

**LUCIANA BARBOZA SILVA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAIS DE SERINO E CISTEÍNO  
PROTEASES DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

**Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S586p  
2009

Silva, Luciana Barboza, 1977-  
Purificação e caracterização parciais de serino e cisteíno  
proteases de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)  
/ Luciana Barboza Silva. – Viçosa, MG, 2009.  
x, 67f. : il. ; 29cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Sitophilus zeamais* - Fisiologia. 2. Piretroídes - Efeito  
fisiológico. 3. Cinética enzimática. 4. Enzimas proteolíticas.  
5. Resistência aos inseticidas. 6. Gorgulho. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

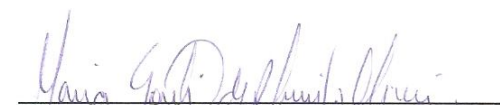
CDD 22.ed. 595.768

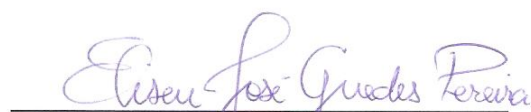
LUCIANA BARBOZA SILVA


PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAIS DE SERINO E CISTEÍNO  
PROTEASES DE *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

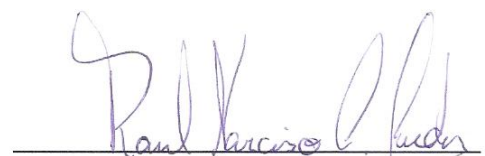
APROVADA: 24 de julho de 2009

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Maria Goreti de Almeida  
Oliveira  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Eliseu José Guedes Pereira  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Pesq. Marcos Antonio Matiello Fadini

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Valéria Monteze Guimarães

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Orientador)

A todos aqueles que buscam respostas

## Ofereço

Ao meu esposo Odilon, com amor

## Dedico

*“Nas horas difíceis, procuremos sorrir e saibamos caminhar. Na frente, a Divina Bondade nos espera e não faltará combustível do socorro Divino à lâmpada de nossas necessidades, a fim de que haja bastante luz em nosso roteiro. Quanto mais intenso se nos fizer o trabalho com Jesus, mais ampla assistência de Jesus receberemos”*  
Chico Xavier

## AGRADECIMENTOS

Sou Grata:

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia, cuja orientação nas disciplinas me possibilitou a abertura de novos conhecimentos e horizontes científicos;

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela confiança depositada e constante orientação. Te admiro pela forma como conduz sua vida, sua pesquisa, dá confiança, tem autenticidade e respeito por aqueles que caminham ao seu lado. Sinto apenas que a distância não me tenha permitido usufruir mais de seus conhecimentos e de seu convívio. Muito Obrigada.

À conselheira Maria Goreti Almeida de Oliveira, que acompanhou todas as etapas do trabalho e pelo aconselhamento durante o doutorado;

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia, Alberto, Célia, Érik, Fábio, Geraldo, Júlia, Juliana, Kênia, Nelsa (pelas longas conversas, muito prazerosas. Foi um convívio curto porém especial), Ronnie, Rúbia, pela convivência fraterna, e aos amigos do laboratório de Enzimologia, Fabrícia, Lílian, Liliane, Angélica, Eduardo, Anderson, foram momentos, vividos juntos, que jamais serão esquecidos.

Aos amigos de almoço, descontração, QUE TURMA, QUE MOMENTOS, só quem conviveu pode imaginar como é grande minha saudade... Ana Maria, pessoa incrível, tenha certeza você sempre estará no meu coração, Carol, minha irmã, que me acolheu em Viçosa proporcionando-me muitos aprendizados, Nilbe e Eulene (KIKA), companheiras, Camila, sem noção (hhehhe), Hermes, eita homem centrado, Eber, sem comentários - que pessoa, Clarice, uma guerreira, Fernanda e Cleiton, só ternura, Raimundo, esse é um chato (brincadeira), Marialva, pessoa mais meiga, Ana Paula, Giovanni e Daniel, família linda, enfim não dá para falar de todos, Letícia, Tereza, Cândida, Maristela, Luciane, Luis, Roseli, Marzin, todos vocês estaram sempre em meu coração.

A todos os meus amigos que trabalham na Entomologia, pela convivência e brincadeiras do dia-a-dia, Luciane, Silma, Darcy, Mario .....

A todos os meus irmãos e irmãs e demais familiares que acreditaram e acreditam em mim;

A minha filha, Larissa, pelo amor, carinho e por entender os momentos que estive ausente. Filha eu a amo e admiro;

Aos meus pais, por me oportunizar chegar até aqui. Deus saberá recompensá-los da maneira certa.

Ao meu esposo amado, Odilon, que sempre me incentivou, meu deu força em cada etapa conquistada. Suportou a distância, e como foi difícil. Amo você!!!!

E até aos gêmeos, Mateus e Tiago, que apareceram no meio do caminho, hehehehe!!!!

Aos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Por fim agradeço essa oportunidade, durante essa caminhada convivi com pessoas incríveis, muito aprendi. Agora é bola pra frente!!!

Muito Obrigada!!

## **BIOGRAFIA**

Luciana Barboza Silva, filha de José Braga da Silva e Arcendina Barboza Chaves, nasceu em 23 de agosto de 1977, na cidade de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul.

Em 1999 iniciou o curso de Licenciatura em Biologia pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, graduando-se em 2002.

Em Março de 2003, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado, em Biologia e Conservação da Biodiversidade – Entomologia, Departamento Ciências Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Dourados-MS, defendendo tese em 25 de fevereiro de 2005, obtendo o título de *Magister Scientiae*.

Em 04 de agosto de 2005 ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em Entomologia, Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, defendendo tese em 24 de julho de 2009.

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| RESUMO .....  | viii |
| ABSTRACT .....  | x    |
| Introdução Geral .....  | 1    |
| Referências Bibliográficas.....   | 4    |
| Purificação parcial e caracterização de serino protease tripsina-like de populações do gorgulho do milho ( <i>Sitophilus zeamais</i> ) resistentes e susceptível a piretróides..... | 7    |
| Resumo .....  | 8    |
| Abstract .....  | 9    |
| 2. Material e métodos.....  | 12   |
| 2.1. Insetos e materiais .....  | 12   |
| 2.2. Preparo do extrato bruto dos insetos e purificação parcial .....   | 13   |
| 2.3. Concentração de proteínas .....  | 13   |
| 2.4. SDS-PAGE.....  | 13   |
| 2.5. Determinação da atividade enzimática .....   | 14   |
| 2.6. Eletroforese de peptídeos obtidos da degradação de caseína.....  | 14   |
| 2.7. Efeito da concentração de ions cálcio.....   | 15   |
| 2.8. Efeito de inibidores de proteases.....   | 15   |
| 2.9. Parâmetros cinéticos .....   | 15   |
| 2.10. Análise estatística .....   | 16   |
| 3. Resultados.....  | 16   |
| 3.1. Atividade proteolítica .....   | 19   |
| 3.2. Propriedades de tripsina-like .....  | 20   |
| 3.3. Parâmetros cinéticos .....   | 24   |
| 3.4. Efeito dos inibidores.....   | 27   |
| 4. Discussão .....  | 29   |
| 5. Referências .....  | 32   |
| Maior atividade de cisteíno proteases de populações resistentes do gorgulho do milho: purificação e caracterização .....  | 37   |
| Resumo .....  | 38   |
| Abstract .....  | 39   |
| 1. Introdução.....  | 40   |
| 2. Material e Métodos.....  | 42   |
| 2.1. Insetos e Materiais.....   | 42   |
| 2.2. Preparo do extrato bruto, extração e purificação.....  | 43   |
| 2.3. Concentração de proteína.....  | 43   |
| 2.4. SDS-PAGE.....  | 44   |
| 2.5. Determinação da atividade enzimática .....   | 44   |
| 2.6. Eletroforese de peptídeos obtidos da degradação de caseína.....  | 45   |
| 2.7. Efeito de CaCl <sub>2</sub> e NaCl <sub>2</sub> .....  | 45   |
| 2.8. Efeito de inibidores de protease .....   | 45   |
| 2.9. Parâmetros cinéticos .....   | 46   |
| 2.10. Análises estatísticas .....   | 46   |
| 3. Resultados.....  | 46   |
| 3.1. Purificação de cisteíno proteases.....   | 46   |
| 3.2. Atividade proteolítica .....   | 49   |
| 3.3. Propriedades bioquímicas .....   | 51   |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 3.4. Parâmetros cinéticos ..... | 54 |
| 3.5. Efeito de inibidores.....  | 55 |
| 4. Discussão .....              | 57 |
| 5. Referências.....             | 60 |
| Considerações Finais.....       | 67 |

## RESUMO

SILVA, Luciana Barboza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Purificação e caracterização parciais de serino e cisteíno proteases de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae).** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Eliseu José Guedes Pereira.

Serino e cisteíno proteases foram purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a inseticidas (uma com custo associado a resistência e outra sem custo) de *Sitophilus zeamais*. Utilizou-se coluna de afinidade aprotinina-agarose para purificar serino protease das três populações. O maior fator de purificação obtido foi para a população resistente sem custo (51,20x), com um rendimento de 14,8% e atividade específica de 875 $\mu$ M/min/mg proteína. Na SDS-PAGE uma banda de 56 kDa ficou visível nas três populações e na população resistente sem custo uma outra banda de 70 kDa também foi observada. A enzima parcialmente purificada das três populações foi inibida por PMSF, TLCK, aprotinina, benzamidina e SBTI, indicando a presença de serina e histidina no centro ativo da enzima o que a caracteriza como tripsina-like. A enzima purificada das populações resistentes tem maior afinidade pelo substrato (menor valor de  $K_M$  app) e a eficiência catalítica para a população resistente sem custo foi aproximadamente duas vezes maior em relação a população susceptível. Para purificar cisteíno protease das três populações a coluna de afinidade thiol-sepharose foi utilizada. Um material homogêneo foi obtido com a purificação de cisteíno, conforme indicado na SDS-PAGE. Uma única banda, de 74 kDa foi visível na população susceptível, enquanto duas bandas de 72 e 83, e 68 e 74 kDa apareceram na população resistente com e sem custo, respectivamente. A identificação de cisteíno protease foi confirmada pelos ensaios com inibidores, realizados com as frações que apresentaram atividade proteolítica, eluídas da coluna thiol-sepharose. As cisteíno proteases, parcialmente purificadas das três populações apresentaram um comportamento diferente quanto a degradação de caseína e inibidores utilizados. A enzima parcialmente purificada da população resistente com custo foi menos sensível ao inibidor E-64, apresentando maior valor de  $I_{50}$  comparado as outras populações analisadas. A afinidade (i.e.  $K_M$  app) da enzima pelo substrato foi similar entre as populações, porém a  $V_{max}$  app foi variável, sendo que a população resistente com custo apresentou valor 5x superior, enquanto a população resistente sem custo foi 3x maior do que a  $V_{max}$  app da população susceptível. Os resultados desta investigação confirmam que as populações resistentes a piretróides, são mais eficientes quanto a atividade de tripsina-like proteases, as quais tem um papel

importante na mitigação do custo fisiológico associado com a manutenção dos mecanismos de resistência a inseticidas em algumas populações de *S. zeamais*. O papel de cisteíno proteases na mitigação do custo associado a resistência parece ser secundário em relação a serino protease.

## ABSTRACT

SILVA, Luciana Barboza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Partial purification and characterization of serine and cysteine proteases of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)**. Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Advisors: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Eliseu José Guedes Pereira

Serine and cysteine proteases of a susceptible and two resistant strain (one with a cost associated with resistance and other without cost) of the maize weevil *Sitophilus zeamais* were partially purified using an affinity column of aprotinin-agarose. The highest purification factor was obtained for the resistant no-cost strain, 51.20x, with a yield of 14.8% and specific activity of 875 $\mu$ M/min/mg protein. In the SDS-PAGE a band of 56kDa was visible in the three strains, and the resistant no-cost strain also exhibited another band of 70kDa. The enzymes partially purified from the three strains were inhibited by PMSF, TLCK, aprotinin, benzamidine and SBTI, indicating the presence of serine and histidine in the enzyme active center, which is characteristic of trypsin-like serine proteases. The enzyme purified of the resistant strains have higher affinity for the substrate (lower value of  $K_{M\ app}$ ), and the catalytic efficiency for the resistant strain no-cost was approximately 2-fold higher relative of the susceptible strain. A thiol-sepharose affinity column was used to purify the cysteine protease of the three strains. Cysteine proteases partially purified from the three strains exhibited a different behavior in casein degradation and its inhibition by species inhibitors. The enzyme partially purified from the resistant cost strain was less sensitive to the inhibitor E-64 exhibiting higher  $I_{50}$  compared to the other strains studied. The affinity (i.e.  $K_{M\ app}$ ) of the enzyme for the substrate was similar among the strains, but the  $V_{max\ app}$  for the enzyme partially purified from the resistant cost strain was 5x greater and of resistant no-cost was 3x greater than the  $V_{max\ app}$  of the susceptible strain. The results of this investigation confirm that the pyrethroid-resistant strains have elevated activity of trypsin-like proteases, which has an important role in mitigating the physiological cost associated with maintaining the mechanism of resistance to insecticides in some strains of *S. zeamais*. The role of cysteine in mitigating the cost associated with the resistance appears to be of secondary relative to that of serine proteases.

## Introdução Geral

A diversidade de mecanismos de resistência a inseticidas em algumas populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) impõe diferentes custos adaptativos aos indivíduos resistentes (Fragoso *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2007), tendo como consequência um aumento na taxa metabólica necessária para manterem o mecanismo de defesa. Embora desconheça-se que serino e cisteíno proteases constituam um mecanismo de resistência a inseticidas piretróides, acredita-se que haja uma vantagem metabólica conferida pelo aumento da atividade dessas enzimas nos insetos resistentes. Tais proteases podem atuar suprindo aminoácidos para a síntese de enzimas detoxificativas, bem como auxiliar na aquisição e mobilização de reservas energéticas para a manutenção do mecanismo de defesa (Saleem *et al.* 1994; Almed *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2008).

Os problemas oriundos da existência de populações resistentes a inseticidas em pragas de produtos armazenados, como *S. zeamais*, vai além dos prejuízos diretos a ela associados, pois a resistência pode ser disseminada pelo comércio de produtos infestados por indivíduos resistentes (Champ e Dyte, 1976). Informações sobre a magnitude, os mecanismos, os custos fisiológicos associados e sua mitigação são essenciais nos programas de manejo da resistência e nas investigações da evolução de fenótipos recém-adaptados e das mudanças fisiológicas e genéticas associadas a estes (Coustau *et al.*, 2000, Raymond *et al.*, 2001).

*Sitophilus zeamais*, inseto considerado praga primária do milho, tem alto poder destrutivo causando elevadas perdas na fase pós-colheita dos grãos. Os adultos são capazes de atacar os grãos intactos e as fêmeas ovipositam no interior do grão, onde se alimentam e desenvolvem as larvas (Santos *et al.*, 1986; Danho *et al.*, 2002; Adda *et al.*, 2002). Os danos tanto dos adultos quanto das larvas são severos e aliados ao elevado potencial biótico e capacidade de colonizar os grãos no campo e nos silos, o torna uma das principais pragas de milho armazenado. Para conter infestações da praga nos armazéns, utiliza-se principalmente inseticidas por ser um método simples, rápido e econômico (Guedes, 1990 e 1991). Em decorrência disto, tem ocorrido a seleção de

populações resistentes a estes compostos levando à perda de eficiência dos compostos, no controle deste inseto.

As modificações genéticas que propiciam ao indivíduo sobreviver em um novo ambiente, como por exemplo grãos tratados com inseticidas no caso de carunchos, estão normalmente associados a um custo adaptativo, pois qualquer adaptação para uma nova condição (como tolerar doses de inseticida que seriam letais à maioria dos indivíduos), envolve modificações dos fenótipos ancestrais. Neste contexto, os indivíduos resistentes estarão em vantagem na presença do inseticida, porém serão menos aptos que os susceptíveis quando o inseticida não for utilizado (Coustau *et al.* 2000, Berticat *et al.* 2002).

Há estudos que demonstram a inexistência deste custo fisiológico associados à resistência em alguns casos (Baker *et al.*, 1998). Por exemplo, algumas populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides apresentaram desempenho reprodutivo semelhante ao apresentado pela população susceptível, sugerindo que a resistência ao inseticida encontra-se fixada na população e que a expressão dos genes responsáveis por esta característica já não mais incorre em custo para os indivíduos (Fragoso *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2006). Sendo assim, não é esperado ocorrer o restabelecimento da suscetibilidade em situações em que um determinado inseticida não é utilizado por um certo intervalo de tempo.

Se as modificações ou expressão de genes relacionados à resistência a um determinado xenobiótico implicam em custo adaptativo (Coustau *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2001), um aumento da taxa metabólica poderá ser necessária para os indivíduos resistentes manterem o mecanismo de defesa. Isto pode causar um desequilíbrio nas trocas gasosas, sendo necessário um aumento no metabolismo energético e a realocação de energia para que outros processos fisiológicos envolvidos com o desenvolvimento do inseto, sua manutenção e reprodução, não sejam prejudicados (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown e Gaston, 1999).

Serino e cisteíno proteases são classes dominantes de enzimas proteolíticas em muitos insetos (Terra e Ferreira 1994; Vinokurov *et al.*, 2006) e estão envolvidas em muitos processos fisiológicos importantes como digestão, crescimento, metabolismo de proteínas intra, extra-celular e resposta imune (Johnson e Rabosky, 2000). É de se esperar que estejam envolvidas no processo de resistência a inseticidas, no que tange ao suprimento de produtos necessários a manutenção da homeostase do organismo, bem

como na manutenção dos aparatos destoxicativos sem comprometer o desenvolvimento do inseto.

Uma maior atividade de proteases nos indivíduos resistentes pode estar relacionada ao metabolismo de proteínas possibilitando um aumento de aminoácidos livres na hemolinfa. Sob condições de estresse, esses aminoácidos poderão servir de precursores para a síntese de constituintes essenciais ao organismo e de enzimas destoxicativas como esterases, monoxigenases e glutathione-*S*-transferases (Ahmed *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 1999; Nath *et al.*, 1997; Reddy & Yellamma, 1991). Insetos resistentes com alta atividade de proteases poderão ter processos digestivos mais eficientes obtendo maior quantidade de moléculas de reserva para serem armazenadas e assim possibilitar um provimento adicional de energia para a manutenção dos aparatos destoxicativos sem provocar conflito de alocação da energia para os processos fisiológicos básicos (Guedes *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008).

