

RÚBIA APARECIDA DE ARAÚJO

**ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E
DIGESTIVO EM POPULAÇÕES DE CARUNCHO-DO-
MILHO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEL A
PIRETRÓIDES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

RÚBIA APARECIDA DE ARAÚJO

**ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E
DIGESTIVO EM POPULAÇÕES DE CARUNCHO-DO-
MILHO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEL A
PIRETRÓIDES**

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

Aprovada: 23 de fevereiro de 2006.

Profa. Mariella Bomtenpo Duca de Freitas

Prof. José Eduardo Serrão

Profa. Maria Helena Nasser Brumano
(Conselheira)

Profa. Maria Goreti Almeida de Oliveira
(Conselheira)

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

Dedicatória

A Deus,

As minhas queridas mães, Judite e Gorete;

A todos os meus irmãos e irmãs;

Agradecimentos

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;

A Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela confiança depositada e constante orientação; Muito Obrigada.

À conselheira Maria Goreti Almeida de Oliveira, pelo aconselhamento durante o mestrado;

Aos amigos do laboratório Daniel, Joelma, Badji, Sérgio, Berghem, Eugênio, Alberto, Camila, Júlia, Fábio, Nelsa, Luciana e Célia, pela convivência fraterna, e principalmente Bruno e Geraldo, pela grande ajuda nos ensaios enzimáticos;

À minha grande amiga Marcy, pela amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos muitos momentos de alegria;

A todos os meus amigos que trabalham na Entomologia, pela convivência e brincadeiras do dia-a-dia;

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

A Javier Antônio Benavides Montaña pelo amor, carinho e força depositados na etapa final do Mestrado;

Às minhas queridas mães, Judite e Gorete, por terem sempre me incentivado e por não terem medido esforços para proporcionar o melhor para a minha vida;

ÍNDICE

	Página
Resumo	v
Abstract.....	vii
Introdução Geral	01
Referência Bibliográfica.....	04
Capítulo 1: Enzimas de Metabolismo Energético em Populações de Caruncho-do-Milho Resistentes e Susceptível a Piretróides	07
Resumo	08
Abstract	09
Introdução	10
Material e Métodos	13
Resultados	17
Discussão	24
Referência Bibliográfica	28
Capítulo 2: Enzimas Digestivas em Populações de Caruncho-do-Milho Resistentes e Susceptível a Piretróides	34
Resumo	35
Abstract	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados	42
Discussão	50
Referência Bibliográfica.....	54
Considerações Finais.....	58

RESUMO

ARAÚJO, Rúbia Aparecida, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Enzimas de Metabolismo Energético e Digestivo em Populações de Caruncho-do-Milho Resistentes e Susceptível a Piretróides. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Conselheiras: Maria Goreti Almeida de Oliveira, Maria Helena Nasser Brumano.

Populações de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) de susceptibilidade distintas a inseticidas podem apresentar maior eficiência na mobilização de suas reservas em populações resistentes possibilitando a produção de seus aparatos de defesa contra inseticidas, sem ocasionar prejuízo para sua performance reprodutiva. Isto pode ser resultado de um maior acúmulo de carboidratos e proteínas provenientes de uma alta taxa digestiva. Para testar esta hipótese realizamos ensaios enzimáticos com as enzimas do metabolismo energético e digestivo nas populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora, e na população susceptível de Sete Lagoas. Além disso, realizamos bioensaios concentração-resposta e teste respirométrico nas três populações. A população de Jacarezinho apresentou uma taxa respiratória significativamente mais alta que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora. Entre as enzimas do metabolismo energético, apenas trealase e lipase apresentaram diferença significativa entre as três populações, mostrando atividade mais alta para a população de Juiz de Fora. Verificamos, também, que a enzima trealase segue a cinética de Michaelis-Menten e através de sua equação estimamos os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Os resultados obtidos nos ensaios com glicosidase e amilase indicam que apenas amilase apresentou diferença significativa em sua atividade entre as populações, com um valor mais alto para a população de Jacarezinho. Entre as enzimas digestivas, apenas atividade de protease total não diferiu significativamente entre as três populações. As populações de Juiz de Fora e Jacarezinho mostraram as mais altas atividades de serino protease (amidásica), cisteíno protease e celulase. Entretanto, a maior atividade de serino protease (esterásica) foi exibida apenas pela população de Juiz de Fora. Entre as enzimas de acesso do inseto ao alimento, pectina liase não apresentou diferença significativa em sua atividade entre as três populações, sendo que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora apresentaram atividades mais altas para poligalacturonase. As enzimas serino-protease (amidásica e esterásica), cisteíno-protease e celulase foram as enzimas que mais contribuíram para a divergência entre as populações. Podemos

