919
- Mikel C.E., Standish J., 1947. Suscetibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum* (Herbst). *Minn., Agric. Exp. Stn., Tech. Bull.* 178, 1-20
- Migliolo L, Construção de modelos de interação in silico e in vivo do inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L. para as enzimas cisteínicas e

- serínicas. Natal, RN: UFRN. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2008.
- Ming QL, Cheng C, 2012. Influence of nutrition on male development and reproduction in *Tribolium castaneum*. J Econ Entomol 105,1471-1476
- Moreno J, Chrispeels MJ, 1989. A lectin gene encodes the alpha amylase inhibitor of the common bean. Proc Natl Acad Sci 86, 7885–7889
- Morris K, Lorenzen MD, Hiromasa Y, Tomich JM, Oppert C, Elpidina EN, Vinokurov K, Jurat-Fuentes JL, Fabrick J, Oppert B, 2009. *Tribolium castaneum* Larval Gut Transcriptome and Proteome: A Resource for the Study of the Coleopteran Gut. J Proteome Res 8, 3889–3898
- Moura FT, Oliveira AS, Macedo LLP, Vianna A, Andrade LBS, Martins-Miranda AS, Oliveira JTA, Santos EA, Sales MP, 2007. Effects of a Chitin-Binding Vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* Seeds on Bean Bruchid Pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and Phytopathogenic Fungi (*Fusarium solani* and *Colletotrichum lindemuntianum*). J Agric Food Chem 55, 260-266
- Murugan M, Khan SA, Cardona PS, Orozco GV, Viswanathan P, Reese J, Starkey S, Smith CM, 2010. Variation of resistance in barley against biotypes 1 and 2 of the Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). J Econ Entomol 103, 938–948
- Nathan SS, 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insect. Frontiers in physiology 4, 1-17
- Nehra P, Sarin K, Sharma, 1985. Evaluation of certain parameters associated with categorization wheat varieties with regard to resistance to *Tribolium castaneum*. Herbst Bul Grain Technol 21, 211-216
- Neurath H, 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science 224, 350-357
- Oliveira AS, Migliolo L, Aquino RO, Ribeiro JKC, Macedo LLP, Andrade LBS, Santos EA, Kiyota S, Sales MP, 2007. Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity. J Agric Food Chem 55, 7342-7349
- Oliveira HD, Sousa DOB, Oliveira JTA, Carlini CR, Oliveira HP, Pereira ML, Rocha RO, Morais JKS, Gomes-Filho E, Vasconcelos IM, 2010. Gm-TX, a

- new toxic protein from soybean (*Glycine max*) seeds with potential for controlling insect pests. *Process Biochemistry* 45, 634–640
- Oppert B, Morgan TD, Culbertson C, Kramer KJ, 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol* 105, 379–385
- Oppert B, Morgan TD, Hartzler K, Lenarcic B, Galesa K, Brzin J, Turk V, Yoza K, Ohtsubo K, Kramer KJ, 2003. Effects of proteinase inhibitors on growth and digestive proteolysis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol* 134, 481–490
- Oppert B, Morgan TD, Hartzler K, Kramer KJ, 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol C* 140, 53–58
- Oppert B, Elpidina EN, Toutges M, Leighton SM, 2010. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. *Comp Biochem Physiol D* 5, 280–287
- Pacheco IA, Sartori MR, Taylor RWD, 1990. Levantamento de resistência de insetos-pragas de grãos armazenados à fosfina no Estado de São Paulo. *Coletânea ITAL* 20, 144-154
- Paes EV, Uchôa AF, Pinto MST, Silva CP, Fernandes KVS, Oliveira AEA, Xavier-Filho J, 2008. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. *Entomol Exp Appl* 129, 11–17
- Pereira RA, Jimenez AV, Magalhães CP, Prates MV, Melo JAT, Lima LM, Sales MP, Nakasu EYT, Silva MCM, Grossi-de-Sá MF, 2007. Effect of a Bowman-Birk proteinase Inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* Gut Proteinases *In Vitro*. *J Agric Food Chem* 55, 10714–10719
- Pimentel MAG, Faroni LDA, Silva FH, Batista MD, Guedes RNC, 2010. Spread of Phosphine Resistance among Brazilian Populations of Three Species of Stored Product Insects. *Neotropical Entomology* 39, 101-107