Populações de *S. zeamais* resistentes a inseticidas piretróides e que possuem maior atividade de proteases relativo à população susceptível, conforme evidenciado por Araújo *et al.* (2008), foram utilizadas neste trabalho para purificar e caracterizar serino e cisteíno proteases, buscando elucidar o espectro das proteases presentes nestas populações e sua relação com a resistência a inseticidas e custos adaptativos potencialmente associados a ela.

## Referências Bibliográficas

- Adda, C., Borgemeister, C., Biliwa, A, Meikle, W.G., Markham, R.H., Poehling H.M., 2002. Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agriculture Ecosystems and the Environment*, 93: 305-321.
- Ahmed, S., Wilkins, R.M., Mantle, D., 1998. Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *M. domestica* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 629-639.
- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 44, 354-359.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79, 41-47.
- Champ B. R., Dyte C.E., 1976. Report of the FAO. Global survey of pesticides susceptibility of stored grain pests. *FAO Plant Protection Series n°5, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.*
- Chown, S.L., Gaston, K.J., 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Reviews* 74, 87-120.
- Coustau, C., Chevillon, C., ffrench-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends In Ecology & Evolution* 15, 378-383.
- Danho, M., Gaspar, C., Haubruge, E., 2002. The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulski [Coleoptera: Curculionidae]: ovipositions, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal Stored Products Research* 38, 259-266.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Goreti A. Oliveira, M., 2007. Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 43, 167-170.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Peternelli, L.A., 2005. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 41, 271-281.

- Guedes, R.N.C., 1991. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. *Seiva* 50, 24-29.
- Guedes, R.N.C., 1990. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. *Revista Brasileira de Armazenamento* 15, 3-48.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.
- Harak, M., Lamprecht, I., Kuusik, A., Hiisaar, K., Metspalu, L., Tartes, U., 1999. Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochimica Acta* 333, 39-48.
- Hostetler, M.E., Anderson, J.F., Lanciani, C.A., 1994. Pesticide resistance and metabolic rate in *German cockroaches* (Dictyoptera, Blattellidae). *Florida Entomologist* 77, 288-290.
- Johnson, K.S., Rabosky, D., 2000. Phylogenetic distribution of cysteine proteinases in beetles: Evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae. *Comparative Biochemistry Physiology B Biochemistry and Molecular Biology* 126(4), 609-19.
- Nath, B.S., Suresh, A., Varma, B.M., Kumar, R.P.S., 1997. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 169-173.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Tótolá, M.R., de Marco, P., 2007. Competition between insecticide-susceptible and resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere* 69, 12-24.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Corrêa, A.S., Damasceno, B.L., Santos, C.T., 2005. Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): Há vencedor? *Neotropical Entomology* 34, 981-990.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., Chevillon, C., 2001. Insecticide resistance in mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112-113, 287-296.
- Reddy, A. T. V., Yellamma, K., 1991. Perturbations in carbohydrate metabolism during cypermethrin toxicity in fish, *Tilapia mossambica*. *Biochemistry International* 23, 633-638.

- Saleem, M.A., Shakoori, A.R., Wilkins, R.M., Mantle, D., 1994. *In vivo* effect of lambda-cyhalothrin and malathion on the proteolytic enzymes of malathion-resistant and -susceptible strains of *Musca domestica*. *Journal Pakistan Entomologist* 26(4), 327–333.
- Santos, J.P., Cajueiro, I.V.M., Fontes, R.A., 1986. Avaliação de perdas causadas por insetos no milho armazenado ao nível de fazenda, em três estados. In: E. Paiva (Ed.) Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, CNMPP/EMBRAPA, Sete Lagoas, 65-66.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109B, 1-62.
- Vinokurov, K.S., Elpidina, E.N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D.P., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., 2006. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 145, 126-137.
- Wilkins, R.M., Ahmed, S., Mantle, D., 1999. Comparative effect of fenitrothion treatment on intracellular protease activities in insecticide-resistant and susceptible strains of *Musca domestica* L. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 124, 337-343.

**Purificação parcial e caracterização de serino protease tripsina-*like* de populações do gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*) resistentes e susceptível a piretróides**

## Resumo

Serino proteases de três populações de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), uma susceptível e duas resistentes a piretróides – uma com custo associado a resistência (resistente com custo) e a outra sem custo fisiológico (resistente sem custo), foram parcialmente purificadas usando a coluna de afinidade aprotinina-agarose. Obteve-se fator de purificação variando entre 36,5 e 51,2%, com rendimento entre 10 e 15% e atividade entre 529 e 875  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  proteína com o substrato *N*- $\alpha$ -benzoil-L-Arg-*p*-nitroanilida (L-BApNA). De acordo com a SDS-PAGE das frações purificadas, uma banda de massa molecular de aproximadamente 56 kDa foi observada nas três populações e uma banda de massa molecular de 70 kDa ficou mais visível na população resistente sem custo. A enzima purificada das três populações foi inibida por fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF), *N*- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), aprotinina, benzamidina e o inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (SBTI) caracterizando-a como serino protease do tipo tripsina-*like*. A enzima purificada das populações resistentes tem maior afinidade pelo substrato L-BApNA. Para a população resistente sem custo a atividade catalítica,  $V_{\text{max app}}$ , foi 1,5 e 1,7 vezes maior do que a da população susceptível e resistente com custo, respectivamente. Uma tendência semelhante foi observada usando o substrato L-TAME. Esses resultados corroboram com a hipótese de que o aumento da atividade de serino protease tem um importante papel na mitigação do custo fisiológico associado com a manutenção dos mecanismos de resistência em algumas populações do gorgulho do milho.

**Palavras chaves:** Coleoptera, redução do custo, cinética de enzima, custo fisiológico, serino protease.

## Abstract

Serine proteinases from three strains of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), one susceptible and two resistant to insecticides - one exhibiting fitness cost (resistant cost strain) and the other lacking it (resistant no-cost strain), were partially purified using an aprotinin-agarose affinity column. The purification factors obtained from 36.5 to 51.2%, with yields between 10 and 15% and activity between 529 and 875  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein with the substrate *N*- $\alpha$ -benzoyl-L-Arg-*p*-nitroanilide (L-BApNA). SDS-PAGE of the purified fraction revealed a 56 kDa molecular mass band in all strains and a 70 kDa band more visible in the resistant no-cost strain. The purified proteinases from all strains were inhibited by phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF), *N*- $\alpha$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), aprotinin, benzamidine and soybean trypsin inhibitor (SBTI) characterizing them as trypsin-like serine proteinases. Trypsin-like proteinases from the resistant strains exhibited higher affinity for L-BApNA. The resistant no-cost strain exhibited  $V_{\text{max app}}$  values 1.5 and 1.7-fold higher than that of the susceptible and resistance cost strains, respectively. A similar trend was also observed when using L-TAME as substrate. These results provide support to the hypothesis that the enhanced serine proteinase activity may be playing a role in mitigating physiological costs associated with the maintenance of insecticide resistance mechanisms in some maize weevil strains.

**Keywords:** Coleoptera, cost mitigation, enzyme kinetics, fitness costs, serine proteinases

## 1. Introdução

A dependência do uso de pesticidas para o controle de pragas de grãos armazenados, tem acarretado a evolução da resistência a inseticidas em populações do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), o que tem sido um dos principais fatores responsáveis por problemas com o controle de pragas nas unidades de armazenamento em regiões de clima quente (Guedes *et al.* 1995; Ribeiro *et al.* 2003; Fragoso *et al.* 2005).

A seleção para a resistência a inseticidas geralmente é acompanhada por efeitos pleiotrópicos (vários efeitos associados a um único gene) que podem colocar insetos resistentes em desvantagem na ausência do uso de inseticidas (Coustau *et al.* 2000; Arnaud e Haubruge 2002). Contudo, há casos de ausência de desvantagem adaptativa ou mesmo vantagem adaptativa encontrado em indivíduos resistentes de algumas espécies de pragas de produtos armazenados, como o besouro castanho das farinhas *Tribolium castaneum* e o gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Haubruge e Arnaud 2001; Arnaud e Haubruge 2002; Fragoso *et al.* 2005; Guedes *et al.* 2006, Oliveira *et al.*, 2007). Mudanças alélicas (para menor custo) e seleção para genes modificadores podem reduzir o custo da resistência a inseticidas (Coustau *et al.* 2000; Raymond *et al.* 2001; Berticat *et al.* 2002; Ribeiro *et al.* 2007).

Os genes relacionados com resistência a um determinado inseticida implicam em um custo adaptativo, inferindo que o custo fisiológico inicial diminua devido a subsequentes mutações (Coustau *et al.* 2000). Consequentemente, o aumento na taxa metabólica pode ser necessária para indivíduos resistentes manterem o mecanismo de resistência. Se não ocorrer um aumento no metabolismo de energia, a realocação pode debilitar outros processos fisiológicos prejudicando o desenvolvimento e/ou reprodução do indivíduo resistente (Hostetler *et al.* 1994; Chown e Gaston 1999; Harak *et al.* 1999; Guedes *et al.* 2006; Araújo *et al.* 2008). Uma maior quantidade de moléculas de reserva armazenadas podem proporcionar uma oferta de energia adicional para a produção dos aparatos destoxicativos, sem reduzir a energia demandada para os processos fisiológicos básicos. O aumento da digestão de proteínas fornece energia adicional e também aumenta a biodisponibilidade de

aminoácidos para a síntese de proteínas (incluindo a síntese de enzimas destoxificativas).

Estudos demográficos e de competição conduzidos com populações susceptíveis e resistentes a inseticidas do gorgulho do milho, indicam a existência de custo fisiológico associado com resistência a inseticidas (Fragoso *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2007). Além disso, populações do gorgulho do milho resistentes a inseticidas, que não tem custo fisiológico associado, causam maior perda de grão do que populações que apresentam custo fisiológico. Células de reserva de energia (i.e., trofócitos) em populações sem custo são maiores, sugerindo maior potencial para o acúmulo de reservas de energia, o que foi consistente com a maior massa corporal dos insetos desta população (Guedes *et al.* 2006).

O processo catabólico de proteínas está associado com uma maior atividade de proteases, aumentando o número de aminoácidos livres na hemolinfa (Kanost e Clarke 2005). Em condições de estresse, esses aminoácidos servirão como precursores para a síntese de constituintes essenciais para o funcionamento do organismo, induzindo um mecanismo fisiológico compensatório à toxicidade do inseticida, como por exemplo, fornecendo metabólitos intermediários para o ciclo de Krebs e manutenção da homeostase (Alaoui *et al.* 1994; Alaoui *et al.* 1997; Nath *et al.* 1997; Ahmed *et al.* 1998; Wilkins *et al.* 1999). Entre as proteases, serino proteases são as mais estudadas e amplamente presentes em diversas espécies de insetos, incluindo o gorgulho do milho (Baker 1982; Houseman e Thie 1993; Reeck *et al.* 1999; Terra e Ferreira 2005).

Investigações anteriores sobre os mecanismos bioquímicos de resistência têm focado principalmente mudanças de atividade de enzimas destoxificativas como esterases, glutathione-S-transferases e monoxigenases (citocromo P450) em vários insetos pragas (Guedes e Zhu 1998; Haubruge *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2004; Feyereisen 2005; Fragoso *et al.* 2007). Tem sido bem documentado e estabelecido que a atividade desses três grupos de enzimas são maiores em populações de insetos resistentes a inseticidas em comparação com populações susceptíveis. Uma área de investigação que tem recebido pouca atenção é o possível envolvimento de proteases intracelulares (processo catabólico) na mitigação do custo fisiológico associado com a manutenção dos mecanismos de resistência a inseticidas. Proteases digestivas tem um papel importante na fisiologia de insetos por hidrolizar proteínas em aminoácidos

que são necessários para o crescimento e desenvolvimento de um organismo (Terra e Ferreira 2005). Portanto, para elucidar o espectro de serino proteases presente em *S. zeamais* e seu papel na mitigação do custo fisiológico associado com a resistência a inseticidas, o objetivo desse trabalho foi purificar e caracterizar serino protease de populações resistentes e susceptível a inseticidas em linhagens do gorgulho do milho.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Insetos e materiais**

Três populações do gorgulho do milho foram utilizadas no presente estudo. Estas populações foram denominadas “susceptível”, “resistente com custo” e “resistente sem custo”. A população susceptível foi coletada no município de Sete Lagoas (Minas Gerais, Brasil) e fornecida pelo Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo). Esta população vem sendo mantida por mais de 20 anos sem exposição a inseticidas e sua susceptibilidade a piretróides e organofosforados é conhecida e periodicamente checada. As duas populações resistentes a inseticidas são resistentes a piretróides (> 100-vezes resistente e periodicamente checada) (Guedes *et al.* 1994, 1995; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005a, 2007; Araújo *et al.* 2008). A população resistente com custo foi coletada no município de Juiz de Fora (Minas Gerais, Brasil) em 1999. Ela é resistente a piretróides, mas tem custo fisiológico associado à resistência na ausência de exposição a piretróides (Fragoso *et al.* 2005; Guedes *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). A população resistente sem custo foi coletada no município de Jacarezinho (Paraná, Brasil) na década de 80 (Guedes *et al.* 1994; Guedes *et al.* 1995). Ela também é resistente a piretróide, mas não exibe custo adaptativo na ausência de exposição a inseticidas (Fragoso *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005a; Guedes *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). As duas populações resistentes tem o mesmo mecanismo de resistência – alteração no sítio de ação (mutação T929I no canal de sódio; R.A. Araújo (comunicação pessoal)) com envolvimento secundário do aumento da atividade de glutathione *S*-transferases (Guedes *et al.* 1995; Fragoso *et al.* 2003; Fragoso *et al.* 2007).

As três populações de insetos foram criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12). Todos os reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brasil).

## **2.2. Preparo do extrato bruto dos insetos e purificação parcial**

O preparo do extrato bruto e o processo de purificação seguiu o método descrito por Oliveira *et al.* (2005). Os adultos do gorgulho do milho (0,2 g/mL) foram homogeneizados em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 e usados como fonte de enzimas após a lise celular obtidas com nitrogênio líquido e banho a  $37^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 1mL do extrato bruto foram centrifugadas a 100,000 g por 60 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi dialisado em 100 volumes de tampão 0,01 M Tris-HCl pH 7,5. O sobrenadante foi subsequentemente recentrifugado a 100,000 g por 45 min a  $4^\circ\text{C}$  e aplicado na coluna de afinidade, aprotinina-agarose (Sigma-Aldrich Química Brasil) equilibrada com 0,01 M Tris-HCl pH 7,5 e 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Fluxo de 1 mL/min foi usado e frações de 1 mL foram coletadas. Concentrações crescentes de NaCl de 5 mM a 2 M foram adicionadas no tampão para eluir proteínas ligadas a coluna. As frações com maior atividade proteolíticas foram reunidas e utilizadas para a caracterização de serino proteases.

## **2.3. Concentração de proteínas**

A concentração de proteína das amostras de cada passo da purificação foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

## **2.4. SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de polyacrilamida (12%) contendo 0,1% SDS (dodecil sulfato de sódio) foi conduzida conforme descrito por Laemmli (1970). A revelação dos géis foi feita com Comassie Brilliant Blue R-250 para marcar as bandas de

proteínas. Como marcadores de massa molecular foram utilizados:  $\beta$ -galactosidase (116,000 daltons), albumina sérica (66,000 daltons), pepsina (34,000 daltons), inibidor de tripsina (20,000 daltons), lisozima (14,000 daltons) e aprotinina (6000 daltons). A massa molecular das frações parcialmente purificadas foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular.

## 2.5. Determinação da atividade enzimática

A atividade amidásica foi determinada conforme descrito por Erlanger *et al.* (1961) usando *N*- $\alpha$ -benzoil-L-Arg-*p*-nitroanilida (L-BApNA) como substrato na concentração final de 0,5 mM em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,2. As velocidades foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida da absorbância a 405 nm em espectrofotômetro, utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de  $8.800\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para o produto. A atividade esterásica foi determinada usando *N*- $\alpha$ -*p*-tosil-L-Arg metil ester (L-TAME; 0,5 mM) como substrato em tampão 0,1M Tris-HCl pH 8,2 (Hummel 1959). As velocidades foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida da absorbância a 405 nm em espectrofotômetro, utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de  $540\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para o produto.

O efeito do pH sobre a atividade de tripsina-*like* foi verificado a 25°C usando L-BApNA e L-TAME como substrato e seguindo o sistema de tampão a 50 mM: ácido acético/acetato de sódio (pH 4,0-4,5); ácido cítrico/citrato de sódio (pH 5,0-5,5); monofosfato/fosfato dissódio (pH 6,0-7,0); Tris-HCl (pH 7,5-8,5) e ácido bórico/borato de sódio (pH 9,0-10,0). Os substratos L-BApNA e L-TAME foi também utilizado nos ensaios para verificar o efeito da temperatura (15-70°C) sobre a atividade enzimática. Três replicatas foram utilizadas em todos os ensaios.

## 2.6. Eletroforese de peptídeos obtidos da degradação de caseína

Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  da amostra parcialmente purificada foram adicionadas em 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de caseína (1,5mg/mL em Tris HCl 0,1M pH 8,2) e incubadas

por 3 horas a 37°C. O precipitado foi dissolvido em 25 µL de tampão de amostra, os tubos foram aquecidos a 95°C por 3 min e submetidos a eletroforese (Laemmli 1970). Para os ensaios com os inibidores, as amostras foram incubadas por 30 min com o inibidor tosil-L-lisina clorometil cetona (TCLK) a temperatura ambiente e a degradação da caseína foi verificada como descrito acima.

## **2.7. Efeito da concentração de ions cálcio**

Solução de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), com concentrações variando de 0 a 30 mM, para testar o efeito do Ca<sup>2+</sup> sobre a atividade da enzima, foi adicionada em uma solução de 0,5 mM L-BAPNA (25°C) em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,2.