concluir que o metabolismo energético e digestivo dos insetos provenientes da população de Jacarezinho parece ocorrer de maneira eficiente possibilitando a mitigação do custo fisiológico associado ao fenômeno de resistência nesta população.

ABSTRACT

ARAÚJO, Rúbia Aparecida, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006.

Digestive and energy metabolism enzymes from pyrethroid resistant and susceptible populations of maize weevil. Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Committee Members: Maria Goreti Almeida de Oliveira, Maria Helena Nasser Brumano.

Studies on *Sitophilus zeamais* populations of distinct insecticide susceptibility suggest higher efficiency in mobilizing energy in some resistant populations, making possible the production of their defense apparatus against insecticide, without impairing their reproductive performance. This efficiency can be the result of a high carbohydrates and proteins accumulation originated from a high digestive rate. To test this hypothesis, a series of enzymatic assays with energy metabolism and digestive enzymes was carried out in Jacarezinho and Juiz de Fora resistant populations, and in the Sete Lagoas susceptible population. In addition, concentration-response bioassays and respirometric tests were carried out in the same populations. The Jacarezinho population showed a respiration rate significantly higher than the others. Among the energy metabolism enzymes, only trehalase and lipase showed significant differences among the three populations, showing higher activity in the Juiz de Fora population. Trehalase also follows the Michaelis-Menten kinetic model and the K_M and V_{max} kinetic parameters were estimated. The results obtained in the assays with glycosidase and amylase (sugar hydrolysis) indicate that only amylase showed a significant difference in activity among populations, with higher value for Jacarezinho. Among digestive enzymes, only total proteinase did not differ significantly among the three populations. Juiz de Fora and Jacarezinho showed the higher activities of serine-proteinase (amylolytic), cysteine-proteinase and cellulase. However, the highest activity of serine-proteinase (esterolytic) was exhibited only by the Juiz de Fora population. Among the enzymes for food access, pectin lyase did not show significant difference in activity among the three populations. Sete Lagoas and Juiz de Fora showed higher polygalacturonase activity. Serine-proteinase (amylolytic and esterolytic), cysteine-proteinase and cellulase were the enzymes that contributed the most to the divergence among the populations.

INTRODUÇÃO GERAL

A resistência a inseticidas é um grande problema no controle de artrópodes considerados pragas agrícolas e vetores de doenças (Tabashnik, 1990). Este fenômeno é derivado de modificações genéticas que propiciam maior capacidade adaptativa em condições desfavoráveis (Liu *et al.*, 2000).

Estudos sobre resistência a inseticidas são importantes não apenas para os programas de manejo integrado de pragas, mas são também importantes como modelos de evolução de fenótipos recém-adaptados e suas mudanças fisiológicas e genéticas associadas (Coustau *et al.*, 2000, Raymond *et al.*, 2001). Os principais genes responsáveis pela adaptação do indivíduo a um novo ambiente (por exemplo, grãos tratados com inseticidas no caso de carunchos) estão usualmente associados a um custo adaptativo, já que podem estar em desvantagem no ambiente anterior onde pressões de seleção independentes moldaram os fenótipos remanescentes (Coustau *et al.* 2000, Berticat *et al.* 2002). Esta idéia se baseia na visão geral de que ocorre uma realocação de recursos, ou ainda, que processos metabólicos ou de desenvolvimento são afetados, diminuindo assim o potencial reprodutivo do organismo (Berticat *et al.*, 2002).