- Posnien N, Schinko J, Grossmann D, Shippy TD, Konopova B, Bucher G, 2009. RNAi in the Red Flour Beetle (*Tribolium*). Cold Spring Harbor Protocols 4, 1-8
- Pueyo JJ, Morgan TD, Ameenuddin N, Liang C, Reeck GR, Chrispeels MJ, Kramer KJ, 1995. Effects of bean and wheat alpha-amylase inhibitors on alpha-amylase activity and growth of stored-product insect pests. Entomol Exp Appl 75, 237–244
- Prabhakar S, Chen MS, Elpidina EN, Vinokurov KS, Smith CM, Marshall J, Oppert B. 2007. Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. Insect Mol Biol 16, 455–468
- Ranger, CM, Singh, AP, Johnson-Cicalese J, Polavarapu, S, Vorsa N, 2007. Intraspecific variation in aphid resistance and constitutive phenolics exhibited by the wild blueberry *Vaccinium darrowi*. J Chem Ecol 33, 711–729
- Razmjou J, Naseri B, Hemato AS, 2013. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera:Noctuidae) on various host plants. J Pest Sci DOI10.1007/s10340-013-0515-9
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ, Mero PS, 2006. The peptidase database. Nucleic Acids Research 34, 270-272
- Renteria-Gutierrez, Moreno-Martinez, Barron-Hoyos, 2000. Population growth of *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) in different wheat varieties and groups commercially produced in Sonora, Mexico. Southwestern Entomol 25, 213-220
- Richardson M, 1991. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. New York, Ademic Press 5, 259-305
- Robinson, 2005. Handbook of Urban Insects and Arachnids. Cambridge University Press
- Roush RT, Tabashnik BE, 1990. Pesticide resistance in arthropods. London: Chapman and Hall 303
- Ryan CA, 1991. Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Ann Rev Phytopathol 28, 425-449

- Sartori MR, Pacheco IA, Iaderoza M, Taylor RWD, 1990. Ocorrência e especialidade de resistência ao inseticida malatiom em insetos-praga de grãos armazenados, no estado de São Paulo. Coletânea ITAL 20, 194-154
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M, 2005. Insect-Plant Biology. New York: Oxford University Press
- Shaaya E, Kostjukovsky M, Eilberg J, Sukprakarn C, 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. J Stored Prod Res 33, 7-15
- Siqueira HAA; Guedes RNC, Picanço MC, 2000. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Applied Entomology. 124, 1-7
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150, 76-85
- Smith CM, Clement SL, 2012. Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods. Annu Rev Entomol 57, 309–28
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A, 1999. The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. The Plant Cell 11, 431-443
- Sokoloff A, Franklin IR, Overton LF, Ho FK, 1966. Comparative studies with *Tribolium* (Coleoptera, Tenebrionidae): productivity of *T. castaneum* (Herbst) and *T. confusum* Duv. on several commercially available diets. J Stored Prod Res 1, 295-311
- Sramková Z, Gregová E, Sturdíka E, 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. Acta Chimica Slovaca 2, 115 - 138
- Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS, 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cell Mol Biol Lett 11, 132-154
- Stamopoulos DC, 1991. Effects of four essential oil vapours on the oviposition and fecundity of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae): laboratory evaluation. J Stored Prod Res 27, 199-203
- Strukelj B, Pungercar J, Mesko P, Barlicmaganja D, Gubensek F, Kregar I, Turk V, 1992. Characterization of Aspartic Proteinase-Inhibitors from Potato at the Gene, Cdna and Protein- Levels. Biol Chem Hoppe-Seyler 373, 477-482