## **2.8. Efeito de inibidores de proteases**

Inibidores de protease foram selecionados para verificar seu efeito sobre a atividade de tripsina-*like* parcialmente purificada usando concentrações crescentes. Os seguintes inibidores foram utilizados: fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF; 0,2 – 4 mM), tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK; 0,03 – 1,0 mM), benzamidina (0,03-1,0 mM), aprotinina (0,0001-0,0036 mM), pepstatina (0,0003- 0,009 mM), leupeptin (0,003-0,09 mM), trans-(epoxisuccinil)-l-leucilamino-4-guanidinobutano (E-64; 0,0003-0,009 mM), inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI; 6-90 µg/mL) e inibidor de tripsina da soja do tipo Bowman-Birk (BBI; 6-90 µg/mL). As amostras da enzima parcialmente purificada foram incubada por 15 min com o inibidor e o substrato L-BapNA, subsequentemente foi adicionado na mistura e a atividade amidásica foi determinada como previamente descrita.

## **2.9. Parâmetros cinéticos**

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_{M\ app}$  e  $V_{max\ app}$  foi conduzido em 0,1 M Tris-HCl pH 8,2 com o substrato L-BAPNA e concentrações variando de 0,05 a 1,2 mM.  $K_{M\ app}$  e  $V_{max\ app}$ , também foram determinados com o substrato L-TAME nas

concentrações variando de 0,08 a 1 mM em Tris-HCl pH 8,2. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito acima.

### **2.10. Análise estatística**

Os resultados da atividade enzimática em cada experimento foram submetidos a análise de variância univariada e as médias foram comparadas usando o teste da mínima diferença significativa (LSD) de Fisher ( $p < 0,05$ ) (PROC GLM SAS Institute 2002). Regressão não linear, equação de Michaelis-Menten, foi realizada para estimar os parâmetros cinéticos ( $K_{M\ app}$  e  $V_{max\ app}$ ) utilizando o procedimento de ajuste de modelo do programa SigmaPlot (SPSS 2000). Os resultados dos bioensaios de inibição foram submetidos a análise de próbite (PROC PROBIT; SAS Institute 2002) para avaliar o potencial de inibição dos diferentes inibidores e estimar a concentração que inibe 50% da atividade enzimática ( $I_{50}$ ).

## **3. Resultados**

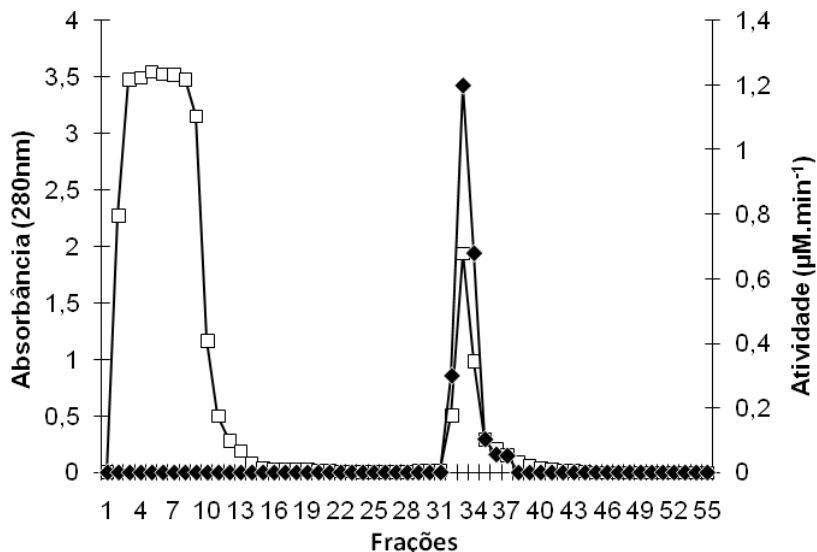
Serino-proteases de uma população susceptível e duas resistentes a inseticidas piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho foram purificadas usando a coluna de afinidade aprotinina-agarose. O fator de purificação variou de 36,5 a 51 com um rendimento de 10 a 15% e atividade específica de 529 a 875  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  proteína. Um resumo das etapas de purificação é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.**

Purificação parcial de protease tripsina-like de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*.

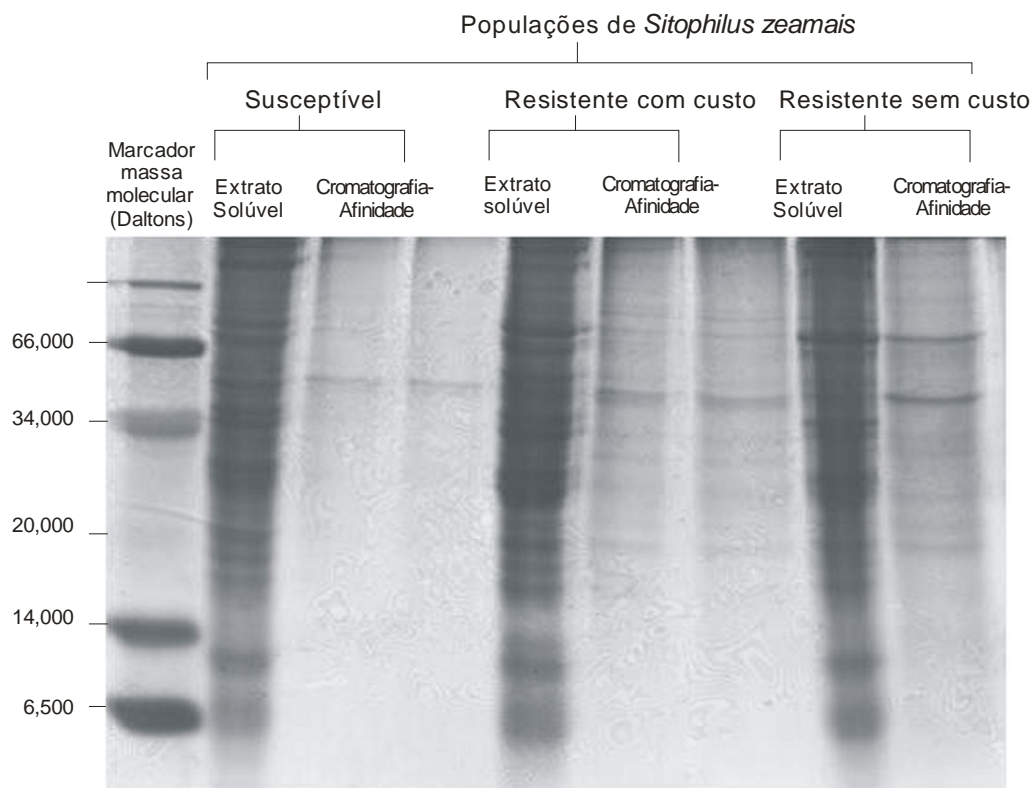
| Etapas de purificação                 | População            | Proteína total (mg) | Atividade total ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) | Atividade específica ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ ) | Fator de purificação | Rendimento (%) |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|--|---|----------------------|----------------|
| Extrato Bruto                         | Susceptível          | 256,0               | 3480   | 13,5  | 1,0                  | 100,00         |
|                                       | Resistente com custo | 275,0               | 4000   | 14,5  | 1,0                  | 100,00         |
|                                       | Resistente sem custo | 276,0               | 4715   | 17,1  | 1,0                  | 100,00         |
| Extrato dialisado                     | Susceptível          | 83,2                | 1690   | 20,3  | 1,5                  | 48,50          |
|                                       | Resistente com custo | 95,7                | 1595   | 16,6  | 1,2                  | 39,87          |
|                                       | Resistente sem custo | 87,6                | 2160   | 24,6  | 1,4                  | 45,81          |
| Coluna de afinidade aprotinin-agarose | Susceptível          | 0,7                 | 360  | 545,4   | 40,4                 | 10,34          |
|                                       | Resistente com custo | 1,0                 | 540  | 529,4   | 36,5                 | 13,50          |
|                                       | Resistente sem custo | 0,8                 | 700  | 875,0   | 51,2                 | 14,80          |

O perfil cromatográfico, correspondente a aplicação do extrato dialisado na coluna de afinidade aprotinina-agarose, está representado pela figura 1. Um pico de atividade para o substrato testado foi observado.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico do extrato enzimático dialisado do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* em coluna de afinidade aprotinina-agarose equilibrada com 0,01 M Tris-HCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,5. As proteínas foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl. Substrato usado: L-BapNA. Absorbância em 280 nm (□); Atividade (µM.min<sup>-1</sup>) (◆).

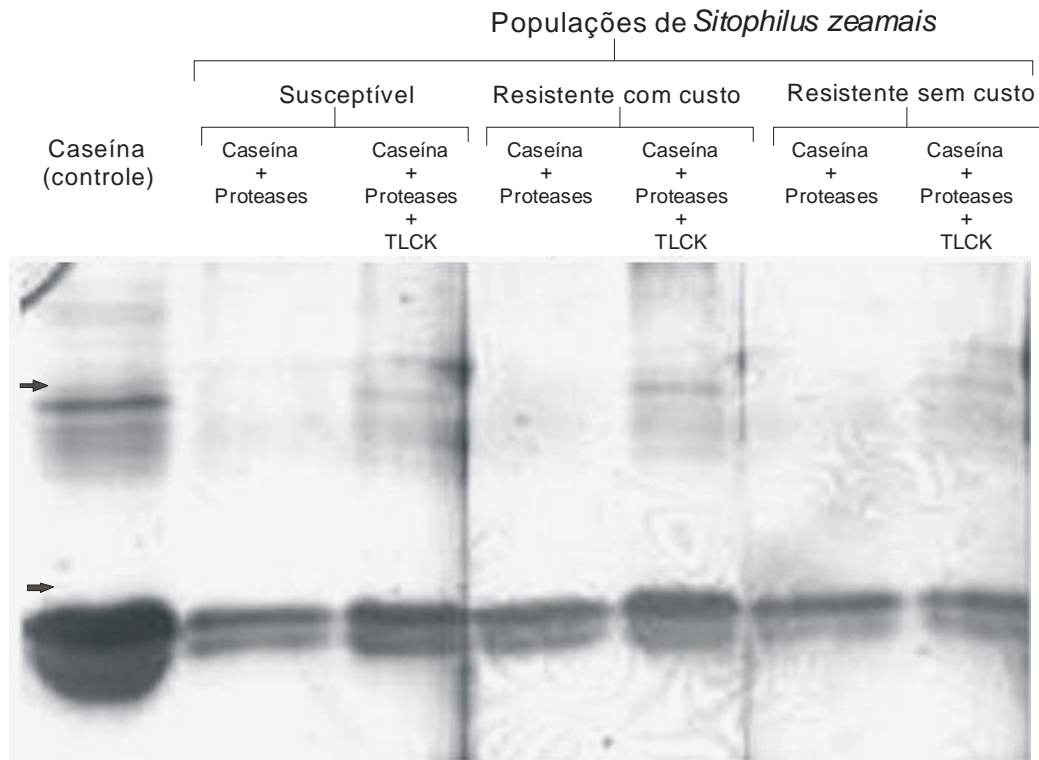
De acordo com a SDS-PAGE a purificação parcial foi alcançada para as três populações, como indicado pelo baixo número de peptídeos e maior intensidade da banda de massa molecular de 56,000 e 70,000 daltons nas amostras purificadas, comparado com o extrato bruto (Fig. 2). Esses valores são consistentes com os resultados observados para outros Coleoptera e Lepidoptera (Wagner *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2005b; Vinokurov *et al.* 2006). O fator de purificação de tripsina-like das três populações é semelhante aos obtidos no processo de purificação dessa enzima para as espécies, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) e *Spilosoma obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae) (Vinokurov *et al.* 2006; Lam *et al.* 2000; Anwar *et al.* 2002).



**Figura 2.** SDS-PAGE de tripsina-like parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *Sitophilus zeamais*.

### 3.1. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica da fração purificada foi detectada com caseína. A pré-incubação com TLCK diminuiu a atividade, indicando a presença de resíduos de histidina no centro ativo da enzima. As três populações tem um perfil similar de atividade, embora a intensidade das bandas da população resistente sem custo foi menor, o que sugere uma maior atividade proteolítica, ou seja a hidrólise de caseína é relativamente mais rápida (Fig. 3).



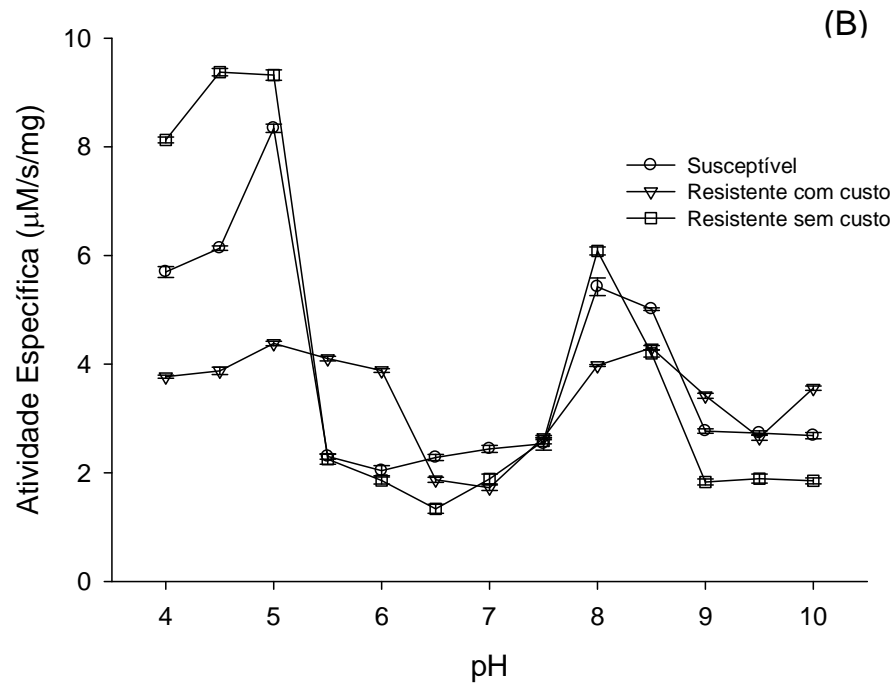
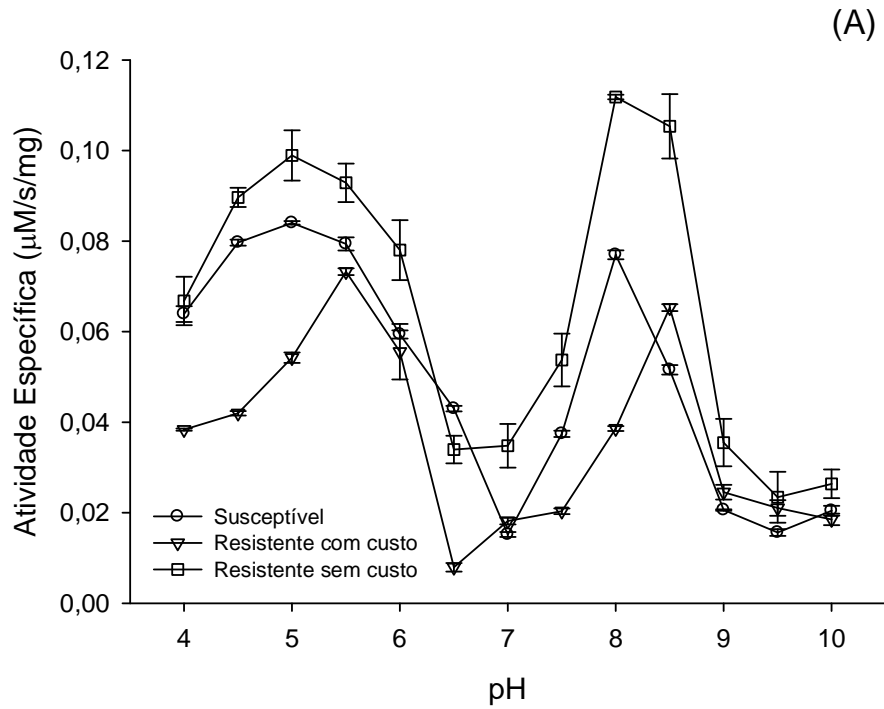
**Figura 3.** SDS-PAGE da digestão de caseína e inibição por TLCK das tripsina-*like* parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. ➡ Caseína.

### 3.2. Propriedades de tripsina-*like*

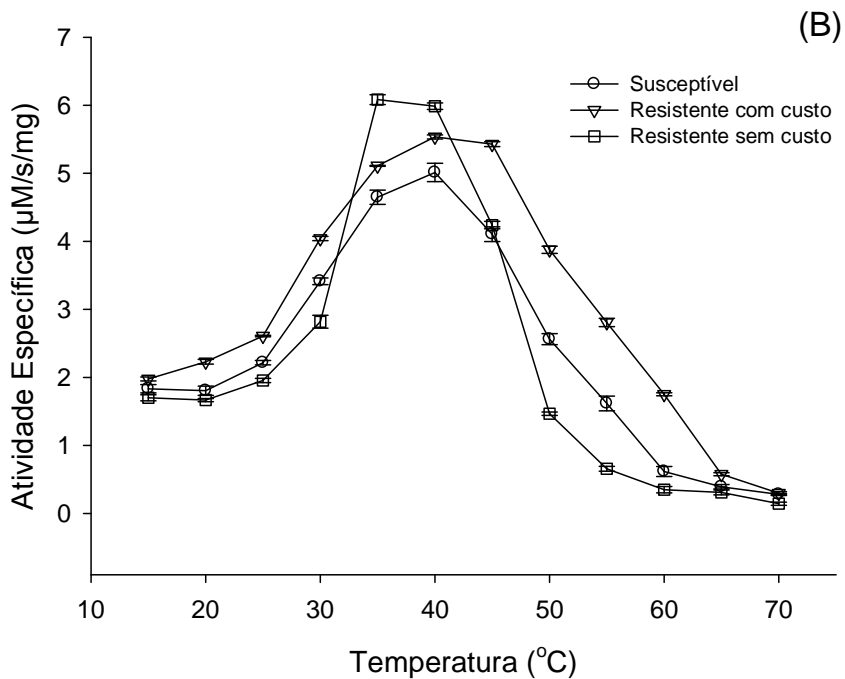
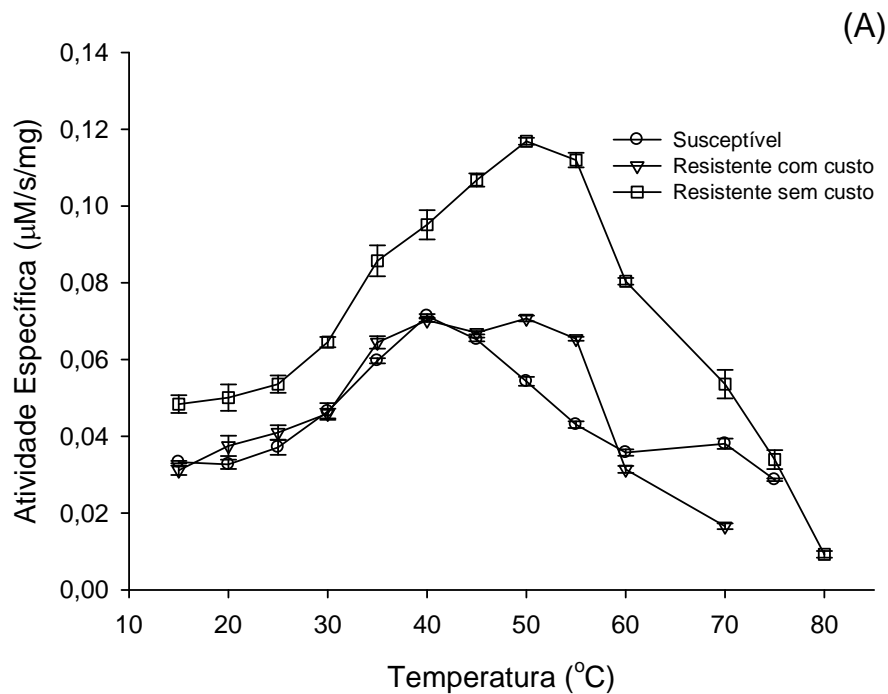
A atividade de tripsina-*like* das frações parcialmente purificadas das três populações foi reconhecida usando como substrato L-BApNA, para atividade amidásica, e L-TAME, para atividade esterásica em condições de pH entre 4 e 10 a 25°C. A população susceptível e resistente sem custo tem dois picos de atividade, um em pH 5,0 e o outro em pH 8,0, enquanto a população resistente com custo teve picos de atividade em pH 5,5 e 8,5. O perfil de atividade foi o mesmo para os dois substratos (Fig. 4).