A seleção para resistência a inseticidas é geralmente acompanhada por efeitos pleiotrópicos, ou seja, vários fenótipos associados a um único gene que podem colocar insetos resistentes em desvantagem quando o uso de inseticidas é interrompido (Coustau *et al.*, 2000, Arnaud & Haubruge 2002). Ainda assim, existem casos de ausência de desvantagem adaptativa ou de performance, observados em indivíduos resistentes a inseticidas de algumas espécies-praga como o besouro vermelho das farinhas *Tribolium castaneum*, e o mosquito *Culex pipiens* (Beeman & Nanis, 1986; Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001). Modificações alélicas (para um menor custo) e seleção de genes modificadores podem amenizar o custo da resistência a inseticidas (Coustau *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002), mas o processo fisiológico dessa diminuição de custo ainda é pouco investigado.

Entre os quatro mecanismos moleculares de resistência a inseticidas (superprodução constitutiva, baixa produção constitutiva, alteração no sítio de ação e mudança induzida na regulação gênica) apenas no último caso não existe expectativa geral de custo fisiológico da resistência (Taylor & Feyereisen, 1996; Coustau *et al.*, 2000). Essas modificações causadas pelo fenômeno de resistência a inseticidas,

geralmente induzem efeitos deletérios no inseto quando há quebra nas rotas com os quais seus alvos (receptores) estão envolvidos (Coustau *et al.*, 2000). Como resultado, o aumento da taxa metabólica se torna necessário para os indivíduos resistentes manterem o mecanismo de defesa, desbalanceando as suas trocas gasosas. Se não acontecer um incremento no metabolismo energético, a realocação de energia pode prejudicar outros processos fisiológicos envolvidos com o desenvolvimento do inseto, sua manutenção e reprodução (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999). A molécula inseticida, por si só, pode interferir também nas reservas de carboidratos e proteínas no corpo gorduroso e sua mobilização no inseto. (Orr & Downer, 1982; Alaoui *et al.*, 1994, 1997; Nath *et al.*, 1997; Nath, 2000, 2002).

Guedes *et al.* (1995) e Ribeiro *et al.* (2003) identificaram o fenômeno da resistência a inseticidas piretróides em populações de caruncho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), presentes em cinco estados do Brasil. Contudo, houve um retrocesso na dispersão do fenômeno (Fragoso *et al.*, 2003, Ribeiro *et al.* 2003), talvez devido à ocorrência de desvantagem adaptativa dos indivíduos resistentes na ausência de inseticidas, o que pode ter reduzido a disseminação da resistência (Muggleton, 1983, Roush & Mckenzie, 1987, Coustau *et al.* 2000).

Fragoso *et al.* (2005), utilizando estudos de crescimento populacional, relatam que em uma das suas populações de *S. zeamais* resistentes a piretróides (Jacarezinho) ocorre desempenho reprodutivo semelhante ao apresentado pela população padrão de susceptibilidade (Sete Lagoas), demonstrando que a resistência a inseticidas em populações desta praga pode não incorrer em custo fisiológico adicional capaz de modificar sua performance reprodutiva. Porém, a performance de desenvolvimento apresentada pela população de Juiz de Fora (outra população resistente) ocorreu em taxas bem inferiores às demais populações.

A população de Jacarezinho vem sendo mantida em laboratório por mais de uma década na ausência de inseticidas sem que haja redução da expressão da resistência, sugerindo que a resistência a inseticidas se encontra fixada nesta população e que a expressão dos genes responsáveis por esta característica, não mais incorrem em desfavorecimento adaptativo (Oliveira *et al.*, 2005).

Guedes *et al.*, (2006) observaram também que as populações resistentes apresentam maiores células de corpo gorduroso, de maneira a favorecer um maior

acúmulo de substâncias de reserva (proteínas totais e carboidratos neutros totais) no interior destes. O envolvimento das reservas de carboidratos na destoxificação das moléculas inseticidas pelos insetos foi também evidenciado nos estudos desenvolvidos por Nath (2000 e 2002) e Alaoui *et al.* (1994 e 1997). Como resultado, uma maior taxa metabólica pode ser necessária para os indivíduos resistentes manterem seus mecanismos de defesa (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999).