- Suh SG, Stiekema WJ, Hannapel DJ, 1991. Proteinase-Inhibitor Activity and Wound-Inducible Gene-Expression of the 22-Kda Potato-Tuber Proteins. *Planta* 184, 423-430
- Takahashi SY, Zhao XF, Kageyama T, Yamamoto Y, 1992. Acid cysteine proteinase from the eggs of silkworm, *Bombyx mori*: tissue distribution, developmental changes and the sites of synthesis for the enzyme. *Insect Biochem Molec Biol* 22, 369–377
- Terra WR, Cristofolletti PT, 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp Biochem Physiol* 113, 725–730
- Terra WR, Ferreira C, 2005. Biochemistry of Digestion. In Gilbert, L.I., Iatov, K., Gill, S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science* 4, 171-224
- Toutges MJ, Hartzler, Lord, Oppert B, 2010. Evaluation of Reference Genes for Quantitative Polymerase Chain Reaction across Life Cycle Stages and Tissue Types of *Tribolium castaneum*. *J Agric Food Chem* 58, 8948–8951
- Tribolium Genome Sequencing Consortium. The first genome sequence of a beetle, *Tribolium castaneum*, a model for insect development and pest biology. *Nature* 452, 949-955
- Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK, Kumar S, 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8,-Cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Econ Entomol* 94, 979-983
- Tscheche H, 1974. Biochemistry of natural proteinase inhibitors. *Angew Int Edn. Engl* 13, 10-28
- Ukeh DA., Umoetok SBA., 2011. Repellent effects of five monoterpenoid odours against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Calabar, Nigéria *Crop Protection* 30, 1351-1355
- Ussuf KK, Laxmi NH, Mitra R, 2001. Proteinase inhibitors: plant-derived genes as insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80, 847-853
- Valueva TA, Revina TA, Kladrinskaya GV, Mosolov V, 1998. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. *Febs Lett* 426, 131-134
- Via S, 1999. Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Heredity* 82, 267-275

- Vinokurov KS, Elpidina EN, Zhuzhikov DP, Oppert DK, Sehnal F, 2009. Digestive proteolysis organization in two closely related tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). Archives of insect biochemistry and physiology 70, 254–279
- Wang LF, Chai LQ, He HJ, Wang Q, Wang JX, Zhao XFA, 2010. A cathepsin L-like proteinase is involved in moulting and metamorphosis in *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology 19, 99–111
- Weston, Rattlingourd PL., 2000. Progeny production by *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) on maize previously infested by *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Economic Entomology 93, 533-536
- Wong N, Lee CY, 2011. Relationship between population growth of the red flour beetle *Tribolium castaneum* and protein and carbohydrate content in flour and starch. J Econ Entomol 104, 2087-2094
- Wool D, Namir Z, Bergerson O, 1986. Dietary regulation of amylase activity levels in flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae): *Tribolium*. Annals of the entomological society of America 79, 407-413
- Yamamoto Y, Takahashi SY, 1993. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. Comp Biochem Physiol 106, 35–45
- Yamamoto Y, Takimoto K, Izumi S, Toriyama-Sakurai M, Kageyama T, Takahashi SY, 1994. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J Biochem 116, 1330– 1335
- Xavier-Filho J, 1992. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 4, 1-6
- Zhang JS, Zhao NN, Liu QZ, Liu ZL, Du SS, Zhou L, Deng ZW, 2011. Repellent Constituents of Essential Oil of *Cymbopogon distans* Aerial Parts against Two Stored-Product Insects. J Agric Food Chem 59, 9910–9915
- Zhu-Salzman K, Koiwa H, Salzman RA, Shade RE, Ahn JE, 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Mol Biol 5, 135–145