A existência de dois picos com atividade proteolítica pode ser atribuída a presença de diferentes compartimentos digestivos (Terra e Ferreira 1994, 2005) com pH ácido e alcalino no intestino de *S. zeamais*. A relação entre o pH, localização de enzimas e o gradiente de pH do intestino anterior para o posterior de *T. molitor* foi demonstrado por Vinokurov *et al.* (2006).

O efeito da temperatura sobre a atividade de tripsinas-*like* parcialmente purificadas foi verificada em condições variando de 15 a 70°C (Fig. 5). A atividade da enzima aumenta gradualmente quando a temperatura chega aos 40°C e diminui com o aumento da temperatura na população susceptível e resistente com custo para os dois substratos analisados, L-BApNA e L-TAME. A população resistente sem custo tem maior atividade em 50 e 35°C para o substrato L-BApNA e L-TAME, respectivamente. Os valores de atividade observados, estão consistentes com os reportados para outras tripsinas-*like* de coleópteros (Tsybina *et al.* 2005).

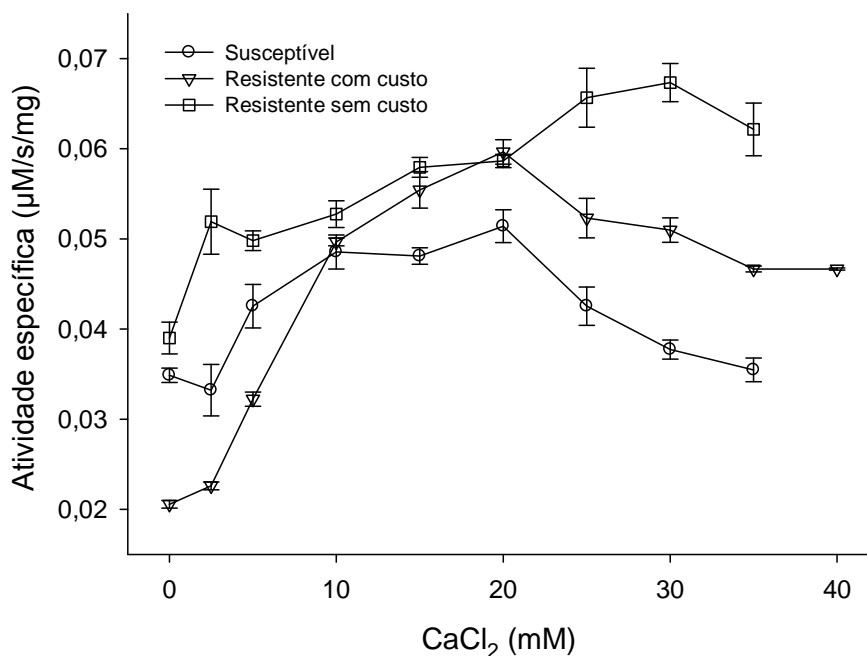


**Figura 4.** Efeito do pH sobre a atividade de tripsinas-like parcialmente purificadas (A: atividade amidásica; B: atividade esterásica) de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).



**Figura 5.** Efeito da temperatura sobre a atividade de tripsina-like parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. ((A) atividade amidásica e (B) atividade esterásica). Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n=3$ ).

Tripsinas de vertebrados tem sítios específicos para ligação de moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da molécula. O cálcio liga-se a tripsina e produz uma mudança conformacional na proteína que previne autólise em baixas temperaturas (Vajda *et al.* 1981; Chianconi *et al.* 1985). O efeito de ions  $\text{Ca}^{2+}$  foi avaliado sobre a atividade da enzima purificada. A maior atividade da enzima foi observada com 20 mM  $\text{CaCl}_2$  para a população susceptível e resistente com custo e para a população resistente sem custo, a maior atividade ocorreu em torno de 30 mM  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 6).



**Figura 6.** Efeito de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a atividade de tripsina-like parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais* usando L-BApNA como substrato. Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

### 3.3. Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos estimados para a população susceptível, resistente com custo e sem custo de *S. zeamais* usando substrato sintético L-BApNA (amidásica) e L-TAME (esterásica) podem ser observados na Tabela 2. A atividade amidásica, sobre L-BApNA e atividade esterásica, sobre L-TAME, mostrou uma curva hiperbólica de

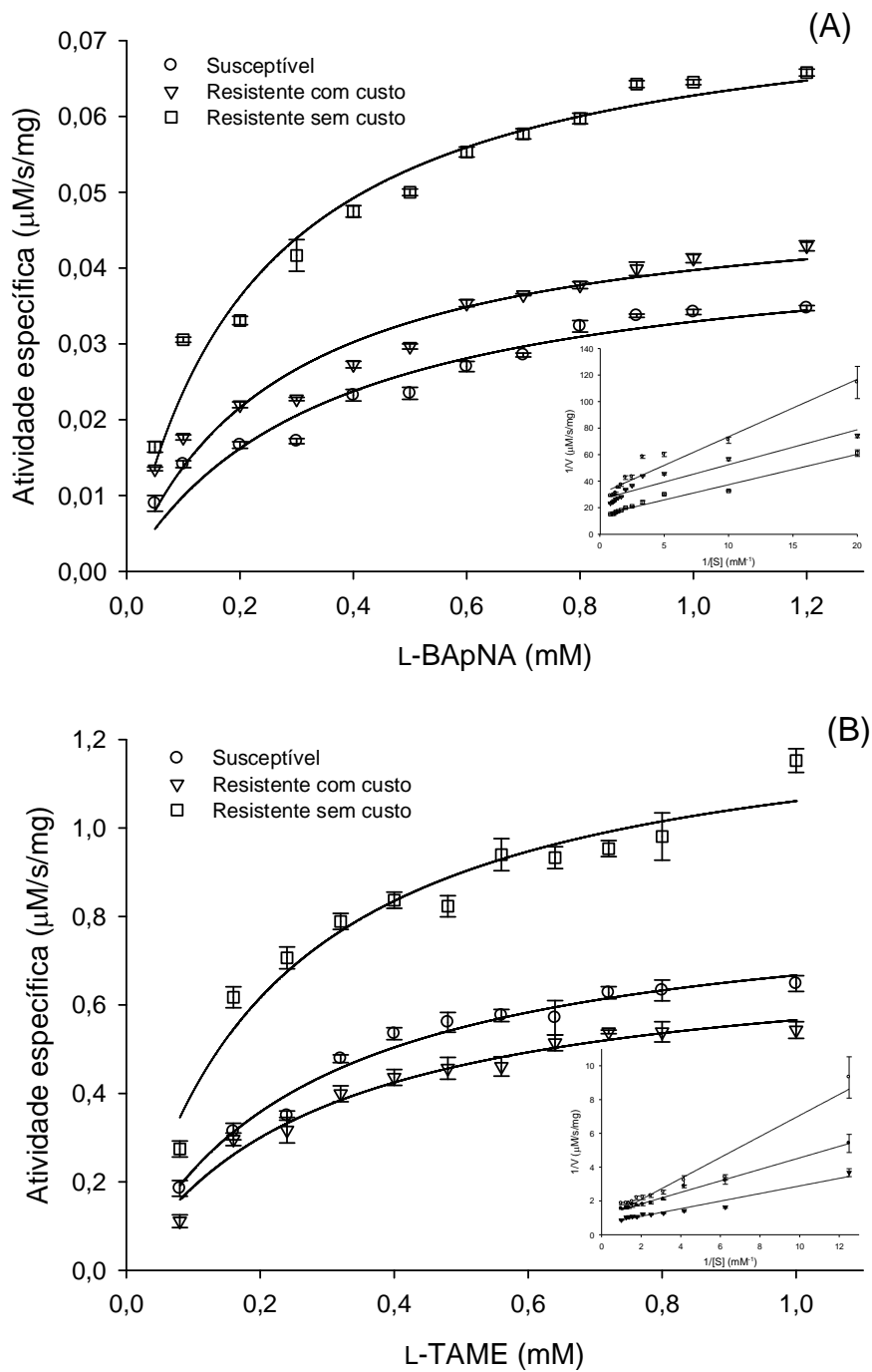
concentração *versus* velocidade, seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten para as concentrações de substrato analisadas (Fig. 7).

A atividade (i.e.  $V_{\max \text{ app}}$ ) de tripsinas-*like* da população resistente sem custo foi maior do que o da população susceptível e resistente com custo para os dois substratos investigados (Tabela 2). Não houve diferença quanto aos valores de  $K_M \text{ app}$  para as três populações na hidrólise de L-TAME, mas a  $V_{\max \text{ app}}$  da população resistente sem custo foi 1,5 vezes maior comparado com a população susceptível (Tabela 2). Na hidrólise de L-BApNA por tripsinas-*like* purificadas das populações resistentes, a afinidade pelo substrato foi maior (i.e. menor  $K_M \text{ app}$ ), comparado com a da população susceptível. Os valores de  $K_M \text{ app}$  aqui obtido são semelhantes aos encontrados para tripsinas-*like* em diferentes espécies de insetos (0,12 – 0,93 mM) (Levinsky *et al.* 1977; Lam *et al.* 2000; Lopes e Terra 2003; Oliveira *et al.* 2005b).

## Tabela 2

Parâmetros cinéticos ( $\pm$  EPM) de tripsinas-*like* parcialmente purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão (n = 3). Média seguida da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Fisher's LSD ( $p < 0.05$ ).

| Populações           | $K_M \text{ app}$ (mM) |                   | $V_{\max \text{ app}}$ ( $\mu\text{M/s/mg}$ ) |                   |
|----------------------|------------------------|-------------------|---|-------------------|
|                      | L-BApNA                | L-TAME            | L-BApNA                                       | L-TAME            |
| Susceptível          | 0,34 $\pm$ 0,05 a      | 0,27 $\pm$ 0,03 a | 0,044 $\pm$ 0,002 c                           | 0,85 $\pm$ 0,03 b |
| Resistente com custo | 0,26 $\pm$ 0,03 b      | 0,28 $\pm$ 0,04 a | 0,050 $\pm$ 0,002 b                           | 0,72 $\pm$ 0,03 b |
| Resistente sem custo | 0,22 $\pm$ 0,02 b      | 0,21 $\pm$ 0,03 a | 0,076 $\pm$ 0,002 a                           | 1,29 $\pm$ 0,05 a |



**Figura 7.** Michaelis–Menten (A) atividade amidásica e (B) atividade esterásica de tripsina-*like* parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais* ( $p < 0,001$ ;  $R^2 > 0,91$ ). Inserção de: Lineweaver-Burk (duplo recíproco) ( $p < 0,001$ ;  $R^2 > 0,88$ ). Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

### 3.4. Efeito dos inibidores

A atividade tripsina-*like* das frações purificadas foi também reconhecida nas três populações usando inibidores específicos. Várias concentrações de inibidores foram testadas, mas somente a porcentagem de inibição correspondente a maior concentração de cada inibidor utilizado estão apresentados na Tabela 3.

O inibidor PMSF que reage com resíduos de serino do centro ativo de serino proteases (Barrett 1994), diminuiu aproximadamente 50% da atividade com o substrato L-BApNA para as três populações (Tabela 3), indicando que serino proteases são responsáveis pela atividade das amostras. TLCK é um inibidor irreversível de tripsinas-*like*, inibiu em aproximadamente 70% a atividade enzimática das enzimas parcialmente purificadas. As enzimas parcialmente purificadas no presente trabalho são do tipo tripsina, considerando que elas foram inativadas por PMSF e TLCK (Tabela 3).

O tratamento com aprotinina, um pequeno peptídeo (6,500 daltons), que inibe proteases do tipo tripsina, diminuiu aproximadamente 50% da atividade para L-BApNA nas amostras purificadas das três populações de *S. zeamais*. Benzamidina, um inibidor competitivo de tripsina, inibe aproximadamente 70% da atividade de proteases com o substrato L-BApNA da população susceptível, resistente com custo e resistente sem custo. Pesptatin, um inibidor de aspartil protease, causa 42% de inibição da atividade proteolítica nas amostra da população resistente com custo e seu efeito foi menor na população susceptível. Leupeptin inibe a atividade de cisteíno e serino protease, inibiu 85% a atividade da população susceptível. O inibidor de cisteíno protease E64 teve a menor porcentagem de inibição da atividade de tripsinas-*like* das populações do gorgulho do milho, em especial a população resistente com custo.

**Tabela 3**

Porcentagem de inibição ( $\pm$  EPM) de tripsinas-*like* parcialmente purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*, depois do tratamento com inibidores de diferentes enzimas proteolíticas. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).

| Inibidores  | Concentração   | Inibição (%)       |                      |                      |
|-------------|----------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|             |                | Susceptível        | Resistente com custo | Resistente sem custo |
| PMSF        | 4 mM           | 54,06 $\pm$ 4,87 a | 44,98 $\pm$ 2,04 a   | 45,79 $\pm$ 2,73 a   |
| Benzamidina | 1 mM           | 71,19 $\pm$ 0,84 b | 79,15 $\pm$ 1,22 a   | 71,78 $\pm$ 1,61 b   |
| TLCK        | 1 mM           | 76,70 $\pm$ 1,66 a | 76,30 $\pm$ 1,95 a   | 81,68 $\pm$ 2,64 a   |
| Pepstatin   | 0.09 mM        | 18,26 $\pm$ 5,55 b | 42,29 $\pm$ 1,77 a   | 24,62 $\pm$ 1,53 b   |
| Leupeptin   | 0.09 mM        | 85,84 $\pm$ 4,40 a | 56,97 $\pm$ 2,28 b   | 53,15 $\pm$ 3,70 b   |
| Aprotinina  | 0.0036 mM      | 56,05 $\pm$ 1,45 a | 66,25 $\pm$ 1,68 a   | 44,52 $\pm$ 3,41 b   |
| SBTI        | 100 $\mu$ g/mL | 82,24 $\pm$ 1,34 a | 71,34 $\pm$ 2,20 b   | 75,00 $\pm$ 2,16 a   |
| BBI         | 100 $\mu$ g/mL | 43,00 $\pm$ 0,39 a | 51,13 $\pm$ 2,71 a   | 53,25 $\pm$ 4,49 a   |
| E64         | 0.009 mM       | 15,83 $\pm$ 3,00 a | 2,86 $\pm$ 0,71 b    | 13,52 $\pm$ 1,35 a   |

A atividade de tripsinas-*like* das três populações do gorgulho do milho foram ainda caracterizadas através de bioensaios (in vitro) com inibidores de tripsina-*like* (i.e., aprotinina, benzamidina, SBTI e TLCK) para estimar a concentração de inibição. As curvas estabelecidas seguem o modelo de próbite (baixo  $\chi^2$  ( $< 4,5$ ) e  $p > 0,05$ ), permitindo estimar o valor de  $I_{50}$ , concentração requerida para inibir 50% da atividade da enzima (Tabela 4). O valor de  $I_{50}$  para benzamidina, TLCK e SBTI foi maior para a população susceptível comparado com as duas populações resistentes, as quais foram mais sensíveis a estes inibidores. Nenhuma diferença foi observada na sensibilidade a inibição por aprotinina entre as tripsinas-*like* purificada das três populações do gorgulho do milho *S. zeamais*.

**Tabela 4**

Concentração requerida, dos inibidores selecionados, para inibir 50% ( $I_{50}$ ) ( $\pm$  EPM) da atividade enzimática de tripsinas-*like* parcialmente purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) de *S. zeamais*. Os resultados são reportados como a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ).  $I_{50}$  valores são expressos em mM para todos os inibidores exceto para SBTI, a concentração foi expressa em  $\mu\text{g/mL}$ . Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ).

| Inibidor                  | $I_{50}$              |                       |                       |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                           | Susceptível           | Resistente com custo  | Resistente sem custo  |
| Benzamidina (mM)          | $0,54 \pm 0,02$ a     | $0,41 \pm 0,01$ a     | $0,13 \pm 0,01$ b     |
| TLCK (mM)                 | $0,56 \pm 0,05$ a     | $0,14 \pm 0,03$ b     | $0,11 \pm 0,05$ b     |
| Aprotinina (mM)           | $0,0004 \pm 0,0001$ a | $0,0006 \pm 0,0002$ a | $0,0009 \pm 0,0003$ a |
| SBTI ( $\mu\text{g/mL}$ ) | $140,17 \pm 0,50$ a   | $75,20 \pm 6,60$ b    | $36,90 \pm 3,10$ c    |

#### 4. Discussão

Este é o primeiro relato de purificação e caracterização de serino proteases de populações do gorgulho do milho *S. zeamais*. No presente trabalho, proteases de massa molecular de aproximadamente 56,000 e 70,000 , foram isoladas de uma população susceptível e duas resistentes, com e sem custo fisiológico associado à resistência a inseticidas piretróides, do gorgulho do milho *S. zeamais*. As proteases purificadas foram reconhecidas como tripsinas-*like* e sua massa molecular foi consistente com as encontradas para enzimas do tipo tripsina-*like* de outros insetos (Wagner *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2005b; Vinokurov *et al.* 2006). O maior fator de purificação foi obtido para a população resistente sem custo, o que leva a maior atividade específica de tripsina-*like* das frações purificadas, em comparação com a população susceptível e resistente com custo.

Quanto aos ensaios para a atividade amidásica, as trispina-*like* purificadas das populações resistentes tem maior afinidade ( $K_M$  app) pelo substrato do que a da população susceptível. Diferenças também foram observadas para a  $V_{\max}$  app, com a população resistente sem custo, sendo 1,5 e 1,7 vezes maior do que a população

susceptível e resistente com custo, respectivamente. O mesmo foi observado para a atividade esterásica das tripsinas-*like* purificadas das populações de *S. zeamais*, embora a diferença tenha sido menor e observada somente para a  $V_{\max \text{ app}}$ , a qual foi 1,5-vezes maior do que a da população susceptível. Os parâmetros cinéticos aqui obtidos são semelhantes aos reportados para outras espécies de insetos (Lam *et al.* 2000; Lopes *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005b), especialmente para o substrato L-BapNA e mais importante, eles corroboram com as diferenças de atividade para serino proteases obtidas com os extratos brutos das três populações de *S. zeamais* (Araújo *et al.* 2008).

As enzimas parcialmente purificadas da população susceptível, resistente com custo e resistente sem custo de *S. zeamais* foram do tipo tripsina-*like*, pois hidrolizaram L-BApNA e L-TAME. Ademais, elas foram inibidas por inibidores de tripsina, como aprotinina, benzamidina, SBTI e TLCK. As populações resistentes tem maior sensibilidade a inibição e as tripsinas-*like* purificadas da população resistente sem custo foram sensíveis a inibição por benzamidina, TLCK e SBTI comparado às tripsinas-*like* da população susceptível (o valor de  $I_{50}$  foi 5x maior). As enzimas purificadas da população susceptível e resistente sem custo têm propriedades bioquímicas similares em termos de pH e hidrólise dos substratos L-BApNA e L-TAME, enquanto a tripsina-*like* da população resistente com custo foi diferente. Assim, a diferença na eficiência catalítica observada nos ensaios bioquímicos e nos estudos cinéticos é provavelmente devido a presença de isoformas de tripsina-*like* em insetos das populações resistentes, o que também é consistente com as diferenças observadas nos ensaios de pH, temperatura, sais e inibidores.

Tripsina-*like* purificada da população resistente sem custo é aproximadamente 2x mais eficiente na hidrólise dos dois substratos investigados, o que está de acordo com os resultados apresentados com o extrato bruto destas populações (Araújo *et al.* 2008). Esse fenômeno tem sido observado em populações resistentes de outros insetos, tais como *Musca domestica* fenitrotiom-resistente e também populações resistentes a inseticidas do besouro das farinhas *Tribolium castaneum*. Os insetos resistentes dessas populações tem intrinsecamente maior atividade de proteases intracelulares do que as populações susceptíveis (Shakoory *et al.* 1994; Ahmed *et al.* 1998; Wilkins *et al.* 1999). As tripsinas-*like* purificadas da população resistente sem custo, tem maior afinidade para o substrato L-BapNA, maior atividade L-BApNA e L-TAME e possui um perfil de inibição distinto. Tais características suportam a hipótese de que diferentes

tripsinas-*like* dessa população podem favorecer o acúmulo de energia e fornecer aminoácidos, para a síntese de enzimas destoxificativas e processos fisiológicos básicos, o que consequentemente reduz o custo associado à resistência a inseticidas em algumas populações de gorgulho do milho. Sabe-se que muitos inseticidas induzem enzimas destoxificativas, assim estas proteases podem ter um importante papel na hidrólise de proteínas, disponibilizando aminoácidos.

Em resumo, o nível de enzimas proteolíticas foi maior nas populações resistentes a piretróides e principalmente na população resistente sem custo de *S. zeamais* comparado à população susceptível. Isto reflete o papel potencial de enzimas proteolíticas no desenvolvimento e manutenção de fenótipos resistentes a inseticidas, o que pode estar contribuindo para a maior perda do grão e acúmulo de energia na população resistente sem custo, como previamente reportado, minimizando o custo fisiológico associado à resistência a inseticidas (Fragoso *et al.* 2005; Guedes *et al.* 2006; Araújo *et al.*, 2008). Estudos subsequentes com tripsina-*like* dessas populações permitirão elucidar o possível papel do aumento da atividade e isoformas de serino proteases tripsina-*like* mitigando o custo fisiológico associado à resistência a inseticidas em populações de *Sitophilus zeamais*.

## 5. Referências

- Ahmed, S., Wilkins, R.M., Mantle, D., 1998. Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *M. domestica* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 629-639.
- Alaoui, A., Gourdoux, L., Atay, Z.K., Moreau, R., 1994. Alterations in carbohydrate metabolism induced in *Locusta migratoria* after poisoning with the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 50, 183-190.
- Alaoui, A., Moreau, R., Gourdoux, L., 1997. Effects of deltamethrin on glucose catabolic pathways in the isolated fat body of adult male *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 116, 17-21.
- Anwar, A., Saleemuddin, M., 2002. Purification and characterization of a digestive alkaline protease from the larvae of *Spilosoma obliqua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51, 1-12.
- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 44, 354-359.
- Arnaud, L., Haubruge, E., 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56, 2435-2444.
- Baker, J.E., 1982. Digestive proteinases of *Sitophilus* weevils (Coleoptera: Curculionidae) and their response to inhibitors from wheat and corn flour. *Canadian Journal of Zoology* 60, 3206-3214.
- Barrett, A.J., 1994. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology* 244, 1-5.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79, 41-47.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chianconi, E., Drakenberg, T., eleman, O., Forsen, S., 1985. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their

- zymogens. A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. *Journal of Molecular Biology* 185, 201-207.
- Chown, S.L., Gaston, K.J., 1999. Exploring links between physiology and ecology at macroscales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Reviews* 74, 87-120.
- Coustau, C., Chevillon, C., French-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends In Ecology & Evolution* 15, 378-383.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Feyereisen, R., 2005. Insect Cytochrome P450. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science* 4, 1-77.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Rezende, S.T., 2003. Glutathione S-transferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 21-29.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Peternelli, L.A., 2005. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 41, 271-281.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Goreti A. Oliveira, M., 2007. Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 43, 167-170.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1994. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *International Journal of Pest Management* 40, 103-106.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1995. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 31, 145-150.
- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., 1998. Characterization of malathion resistance in a Mexican population of *Rhizopertha dominica*. *Pesticide Science* 53, 15-20.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.

- Harak, M., Lamprecht, I., Kuusik, A., Hiisaar, K., Metspalu, L., Tartes, U., 1999. Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochimica Acta* 333, 39-48.
- Haubruge, E., Arnaud, L., 2001. Fitness consequences of malathion-specific resistance in red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and selection for resistance in the absence of malathion. *Journal of Economic Entomology* 94, 552-557.
- Haubruge, E., Amichot, M., Cuany, A., Berge, J.B., Arnaud, L., 2002. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1181-1190.
- Hostetler, M.E., Anderson, J.F., Lanciani, C.A., 1994. Pesticide resistance and metabolic rate in *German cockroaches* (Dictyoptera, Blatellidae). *Florida Entomologist* 77, 288-290.
- Houseman, J.G., Thie, N.M.R., 1993. Difference in digestive proteolysis in the stored maize beetles - *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Protephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 86, 1049-1054.
- Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393-1399.
- Kanost, M.R., Clarke, T.E., 2005. Proteases. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Pergamon, New York, pp. 247-265.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam, W., Coast, G.M., Rayne, R.C., 2000. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 85-94.
- Levinsky, H., Birk, Y., Applebaum, S.W., 1977. Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. *International Journal of Peptide and Protein Research* 10, 252-264.

- Lopes, A.R., Terra, W.R., 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 407-415.
- Nath, B.S., Suresh, A., Varma, B.M., Kumar, R.P.S., 1997. Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 36, 169-173.
- Novillo, C., Castanera, P., Ortego, F., 1999. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 177-184.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Corrêa, A.S., Damasceno, B.L., Santos, C.T., 2005a. Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): há vencedor? *Neotropical Entomology* 34, 981-990.
- Oliveira, M.G.A., De Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., 2005b. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140B, 369-380.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Tótola, M.R., de Marco, P., 2007. Competition between insecticide-susceptible and resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere* 69, 12-24.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., Chevillon, C., 2001. Insecticide resistance in mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*, 112/113: 287-296.
- Reeck, G.R., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J.E., Kramer, K.J., 1999. Insect proteinases. In: Turk, V. (Ed.), *Proteases: New Perspectives*. Birkhauser, Boston, pp. 125-148.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Santos, J.P., 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39, 21-31.
- Ribeiro, B., Guedes, R.N.C., Corrêa, A.S., Santos, A.T., 2007. Fluctuating asymmetry in insecticide-resistant and insecticide-susceptible strains of the maize weevil,

- Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 53, 77-83.
- SAS Institute, 2002. SAS user's manual, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.
- Shakoori, A.R., Tufail, N., Saleem, M.A., 1994. Response of malathion resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* to bifenthrin toxicity. Pakistan Journal of Zoology 26, 169-178.
- SPSS, 2000. Sigma Plot 2000 User's Guide. SPSS, Chicago.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology 109B, 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of Digestion. Comprehensive Molecular Insect Science 4, 171-224.
- Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B., Elpidina, E.N., 2005. Digestive proteinases of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae: Purification and characterization of a trypsin-like proteinase. Biochemistry-Moscow 70, 300-305.
- Vajda, T., Garai, A., 1981. Comparison of the effect of calcium (II) and manganese (II) ions on trypsin autolysis. Journal of Inorganic Biochemistry 15, 307- 315.
- Vinokurov, K.S., Elpidina, E.N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D.P., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., 2006. Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 145, 126-137.
- Wagner, W., Mohrlen, F., Schnetter, W., 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). Insect Biochemistry Molecular Biology 32, 803-814.
- Wilkins, R.M., Ahmed, S., Mantle, D., 1999. Comparative effect of fenitrothion treatment on intracellular protease activities in insecticide-resistant and susceptible strains of *Musca domestica* L. Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology 124, 337-343.
- Zhou, X.G., Scharf, M.E., Sarath, G., Meinke, L.J., Chandler, L.D., Siegfried, B.D., 2004. Partial purification and characterization of a methyl-parathion resistance-associated general esterase in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 78, 114-125.

**Maior atividade de cisteíno proteases de populações resistentes do gorgulho do milho: purificação e caracterização**

## Resumo

Resistência a inseticidas geralmente está associada a custo fisiológico. Este custo pode ser mitigado devido ao aumento de energia disponível e ao acúmulo e mobilização de aminoácidos livres como reportado para o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Cisteíno proteases, uma das principais proteases do gorgulho, foram purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a inseticidas (uma com custo fisiológico, denominada “resistente com custo” e a outra sem custo, denominada “resistente sem custo”) usando coluna de afinidade thiol-sepharose. A purificação de cisteíno proteases revelou uma única banda de massa molecular 74,000 daltons na população susceptível e duas bandas de 72,000 e 83,000 daltons na população resistente com custo e duas bandas de 68,000 e 74,000 daltons na resistente sem custo. Cisteíno proteases parcialmente purificadas das três populações têm um comportamento diferente quanto a degradação de caseína e inibidores utilizados; as proteases purificadas da população resistente com custo foram menos sensíveis a inibição por E-64, como evidenciado pelo maior valor do  $I_{50}$ . O perfil de atividade de cisteíno proteases em diferentes valores de pH e temperatura, diferiu entre as três populações. A afinidade pelo substrato (i.e.  $K_M$  app) de cisteíno proteases foi similar entre as populações e a  $V_{max}$  app, da população resistente com custo foi 3x e 5x maior do que a  $V_{max}$  app das populações resistente sem custo e susceptível. A atividade de cisteíno protease foi maior para a população resistente com custo, comparado com a resistente sem custo. Portanto, o aumento da atividade de cisteíno protease parece desempenhar um papel secundário na mitigação do custo fisiológico associado à resistência a inseticidas.

**Palavras chaves:** Coleoptera; enzimas digestivas; resistência a inseticidas; custo fisiológico; mitigação do custo; piretróides.

## Abstract

Insecticide resistance is usually associated with fitness costs, but such costs may be mitigated by increased energy and amino acid accumulation and mobilization as reported in the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Cysteine proteinases, one of the main proteinases in weevils, was therefore purified from an insecticide-susceptible and two insecticide-resistant strains of the maize weevil (one with fitness costs, referred as resistant cost, and the other without it, referred to as resistant no-cost) using thiol-sepharose affinity chromatography. Purification of the cysteine proteinases revealed a single 74,000 daltons molecular mass band in the susceptible strain, two bands of 72,000 and 83,000 daltons in the resistant cost strain, and two bands of 68,000 and 74,000 daltons in the resistant no-cost strain. Purified cysteine proteinases of the three strains behaved differently regarding casein degradation and inhibition; the proteinases least sensitive to inhibition by the specific cysteine proteinase inhibitor E-64 were those from the resistant cost strain as indicated by their highest  $I_{50}$  values. The pH and temperature profile of cysteine proteinase activity differed among strains and although affinity (i.e.  $K_M$ ) of the cysteine-proteinases were similar among them, the  $V_{max}$  value for cysteine-proteinases from the resistant cost strain was 3x and 5x higher than  $V_{max}$  values for the resistant no-cost and susceptible strains respectively. Cysteine proteinase activity was highest for the resistant cost strain rather than the resistant no-cost. Therefore enhanced cysteine proteinase activity is likely to play only a secondary role, if any, in mitigating the costs usually associated with insecticide resistance.

**Keywords:** Coleoptera; digestive enzymes; insecticide resistance; fitness costs; cost mitigation; pyrethroids.

## 1. Introdução

O gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) é uma importante praga do milho armazenado, distribuída no mundo todo. Este inseto não só reduz a qualidade do grão, mas também a germinação e o vigor das sementes. A infestação começa no campo antes da colheita e combinado com sua capacidade de voar, elevado consumo de alimentos e rápido crescimento da população, conduz a perdas significativas em milho armazenado. (Hagstrum *et al.*, 1996; Adda *et al.*, 2002; Brown e Lee 2002). O uso de inseticidas é o principal método para controlar o gorgulho do milho, *S. zeamais*, em regiões tropicais, pois este método normalmente é o mais rápido, simples, eficiente e econômico (Guedes 1990, 1991; White e Leesch, 1996). No entanto, o uso freqüente de inseticidas para proteger grãos armazenados, levou ao desenvolvimento de resistência a inseticidas pelo caruncho em vários países (Champ e Dyte, 1996; Badmin, 1990; Subramanyam e Hagstrum, 1996), incluindo o Brasil (Guedes *et al.*, 1995; Fragoso *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2009).

Resistência a inseticidas é um fenômeno de preocupação econômica e ambiental e é também um importante modelo para estudos sobre a evolução de fenótipos recém-adaptados (Lockwood *et al.*, 1984; Haynes, 1988; Hoy *et al.*, 1998). Insetos resistentes podem suportar aplicações de inseticidas em decorrência da evolução de mecanismos fisiológicos, que lhes permitem tolerar altos níveis de inseticidas, ou através de mecanismos comportamentais, minimizando sua exposição ao inseticida (Gould, 1984; Hoy *et al.*, 1998; Jallow e Hoy, 2005).

Resistência a inseticidas é reconhecida como um efeito pleiotrópico, cuja expressão pode variar com o genótipo e seu ambiente (Chevillon *et al.*, 1997). Essa plasticidade de expressão da resistência a inseticidas pode contribuir para a evolução adaptativa de populações expostas a um ambiente novo ou alterado, em decorrência da presença do inseticida (Pagliucci e Muren, 2003; Price *et al.*, 2003; Ghalambor *et al.*, 2007).

A expressão da resistência usualmente causa efeitos deletérios, pois os mecanismos destoxificativos requerem um aumento na taxa metabólica o que pode provocar um desequilíbrio nas trocas gasosas. Se não ocorrer um aumento no metabolismo energético, a realocação de energia para os mecanismos de resistência pode comprometer processos fisiológicos básicos, como desenvolvimento e reprodução

(Harak *et al.*, 1999; Chown e Gaston, 1999; Coustau *et al.*, 2000). Entretanto, há exceção. Por exemplo, Fragoso *et al.* (2005) observaram que populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides não apresentaram qualquer custo para o seu desempenho reprodutivo, quando comparadas com populações susceptíveis, em um ambiente livre de inseticidas. Isto foi confirmado por Oliveira *et al.* (2007), que submeteu essas populações resistentes a experimentos de competição com uma população susceptível de *S. zeamais*.

O gorgulho do milho resistente a piretróides tem células do corpo gorduroso maiores favorecendo um maior acúmulo de reservas energéticas, proteína total e carboidratos (Guedes *et al.* 2006). O envolvimento das reservas de carboidratos no metabolismo de inseticidas, por insetos, também foi evidenciado nos estudos conduzidos por Nath (2000 e 2002) e Alaoui *et al.* (1994 e 1997). Uma maior taxa metabólica é necessária aos indivíduos resistentes para manter os mecanismos de proteção contra inseticidas (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown e Gaston, 1999).

A ausência de custo (fisiológico), associado à resistência fisiológica também foi reportado para outras espécies de insetos pragas, com o besouro castanho da farinha, *Tribolium castaneum* e o mosquito *Culex pipiens* (Haubruge e Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001). A redução do custo é atribuída a presença de genes modificadores, os quais tem efeito dominante suprimindo a expressão do custo. Entretanto, o processo fisiológico envolvido ainda não foi elucidado (Chevillon *et al.*, 1997).

Uma maior atividade de proteases e amilases em populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides, sem custo fisiológico associado, sugere um mecanismo fisiológico, mitigando este custo (Araújo, *et al.*, 2008ab). Proteases tem uma relação direta com o metabolismo de energia, por promover sua aquisição através da degradação de proteínas, energia esta que seria utilizada nos processos fisiológicos básicos e na manutenção dos mecanismos de resistência. Além disso, proteases digestivas degradam proteínas em aminoácidos, que são essenciais ao crescimento, desenvolvimento e até na proteção contra xenobióticos (p.e., inseticidas) (Terra e Ferreira, 2005). Entre as proteases de insetos, cisteíno proteases são uma das principais proteases do gorgulho do milho (Baker, 1982; Purcell *et al.*, 1992; Houseman e Thie, 1993; Reeck *et al.*, 1999; Terra e Ferreira, 2005). A purificação e caracterização de cisteíno proteases do gorgulho do milho de populações resistentes e susceptível a

inseticidas, ajudará a entender o seu papel na mitigação do custo fisiológico associado com os mecanismos de resistência a inseticidas.

O presente trabalho reporta a purificação e caracterização de cisteíno proteases de uma população susceptível e duas resistentes a inseticidas piretróides de gorgulho do milho (com e sem custo fisiológico associado com à resistência). Diferentes isoformas e uma superprodução dessas enzimas são esperadas nas populações resistentes e principalmente na população resistente sem custo associado a resistência, se cisteíno protease estiverem de fato envolvidas na mitigação do custo associado com os mecanismos de resistência a inseticidas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Insetos e Materiais**

Três populações do gorgulho do milho foram utilizadas no presente estudo. Essas populações foram denominadas “susceptível”, “resistente com custo” e “resistente sem custo”. A população susceptível foi coletada no município de Sete Lagoas (Minas Gerais, Brasil) e fornecida pelo Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo). Esta população vem sendo mantida por mais de 20 anos sem exposição a inseticidas e sua susceptibilidade a piretróides e organofosforados é conhecida e periodicamente conferida. As duas populações resistentes a inseticidas, são resistentes a piretróides (> 100-vezes resistente e periodicamente conferido) (Guedes *et al.* 1994, 1995; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005a, 2007; Araújo *et al.* 2008). A população resistente com custo foi coletada no município de Juiz de Fora (Minas Gerais, Brasil) em 1999. Ela é resistente a piretróides, mas mostra custo fisiológico associado à resistência na ausência de piretróides (Fragoso *et al.* 2005; Guedes *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). A população resistente sem custo foi coletada no município de Jacarezinho (Paraná, Brasil) na década de 80 (Guedes *et al.* 1994, 1995). Ela também é resistente a piretróide, mas não mostra custo adaptativo na ausência à exposição a inseticidas (Fragoso *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2005a; Guedes *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). As duas populações resistentes tem o mesmo mecanismo de resistência – alteração no sítio de ação (mutação T929I no canal de sódio; R.A. Araújo (comunicação pessoal)) com

envolvimento secundário do aumento da atividade de glutathiona *S*-transferases (Guedes *et al.* 1995; Fragoso *et al.* 2003; Fragoso *et al.* 2007).

As três populações de insetos foram criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 5\%$ ) e fotoperíodo (LD 12:12). Todos os reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, Brasil).

## **2.2. Preparo do extrato bruto, extração e purificação**

Os adultos do gorgulho do milho (0,2 g/mL) foram homogeneizados em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 e usados como fonte de enzimas após a lise celular obtidas com nitrogênio líquido e banho a  $37^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 1mL do extrato bruto foram centrifugadas a 10,000 g por 60 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi dialisado em 100 volumes de tampão 0,01 M Tris-HCl pH 7,5, subsequentemente recentrifugado a 10,000 g por 45 min a  $4^\circ\text{C}$  e aplicado na coluna de afinidade aprotinin-agarose, para remover enzimas do tipo serino protease. Posteriormente as amostras, coletadas da coluna aprotinina-agarose, foram aplicadas em coluna de afinidade thiol sepharose 4B (Sigma-Aldrich Química, São Paulo, Brasil) equilibrada com 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M  $\text{NaCl}_2$ , 1 mM EDTA. Após aplicação das amostras na coluna de afinidade thiol-sepharose, o tampão de equilíbrio foi aplicado para retirar todas as enzimas não aderidas a coluna. As moléculas ligadas à coluna foram eluídas com 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 25 mM DTT e 1 mM EDTA. O fluxo foi de 0,5 mL/min, e alíquotas de 1 mL foram coletadas.

## **2.3. Concentração de proteína**

A concentração de proteína foi medida seguindo o método de Bradford (1976). Albumina bovina (BSA) soluções de 0-0.02 mg/mL foi usada como padrão.

## 2.4. SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme descrito por Blum, Beier e Gross (1987). Os marcadores de massa molecular utilizados foram:  $\beta$ -galactosidase (116,000 daltons), albumina bovina (66,000 daltons), pepsina (34,000 daltons), lisozima (14,000 daltons) e aprotinina (6,000 daltons). A massa molecular das frações parcialmente purificadas foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular.

## 2.5. Determinação da atividade enzimática

Atividade amidásica foi determinada conforme descrito por Erlanger *et al.* (1961), usando N- $\alpha$ -benzoyl-L-Arg-p-nitroanilida (L-BApNA) como substrato na concentração final de 0,5 mM em 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 com 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM ditioneitol (DTT) e 100  $\mu$ L benzamida (1 mM), inibidor de serino protease para medir somente a atividade de cisteíno-proteases. As velocidades foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, através da medida da absorbância a 405 nm em espectrofotômetro, utilizando-se para os cálculos de atividade o coeficiente de extinção molar de 8.800M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto.

O pH de melhor atividade enzimática foi determinado a 25 °C usando L-BApNA como substrato, seguindo o sistema de tampão MacIlvaine com pH variando de 3,0 a 6,0 e Tris-HCl com pH de 8,0 a 9,0, todos com intervalo de 0,5. Em todos os tampões foi adicionado 5 mM de DTT, 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1mM de benzamida.

O efeito da temperatura sob a atividade da enzima foi avaliado usando banho maria nas temperaturas variando de 15 a 70°C em intervalos de 0,5. L-BApNA foi usado como substrato para avaliar o efeito da temperatura em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT e 1 mM benzamida. As amostras permaneceram por 5 minutos em cada temperatura. Uma série de três replicatas foram utilizadas para quantificar a atividade da enzima e a leitura foi feita em A405nm por 2,5 min (Oliveira, *et al.*, 2005).

## **2.6. Eletroforese de peptídeos obtidos da degradação de caseína**

Alíquotas de 50 µL de uma solução de caseína (1,5mg/mL Tris HCl 0,1M pH 7,5) foi adicionada a 20 µL da amostra contendo a enzima purificada e a solução foi incubada por 3 horas a 37°C. O precipitado foi dissolvido em 25 µL de tampão de amostra, os tubos foram aquecidos a 95°C por 3 min e submetidos a eletroforese (Laemmli 1970). Para os ensaios com inibidor, as amostras foram incubadas por 30 min com os seguintes inibidores: 2 mM TCLK, 2 mM benzamidina, e 20 µM E-64. As condições de temperatura e a degradação da caseína foram verificadas como descrito acima.

## **2.7. Efeito de CaCl<sub>2</sub> e NaCl<sub>2</sub>**

Para testar o efeito de diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> e NaCl<sub>2</sub> sob a atividade da enzima parcialmente purificada, o extrato enzimático foi adicionado a uma solução de 0,5 mM L-BApNA em 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT e 1 mM benzamidina. A concentração final de sódio e cálcio variou de 0 a 40 mM.

## **2.8. Efeito de inibidores de protease**

Inibidores de protease foram selecionados para testar seu efeito sobre a atividade de proteases das frações parcialmente purificadas, usando concentrações crescentes dos inibidores, de acordo com trabalhos publicados. Os ensaios com inibidores foram conduzidos usando os seguintes inibidores e concentrações: tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK, 0,005 – 1,0 mM), pepstatina (0,05 - 10 µM), trans-(epoxisuccinil)-l-leucilamino-4-guanidinobutano (E-64, 0,001 – 0,01 mM) e ácido etilenediaminetetraacético (EDTA, 10 - 100 mM, inibidor de metalo-proteases). As amostras das enzimas parcialmente purificadas foram incubadas por 15 min com os inibidores de diferentes proteases e L-BApNA foi subsequentemente adicionado a mistura, incubado por mais 15 min e a atividade amidásica foi determinada como previamente descrita.

## 2.9. Parâmetros cinéticos

Determinação dos parâmetros cinéticos  $K_{M \text{ app}}$  e  $V_{\text{max app}}$  foi conduzida em Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM DTT, 1 mM benzamidina e o substrato L-BAPNA com concentrações variando de 0,05 a 1,2 mM. A atividade amidásica foi verificada conforme descrito acima. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa SigmaPlot (SPSS, 2000).

## 2.10. Análises estatísticas

Os resultados da atividade enzimática em cada experimento foram submetidos a análise de variância univariada e as médias foram comparadas usando o teste LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ) (PROC GLM SAS Institute 2002). Regressões não-lineares, a equação de Michaelis-Menten, foram realizadas para estimar os parâmetros cinéticos ( $K_{M \text{ app}}$  e  $V_{\text{max app}}$ ) utilizando o procedimento de ajuste de modelos do SigmaPlot (SPSS 2000). Os resultados dos bioensaios de inibição foram submetidos a análise de próbite (PROC PROBIT; SAS Institute 2002) para avaliar o potencial de inibição e estimar a concentração que inibe 50% da atividade enzimática ( $I_{50}$ ).

## 3. Resultados

### 3.1. Purificação de cisteíno proteases

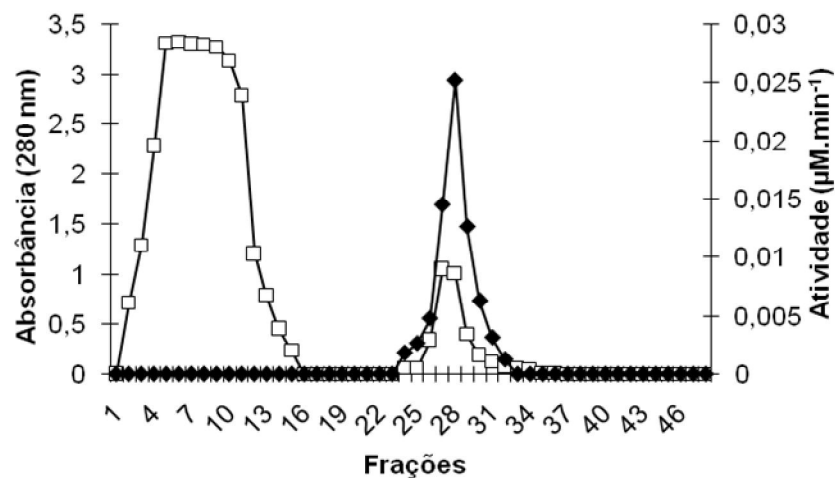
O processo de dissecar o intestino de *S. zeamais* é complexo, por isso o extrato de todo o inseto foi utilizado para a purificação de cisteíno proteases de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (com e sem custo associado à resistência) do gorgulho do milho *S. zeamais*. Cisteíno proteases foram parcialmente purificadas usando coluna de afinidade thiol-sepharose. O fator de purificação foi de 87,5 a 170,7, com um rendimento de 3,75 a 6% e com atividade específica de 17,000 a 36,300 nM/min/mg proteína (Tabela 1). A população resistente sem custo do gorgulho do milho teve menor atividade enzimática e fator de purificação, em comparação com a população susceptível (aproximadamente metade). Porém o rendimento foi 1,6 vezes maior em relação a população susceptível.

**Tabela 1**

Purificação de cisteína protease de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho *S. zeamais*.

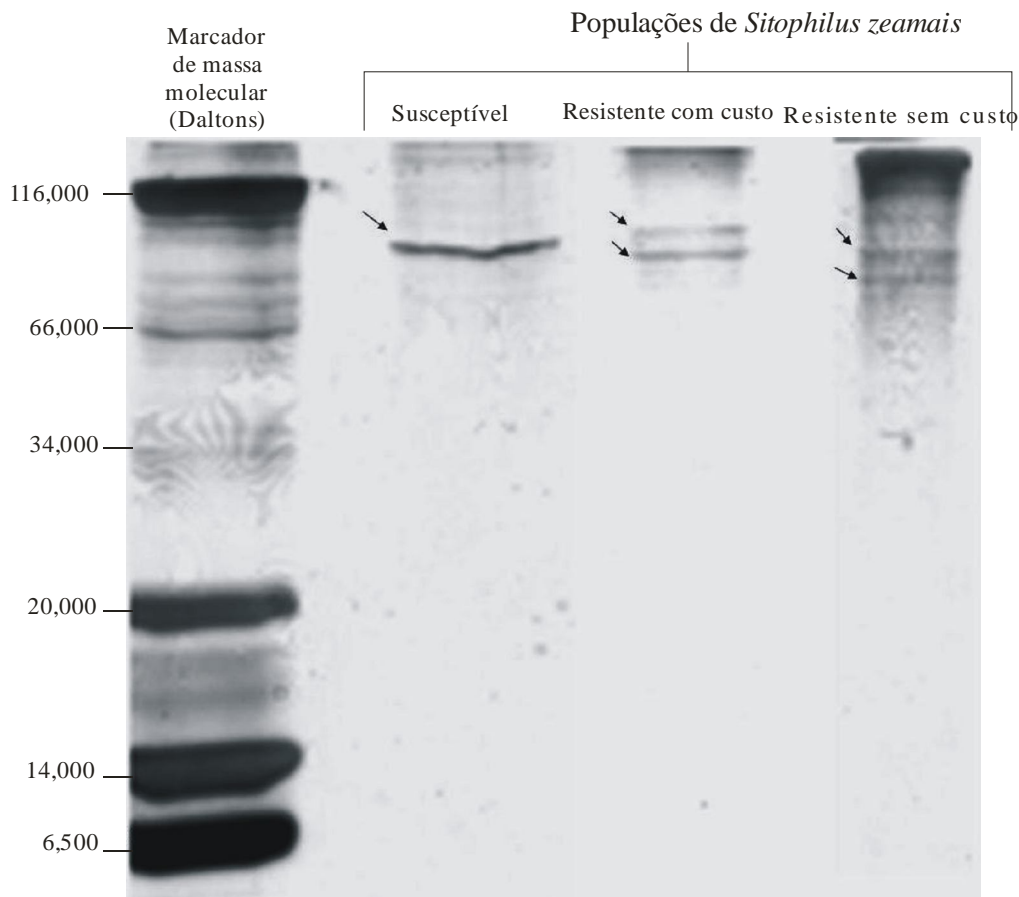
| Etapas da purificação          | Populações           | Atividade total | Atividade específica | Fator de purificação | Rendimento (%) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------|
|                                |                      | (nM/min)        | (nM/min/mg)          |                      |                |
| Extrato bruto                  | Susceptível          | 27              | 212                  | 1,0                  | 100,00         |
|                                | Resistente com custo | 40              | 300                  | 1,0                  | 100,00         |
|                                | Resistente sem custo | 28              | 200                  | 1,0                  | 100,00         |
| Dialisado                      | Susceptível          | 36              | 363                  | 1,7                  | 87,69          |
|                                | Resistente com custo | 41              | 450                  | 1,5                  | 82,44          |
|                                | Resistente sem custo | 29              | 270                  | 1,3                  | 74,57          |
| Coluna de afinidade Aprotinina | Susceptível          | 23              | 454                  | 2,1                  | 29,33          |
|                                | Resistente com custo | 16              | 228                  | 0,7                  | 18,26          |
|                                | Resistente sem custo | 17              | 240                  | 1,2                  | 20,64          |
| Coluna Thiol-Sepharose         | Susceptível          | 14              | 36300                | 170,7                | 3,75           |
|                                | Resistente com custo | 23              | 32000                | 106,5                | 5,00           |
|                                | Resistente sem custo | 21              | 17000                | 87,5                 | 6,00           |

O perfil cromatográfico, correspondente a aplicação do extrato enzimático na coluna de afinidade thiol sepharose, está representado pela figura 1. Um pico de atividade para o substrato testado foi observado.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico do extrato enzimático do gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* em coluna de afinidade thiol-sepharose equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl<sub>2</sub> pH 7,5 e 1 mM EDTA. As proteínas foram eluídas 0,1M Tris-HCl pH 7,5, 25 mM DTT e 1 mM EDTA. Substrato usado: L-BapNA. Absorbância em 280 nm (□); Atividade ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (◆).

Obteve-se uma purificação satisfatória com o extrato das três populações de *S. zeamais*, conforme pode ser observado pela separação de proteínas das frações purificadas na SDS-PAGE (Fig. 2). Uma única banda de massa molecular estimada em 74,000 daltons ficou visível na fração purificada da população susceptível, enquanto duas bandas apareceram nas amostras purificadas das populações resistentes. A massa molecular dessas bandas foram respectivamente 72,000 e 83,000 daltons para a população resistente sem custo e 68,000 e 74,000 daltons para a população resistente com custo. Outros insetos tais como *Sarcophaga peregrine*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* e *Acanthoscelides obtectus* possuem cisteíno com massa molecular de aproximadamente 50,000 daltons (Homma *et al.*, 1994; Matsumoto, *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 2003).

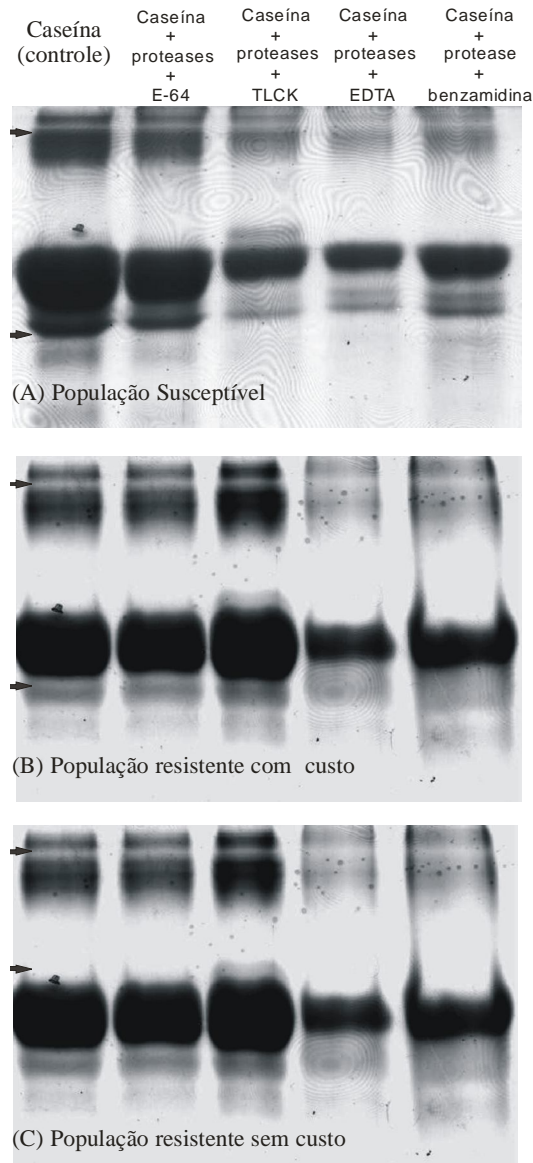


**Figura 2.** SDS-PAGE de cisteíno proteases parcialmente purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais*.

### 3.2. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica da fração purificada das três populações de *S. zeamais* foi detectada com caseína (Figura 3). A pré-incubação da fração purificada foi feita com caseína e com inibidores. E-64, um inibidor de cisteíno protease, inibiu a degradação de caseína pela enzima parcialmente purificada das três populações estudadas. EDTA, benzamidina e TLCK não foram tão eficazes na inibição da degradação de caseína pela enzima purificada das três populações, exceto TLCK para a população resistente sem custo. As três populações tiveram um comportamento diferente, na degradação de caseína, quanto aos inibidores utilizados sugerindo que as cisteíno proteases

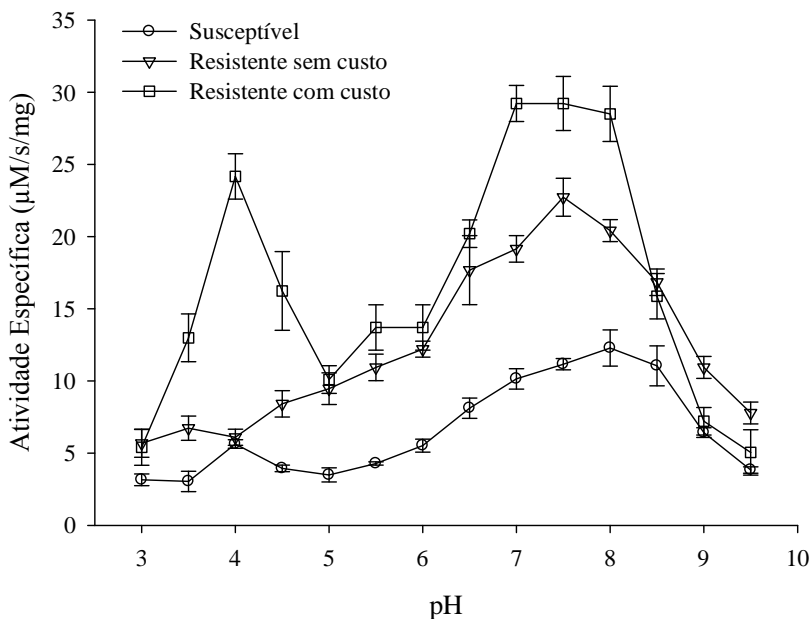
parcialmente purificadas das três populações representam diferentes isoformas de cisteíno.



**Figura 3.** SDS-PAGE de degradação da caseína e inibição de cisteíno proteases purificadas de uma população susceptível (A) e duas resistentes a piretróides (resistente com custo (B) e resistente sem custo (C)) do gorgulho do milho, *S. zeamais*. Inibidores (20  $\mu$ l) de cisteíno protease (E-64 a 20  $\mu$ M), serino protease (benamidina a 12 mM, e TLCK a 0,1 mM) e metaloprotease (EDTA a 12 mM) foram incubados com a enzima parcialmente purificada e o substrato (caseína).  $\blacktriangleright$  Caseína.

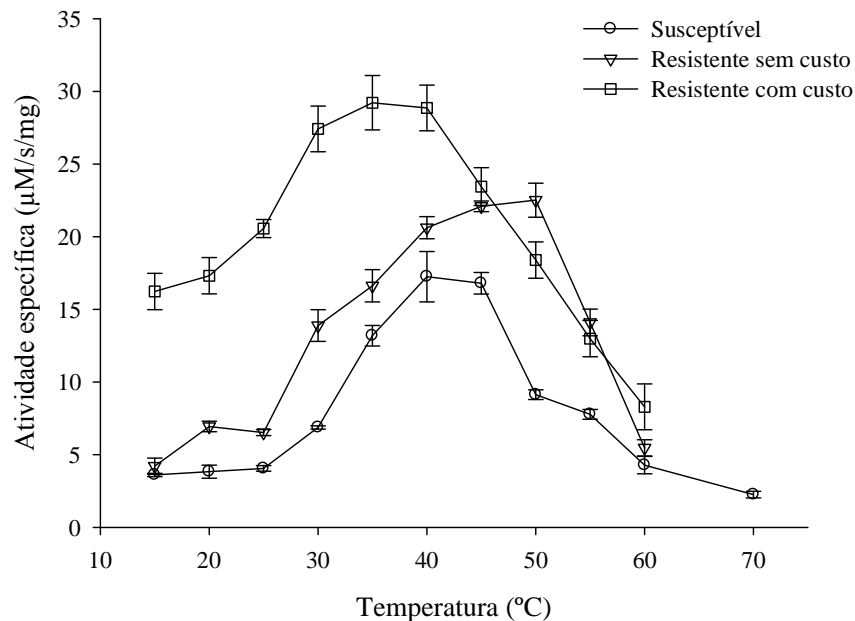
### 3.3. Propriedades bioquímicas

A atividade da enzima parcialmente purificada das três populações em diferentes pH foi determinada a 25°C com o substrato L-BApNA. O perfil de atividade de cisteíno da população resistente com custo teve dois picos de atividade em diferentes valores de pH (4,0 e 7,5), já a população susceptível e a resistente sem custo tiveram apenas um pico de atividade 8,0 e 7,5, respectivamente (Fig. 4). Estes resultados indicam a presença de diferentes formas da enzima. Como os picos de atividade foram observados nos pH 7,0 e 8,0 para as três populações, todos os ensaios subsequentes foram conduzidos em pH 7,5.



**Figura 4.** Efeito do pH sobre a atividade de cisteíno protease purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

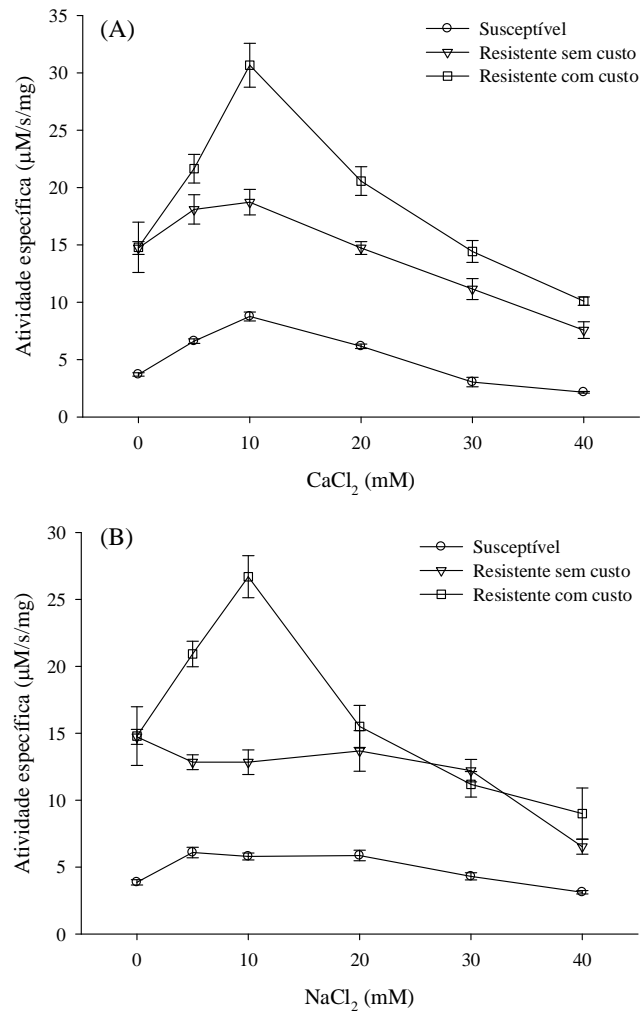
A temperatura de melhor atividade da enzima purificada variou entre as populações (Fig. 5). O maior valor de atividade foi obtido entre 30 e 40°C para a população resistente com custo, 45 e 50°C para a população resistente sem custo e 40 e 45°C para a população susceptível.



**Figura 5.** Efeito da temperatura sobre a atividade de cisteína protease purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

A atividade de cisteína purificada das três populações de *S. zeamais* aumentou com as crescentes concentrações de cálcio até 10 mM e diminuiu com concentrações maiores (Fig. 6A). Ligações de cálcio aos resíduos de aminoácido da tripsina produz uma mudança conformacional e em temperaturas mais baixas, esse complexo torna a conformação mais rígida impedindo que ocorra autólise (Sipos e Merkel, 1970; Vajda e Garai 1981). Como L-BAPNA, o substrato utilizado neste trabalho, é o substrato para cisteína e também para serino proteases (distinguidos apenas pela adição do inibidor de serino protease, benzamidina, na mistura de reação), a estrutura da enzima deve ser semelhante e conter sítios de ligação de cálcio. Estes resultados sugerem que as enzimas proteolíticas do tipo cisteína proteases parcialmente purificadas das três populações de *S. zeamais*, possivelmente estejam sendo estabilizadas por íons cálcio, levando a uma mudança na conformação das moléculas de enzima e melhorando o posicionamento do centro ativo, acarretando assim aumento da atividade na presença de 10 mM de íons cálcio.

A atividade de cisteíno protease purificada da população resistente com custo, utilizando L-BApNA como substrato, foi significativamente maior a 10 mM NaCl<sub>2</sub> em relação a população susceptível, que não teve a atividade alterada na presença de NaCl<sub>2</sub>. Já a população resistente sem custo reduziu a atividade de cisteíno em todas as concentrações de NaCl<sub>2</sub> testadas (Fig 6B). Cisteíno purificada das três populações tiveram um comportamento diferente em relação a presença de NaCl<sub>2</sub>. A presença deste sal na solução altera a estabilidade e conformação da enzima, reduzindo ou aumentando a atividade proteolítica, dependendo do arranjo conformacional.



**Figura 6.** Efeito de Ca<sup>++</sup> (A) e Na<sup>++</sup> (B) sobre a atividade de cisteíno protease purificada de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais*. Cada símbolo representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

### 3.4. Parâmetros cinéticos

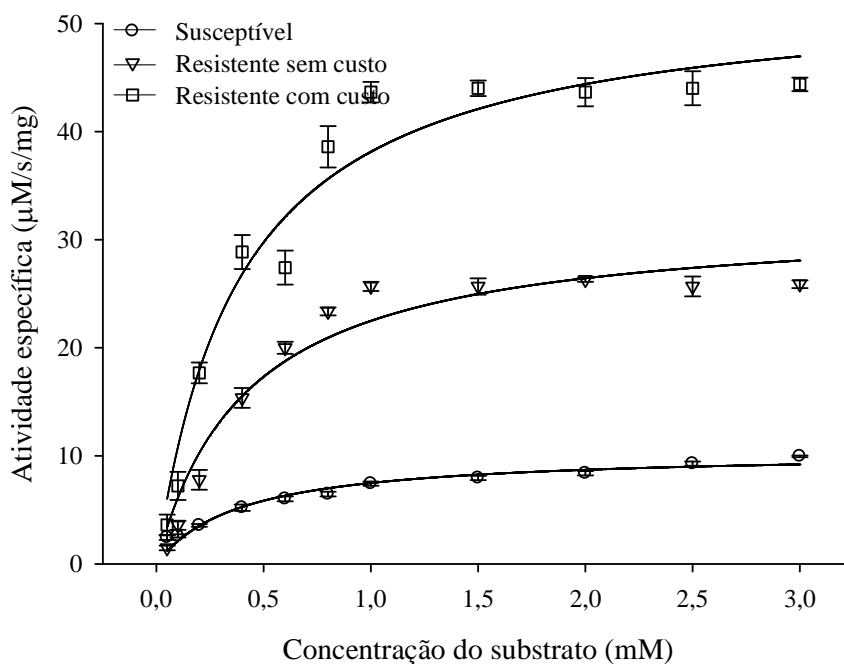
Cisteíno proteases, purificadas das três populações apresentaram curva de concentração *versus* velocidade do tipo hiperbólica, seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten na faixa de concentração de 0,05 a 3 mM do substrato analisado (Fig. 7). A afinidade de cisteíno proteases purificadas (representado pelo valor de  $K_{M\ app}$ ), foram estimadas para cada população (Tabela 2). Nenhuma diferença significativa entre as populações de *S. zeamais* ( $p > 0.05$ ) foi observada, em relação aos valores de afinidade para o substrato (i.e.  $K_{M\ app}$ ) das cisteíno purificadas (Tabela 2). O valor de  $K_{M\ app}$  encontrado aqui é semelhante ao obtido por outros autores para cisteíno usando *p*-nitroanilida como substrato (Pereira *et al.* 2001; Mohamed *et al.* 2005). O valor de  $K_{M\ app}$  para cisteíno é maior do que o de serino proteases, indicando que tripsinas-*like* tem mais afinidade por L-BApNA do que cisteíno.

Em contraste com os valores de  $K_{M\ app}$ , os quais foram similares entre as populações de *S. zeamais*, a atividade (i.e., valores de  $V_{max\ app}$ ) das cisteíno proteases difere entre as populações. As  $V_{max\ app}$  para cisteíno purificada da população resistente com custo foi 5x maior do que  $V_{max\ app}$  da população susceptível e a eficiência de hidrólise da população resistente sem custo foi 3x mais rápida do que a população susceptível.

#### Tabela 2

Parâmetros cinéticos de cisteíno proteases purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho *S. zeamais*. Resultados são reportados com a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Média seguida da mesma letra na coluna não são significativamente diferente entre si pelo teste de Fischer' s LSD ( $P < 0,05$ ).

| População            | $K_{M\ app}$ (mM) | $V_{max\ app}$ ( $\mu$ M/s/mg) |
|----------------------|-------------------|--------------------------------|
| Susceptível          | $0,38 \pm 0,04$ a | $10,40 \pm 0,32$ c             |
| Resistente com custo | $0,39 \pm 0,04$ a | $53,10 \pm 1,90$ a             |
| Resistente sem custo | $0,42 \pm 0,05$ a | $32,04 \pm 1,20$ b             |



**Figura 7.** Gráfico de Michaelis-Menten de cisteíno proteases purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais* ( $P < 0,001$ ;  $R^2 > 0,94$ ). Cada símbolo com sua barra de erro representa a média e o erro padrão das três replicatas ( $n = 3$ ).

### 3.5. Efeito de inibidores

O efeito de inibidores específicos sobre a atividade de cisteíno parcialmente purificadas foi diferente entre as populações, exceto para EDTA (inibidor de metaloprotease), que não difere entre as populações com uma porcentagem de inibição inferior a 50% (Tabela 3). Pepstatina, um inibidor de aspártil protease, também teve uma porcentagem de inibição baixa ( $\leq 32\%$ ) sobre a atividade de cisteíno proteases purificadas. A enzima purificada da população resistente sem custo foi significativamente mais tolerante a estes inibidores de cisteíno protease, em comparação com as outras duas populações. Cisteíno proteases purificadas da população susceptível e resistente sem custo foram fracamente inibidas por TLCK ( $\leq 25\%$  inibição), enquanto a atividade de cisteíno proteases da população resistente com custo foi significativamente mais sensível a este inibidor (Tabela 3). O inibidor de cisteíno

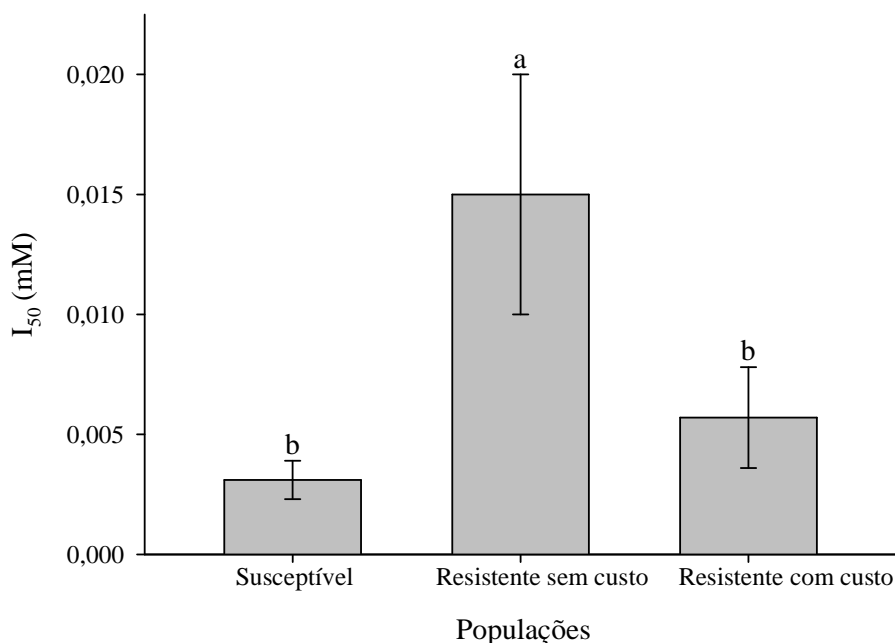
protease E-64 foi o inibidor mais efetivo para as enzimas purificadas das três populações do gorgulho do milho, *S. zeamais*, com porcentagem de inibição maior para a população susceptível.

### Tabela 3

Porcentagem de inibição após o tratamento com diferentes inibidores de enzimas proteolíticas. Os resultados são reportados como a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Média seguida da mesma letra na linha não são significativamente diferente entre si pelo teste LSD de Fischer ( $P < 0.05$ ).

| Inibição  | Concentração<br>(mM) | Inibição (%)       |                      |                      |
|-----------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|           |                      | Susceptível        | Resistente com custo | Resistente sem custo |
| TLCK      | 1,28                 | 25,12 $\pm$ 8,18 b | 58,99 $\pm$ 7,19 a   | 13,49 $\pm$ 7,21 b   |
| Pepstatin | 0,01                 | 30,68 $\pm$ 4,05 a | 32,75 $\pm$ 3,63 a   | 18,13 $\pm$ 3,14 b   |
| EDTA      | 100,00               | 40,18 $\pm$ 4,67 a | 46,72 $\pm$ 3,91 a   | 34,87 $\pm$ 2,92 a   |
| E-64      | 0,20                 | 91,00 $\pm$ 1,96 a | 71,01 $\pm$ 6,44 b   | 52,38 $\pm$ 2,54b    |

A atividade de cisteíno proteases das três populações do gorgulho do milho foram ainda caracterizadas através de bioensaios (in vitro) com inibidor específico de cisteíno protease E-64. As curvas foram estabelecidas seguindo o modelo de próbite (baixo  $\chi^2$  ( $< 4,0$ ) e  $P > 0,05$ ), o qual permite estimar o valor de  $I_{50}$ , concentração requerida para inibir 50% da atividade da enzima. O valor de  $I_{50}$  para E-64 foi significativamente maior para a população resistente sem custo, seguido da população resistente com custo e susceptível, que foi mais sensível a este inibidor (Fig. 8).



**Figura 8.** Concentração de E-64 (mM) requerida para inibir 50% da atividade da enzima ( $I_{50}$ ) para cisteíno proteases de uma população susceptível e duas resistentes a piretróides (resistente com custo e resistente sem custo) do gorgulho do milho, *S. zeamais*. Resultados são reportados como a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Médias seguidas pela mesma letra na linha não são significativamente diferente entre si pelo teste LSD e Fischer ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Cisteíno proteases, uma das principais classes de proteases do gorgulho, foram purificadas de uma população susceptível e duas resistentes a inseticidas piretróides do gorgulho do milho (resistente com custo e resistente sem custo) usando cromatografia de afinidade thiol-sepharose. O reconhecimento das proteases purificadas como sendo do tipo cisteíno protease foi feito através da caracterização, parâmetros cinéticos e sensibilidade a inibidores. A enzima parcialmente purificada das três populações hidrolisou caseína, bem como o substrato sintético, L-BApNA. Íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) a 10

mM, aumentam a atividade proteolítica de cisteíno proteases purificadas das três populações. A presença de sódio (Na) aumentou a atividade da enzima purificada, somente para a população resistente sem custo, as cisteíno proteases purificadas da população susceptível e resistente com custo tem um comportamento diferente, a presença de Na praticamente não altera a atividade da enzima. E-64 (um inibidor específico para cisteíno protease) inibiu eficientemente a atividade das enzimas purificadas, ao contrário dos outros inibidores de proteases (EDTA para metaloproteases, pepstatina para aspartil proteases e TLCK para serino proteases), como esperado para cisteíno proteases (Pereira *et al.*, 2001; Salvasen e Nagase, 2001; D'Avila-Levy *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). A cisteíno protease purificada da população susceptível foi bem mais sensível a inibição por E-64, provavelmente devido a sua maior eficiência no processo de purificação de cisteíno protease.

A eficiência de purificação variou, entre as três populações, com nível de purificação bom para as três (entre 87,5 e 170,7x). A eficiência de purificação durante os processos de cromatografia foi maior para a população susceptível, que teve o menor rendimento e conseqüentemente maior atividade específica de cisteíno protease comparada com as populações resistentes. A SDS-PAGE das frações purificadas revelou uma única banda de massa molecular 74,000 daltons na população susceptível, e duas bandas de 72,000 e 83,000 daltons na população resistente com custo e 68,000 e 74,000 daltons na população resistente sem custo. Esse valor de massa molecular é semelhante ao já reportado para outras espécies de *Sitophilus* (Matsumoto *et al.*, 1998) e maior do que o reportado para cisteíno proteases de outras espécies de insetos, geralmente por volta de 50,000 daltons (Homma *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995, 1997; Melo *et al.*, 2003). Provavelmente as cisteíno proteases purificadas das três populações pertencem a família 3, as quais são maiores do que os membros das outras duas famílias, são moléculas mais complexas com massa molecular de 60 a 120 kDa.

Cisteíno proteases purificadas das três populações de *S. zeamais* tem um comportamento diferente quanto a degradação de caseína e ação de inibidores; as proteases purificadas foram inibidas pelo inibidor específico de cisteíno E-64, sendo a enzima purificada da população resistente com custo a menos sensível, o que também pode ser comprovado pelo seu maior valor de  $I_{50}$ . O perfil de atividade de cisteíno proteases em diferentes pH e temperatura foi diferente entre as populações, já a

afinidade de cisteíno proteases pelo substrato ( $K_M$  app) foi similar entre as três populações. A atividade ( $V_{max}$  app) de cisteíno proteases purificadas da população resistente com custo foi 3x e 5x maior do que as  $V_{max}$  app da população resistente sem custo e susceptível respectivamente. Estes resultados, indicam a existência de diferentes isoformas de cisteíno proteases, uma diferença quantitativa entre as três populações.

Acredita-se que uma maior atividade de cisteíno proteases nas populações resistentes a inseticidas do gorgulho do milho pode mitigar o custo fisiológico (e o custo adaptativo) usualmente associado à resistência a inseticidas (Araújo *et al.*, 2008a). Se assim for, diferentes isoformas e maior atividade de cisteíno proteases são esperadas nas populações resistentes, principalmente na população resistente sem custo fisiológico associado à resistência a inseticidas. No entanto, embora populações resistentes tenham maior atividade de cisteíno proteases do que a população susceptível, esta atividade foi maior para a população resistente com custo, comparado com a resistente sem custo. O aumento da atividade de cisteíno proteases parece desempenhar um papel secundário quanto a mitigação do custo usualmente associado à resistência a inseticidas. O aumento da atividade de serino proteases e amilases é, provavelmente, o principal mecanismo fisiológico que diminui o custo adaptativo associado à resistência a inseticidas, conforme reportado nas investigações preliminares com populações resistentes do gorgulho do milho (Guedes *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008ab).

Resistência a inseticidas foi associada a uma maior atividade de cisteíno proteases nas populações do gorgulho do milho resistentes a inseticidas estudadas. Esta maior atividade de cisteíno proteases tem um importante papel no aumento e mobilização de energia e no fornecimento de aminoácidos para manter os mecanismos de resistência, o desenvolvimento e a reprodução do inseto (Ahmed *et al.*, 1998; Scott 1999; Wilkins *et al.*, 1999; Guedes *et al.*, 2006), quando comparado com a população susceptível. Provavelmente a vantagem metabólica conferida pela elevada atividade de diferentes cisteíno proteases das populações resistentes de *S. zeamais* estejam provendo um aumento de aminoácidos livres, produto da degradação proteolítica (peptídeos e proteínas), importantes para a síntese de enzimas detoxificativas como citocromo p450, monoxigenases, glutathiona-S-transferase e esterases, bem como suprindo a energia requerida durante o estresse provocado pelo inseticida.

## 5. Referências

- Adda, C., Borgemeister, C., Biliwa, A., Meikle, W.G., Markham, R.H., Poehling H.M., 2002. Integrated pest management in post-harvest maize: a case study from the Republic of Togo (West Africa). *Agriculture Ecosystems and the Environment* 93, 305-321.
- Alaoui, A., Gourdoux, L., Atay, Z.K., Moreau, R., 1994. Alterations in carbohydrate metabolism induced in *Locusta migratoria* after poisoning with the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 50, 183-189.
- Alaoui, A., Moreau, R., Gourdoux, L., 1997. Effects of deltamethrin on glucose catabolic pathways in the isolated fat body of adult male *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116,17-21.
- Araújo, R.A, Guedes, R.N.C, Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008a. Enhanced proteolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 44, 354-359.
- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008b. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bulletin of Entomological Research* 98, 417-424.
- Badmin, J.S., 1990. IRAC survey of resistance of stored grain pests: results and progress. *Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored Product Protection* (ed. by F. Fleurrat-Lessard & P. Ducom), INRA/SDPV, Bordeaux, France, 973-981.
- Baker, J.E. 1982. Digestive proteinases of *Sitophilus weevils* (Coleoptera: Curculionidae) and their response to inhibitors from wheat and corn flour. *Canadian Journal of Zoology* 60, 3206-3214.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. 1986. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annual Biochemistry* 72, 248-254.

- Brown, S.L., Lee, R.D., 2002. Effect of planting date, variety and degree of ear maturation on the colonization of field corn by maize weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Entomology Science* 37, 137-142.
- Champ, B.R., Dyte, C.E., 1976. *FAO Global Survey of Pesticide Susceptibility of Stored Grain Pests*. FAO/UN, Rome.
- Chevillon, C., Bourguet, D., Rousset, F., Pasteur, N., Raymond, M., 1997. Pleiotropy of adaptative change in population: comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. *Genetical Research* 68, 195-203.
- Chown, S.L., Gaston, K., 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Research* 74, 87-120.
- Coustau, C., Chevillon, C., French-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecology and Evolution*, 15: 378-383.
- D'Avila-Levy, C.M., Souza, R.F., Gomes, R.C., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H., 2003. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. *Arch Biochem Biophys* 420,1-8.
- Erlanger, B.F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., 2007. Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistant and susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 43, 167-170.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Peternelli, L.A., 2005. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research* 41, 271-281.
- Fragoso, D.B., Guedes, R.N.C., Rezende, S.T., 2003. Biochemical mechanisms of insecticides resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Exp. Et Appl.* 109, 21-29.
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P., Reznick, D.N., 2007. Adaptative versus non-adaptative phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21, 394-407.
- Gould, F., 1984. Role of behavior in the evolution of insect adaptation to insecticides and resistant host plants. *Bulletin Entomological Society of America* 30, 34-40.

- Guedes, R.N.C., 1991. Resistência a inseticidas: desafio para o controle de pragas de grãos armazenados. *Seiva* 50, 24-29.
- Guedes, R.N.C., 1990. Manejo integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. *Revista Brasileira Armazenamento* 15, 3-48.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1994. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). *International Journal Pest Management* 40, 103-106.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.G., Santos, J.P., Cruz, C.D., 1995. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Stored Products Research* 31, 145-150.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.
- Hagstrum, D.W., Flinn, P.W., Howard, R.W., 1996. Ecology. In Bh. Subramayam & D.W. Hagstrum (Eds.) *Integrated Management of Insects in Stored Products*, New York, Marcel Dekker, 71-134.
- Harak, M., Lamprecht, I., Kuusik, A., Hiiesaar, K., Metspalu, L., Tartes, U., 1999. Calorimetric investigations of insect metabolism and development under the influence of a toxic plant extract. *Thermochimica Acta* 333, 39-48.
- Haubruge, E., Arnaud, L., 2001. Fitness consequences of malathion-specific resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), and selection for resistance in the absence of insecticide. *Journal of Economic Entomology* 94, 552-557.
- Haynes, K.F., 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review Entomology* 33, 149-168.
- Homma, K., Kurata, S., Natori, S., 1994. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH'sape'4, in embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of marginal discs. *Journal Biology Chemistry* 269, 15258-15264.
- Hostetler, M.E., Anderson, J.F., Lanciani, C., 1994. Pesticide resistance and metabolic rate in *German cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae). *Florida Entomologist* 77, 288-290.

- Houseman, J.G., Thie, N.M.R., 1993. Difference in digestive proteolysis in the stored maize beetles - *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Protephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 86, 1049-1054.
- Hoy, C.W., Head, G.P., Hall, F.R., 1998. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. *Annual Review Entomology* 43, 571-594.
- Jallow, M.F.A., Hoy, C.W., 2005. Phenotypic variation in adult behavioral response and offspring fitness in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in response to permethrin. *Journal of Economic Entomology* 98, 2195-2202.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lockwood, J.A., Sparks, T.C., Story, R.N., 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Entomological Society of America* 30, 41-51.
- Matsumoto, I., Watanabe, H., Abe, K., Arai, S., Emori, Y., 1995. A putative digestive cysteine proteinase from *Drosophila melanogaster* is predominantly expressed in the embryonic and larval midgut. *European Journal Biochemistry* 227, 582-587.
- 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. *Journal Biochemistry* 121, 464-476.
- Matsumoto, I., Abe, K., Arai, S., Emori, Y., 1998. Functional expression and enzymatic properties of two *Sitophilus zeamais* cysteine proteinases showing different autolytic processing profiles in vitro. *Journal biochemistry* 123, 693-700.
- Melo, F.R., Mello, M.O., Franco, O.L., Rigden, D.J., Mello, L.V., Genu, A.M., Silva-Filho, M., Gleddie, S., Grossi-de-Sá, M.F., 2003. Use of phase display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtecus* cysteine proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1651, 146-152.
- Mohamed, S.A., Fahmy, A.S., Mohamed, T.M., Hamdy, S.M., 2005. Proteases in egg, miracidium and adult of *Fasciola gigantica*. Characterization of serine and cysteine proteases from adult. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142, 192 – 200.

- Nath, B.S., 2000. Changes in carbohydrate metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. exposed to organophosphorus insecticides. *Pesticide Biochemistry Physiology* 68, 1504-1515.
- Nath, B.S., 2002. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74, 73-84.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Tótoia, M.R., Marco, P.D., 2007. Competition between insecticide-susceptible and -resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Chemosphere* 69, 17-24.
- Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Corrêa, A.S., Damasceno, B.L., Santos, C.T., 2005a. Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): Há vencedor? *Neotropical Entomology* 34, 981-990.
- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., 2005b. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, Vancouver 140, 369-380.
- Pagliucci, M., Muren, C.J., 2003. Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution* 57, 1455-1464.
- Pereira, C., Pereira, E., Cordeiro, E., Della-Lucia, T., Totola, M., Guedes, R.N.C., 2009. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. *Crop Protection* 28, 168-173.
- Pereira, M.T., Lopes, M.T.P., Meira, W.O., Salas, C.E., 2001. Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for This Enzyme. *Protein Expression and Purification* 22, 249-257.
- Price, T.D., Qvarnstrom, A., Irwin, D.E., 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270, 1433-1440.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Sammons, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 22, 41-47.

- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., Chevillon, C., 2001. Insecticide resistance in mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112-113, 287-296.
- Reeck, G., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J.E., Kramer, K.J., 1999. Insect proteinases. In: Turk V (ed) *Proteases: new perspectives*. Birkhauser Verlag Basel Boston Berlin, 125–148.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Santos, J.P., 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 39, 21-31.
- SAS Institute. 2002. *SAS/STAT User's Guide*, v. 8. SAS, Cary: SAS Institute.
- Scott, J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 757-777.
- Sipos, T., Merkel, J.R., 1970. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* 9, 2766-2775.
- SPSS - SigmaPlot 2000. *User's Guide*, Revised Edition. SPSS, Chicago.
- Subramanyam, B.h., Hagstrum, D.W., 1996. Resistance measurement and management. In: Subramanyam, Bh. & Hagstrum, D.W. (Eds.) *Integrated Management of Insects in Stored Products*, New York, Marcel Dekker, 331-397.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of Digestion. In: *Comprehensive Molecular Insect Science* 4, 171-224.
- Vajda, T., Garai, A., 1981. Comparison of the effect of calcium (II) and manganese (II) ions on trypsin autolysis. *Journal of Inorganic Biochemistry* 15, 307-315.
- White, N.D.G., Leesch J.G., 1996. Chemical Control. In: Bh. Subramanyam & D.W. Hagstrum (Eds.) *Integrated Management of Insects in Stored Products*, New York, Marcel Dekker, 287-330.
- Wilkins, R.M., Ahmed, S., Mantle, D., 1999. Comparative effect of fenitrothion treatment on intracellular protease activities in insecticide-resistant and susceptible strains of *Musca domestica* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 124, 337–343.

## **Agradecimentos**

Ao suporte financeiro fornecido pela FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Ao Dr. J.P. Santos, pelo fornecimento do estoque inicial da população susceptível.

## Considerações Finais

Em continuação aos estudos com populações de *Sitophilus zeamais*, resistentes a inseticidas piretróides, serino e cisteíno proteases foram purificadas de uma população susceptível e duas resistentes, com e sem custo fisiológico associado a resistência. O objetivo foi verificar o espectro destas enzimas nestas populações e quais seriam os possíveis mecanismos que possibilitariam a mitigação deste custo na população resistente sem custo fisiológico associado.

Quanto a purificação de serino proteases tripsinas-*like*, pode-se sugerir que as populações resistentes são mais eficientes, uma maior atividade de serino protease ocorre em decorrência de uma maior produção de enzimas e expressão de isoformas, o que possibilita mitigar o custo fisiológico associado a resistência sem comprometer o desenvolvimento normal.

Cisteíno proteases parece ter um papel secundário quando a mitigação do custo fisiológico associado a resistência. Conforme observado o espectro de cisteíno protease é diferente entre as três populações analisadas, apresentam um comportamento distinto quanto aos ensaios com inibidores, pH e parâmetros cinéticos. Há uma diferença estrutural e qualitativa entre as populações estudadas. A eficiência de purificação foi melhor para a população susceptível, obtendo-se um material bem mais homogêneo, comparado com as populações resistentes.

Esses resultados corroboram com as diferenças observadas para a atividade de proteases do extrato bruto dessas três populações de *S. zeamais*, confirmando a hipótese do envolvimento de enzimas proteolíticas mitigando o custo fisiológico associado com a manutenção dos mecanismos de resistência a inseticidas do gorgulho do milho. Outros trabalhos ainda devem ser feitos para evidenciar ainda mais estes resultados, como a utilização de outros métodos de purificação de proteínas para separar isoformas, pois a existência de isoenzimas permite o ajuste do metabolismo para satisfazer as necessidades de desenvolvimento. Com a pressão de seleção indivíduos mais eficientes, quanto a utilização e armazenamento de energia, são selecionados e com isso o custo fisiológico associado a resistência tende a diminuir.