De acordo com os estudos de Guedes *et al.* (2006), a população resistente de Juiz de Fora apresentou resultado superior à população susceptível de Sete Lagoas quanto à taxa respiratória, massa corporal e área de trofócito, mesmo apresentando pior performance reprodutiva frente às outras duas populações. Este resultado suporta a hipótese de que a alocação de energia para a produção dos mecanismos de defesa contra inseticidas nos indivíduos resistentes estaria prejudicando suas performances de desenvolvimento, evidenciando assim a existência de um custo adaptativo associado ao fenômeno de resistência. Em contrapartida, a população resistente de Jacarezinho apresentou melhores resultados em todos os parâmetros avaliados, mostrando que a alocação de energia ocorre tanto para a produção dos mecanismos de defesa quanto para seu desenvolvimento.

Suspeita-se que a digestão dos alimentos e mobilização das reservas de energia estocadas no corpo gorduroso de insetos da população resistente, particularmente Jacarezinho, ocorra de maneira mais eficiente que nos insetos da população susceptível, tornando esta população uma excelente competidora devido a maior obtenção de energia e capacidade de manutenção da resistência. Para testar esta hipótese, realizamos ensaios enzimáticos com enzimas responsáveis pelo metabolismo energético e sistema digestivo dos insetos para averiguar diferenças em suas atividades, nas três diferentes populações de caruncho-do-milho. Acredita-se que a atividade destas enzimas possa possibilitar a mitigação do custo fisiológico na população resistente de Jacarezinho. Foram realizados ensaios com as enzimas glicosidase, trealase, glicogênio fosforilase, amilase, lipase, protease, poligalacturonase, pectina liase e celulase.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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.
- Arnaud, L., Haubruge, E., 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56, 2435-2444.
- Beeman, R.W., Nanis, S.M., 1986. Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 79, 580-587.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 72, 41-47.
- 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 in Ecology and Evolution* 15, 378-383.
- 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). *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.
- Guedes, R.N.C., Lima, J.O.L., 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., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B.M., 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., 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.

- Haubruege, 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.
- Hostetler, M.E., Anderson, J.F., Lanciani, C., 1994. Pesticide resistance and metabolic rate in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Florida Entomologist* 77, 288-290.
- Liu, Z., Valles, S.M., Dong, K., 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 991-997.
- Muggleton, J., 1983. Adaptive fitness of malathion-resistant phenotypes of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Applied Ecology* 20, 245-254.
- 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.
- 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., 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.
- Orr, G.L., Downer, R.G.H., 1982. Effect of lindane (c-Hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Pesticide Biochemistry Physiology* 17, 89-102.
- 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.
- 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.

- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology* 32, 361-380.
- Tabashnik, B.E., 1990. Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 83, 1170-1176.
- Taylor, M., Feyereisen, R., 1996. Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Molecular Biology and Evolution* 13, 719-134.

Enzimas de Metabolismo Energético em Populações de
Caruncho-do-Milho Resistentes e Susceptível a Piretróides

Resumo

Populações de *Sitophilus zeamais* de susceptibilidade distinta a inseticidas mostram diferença na mobilização de suas reservas, o que pode possibilitar a produção de seus aparatos de defesa contra inseticidas, sem que isto ocasione prejuízo à sua performance reprodutiva. Para testar esta hipótese realizamos ensaios enzimáticos com enzimas do metabolismo energético, incluindo as envolvidas na hidrólise de açúcares. Verificamos se existem diferenças nas atividades de trealase, glicogênio fosforilase, lipase, glicosidase e amilase nas populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora, e na população susceptível de Sete Lagoas. Além disso, realizamos bioensaios concentração-resposta e ensaios respirométricos nas três populações. De acordo com os resultados obtidos, a população de Jacarezinho apresentou uma taxa respiratória significativamente mais alta que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora, que foram similares. Entre as enzimas do metabolismo energético, apenas trealase e lipase apresentaram diferença significativa entre as três populações, mostrando atividade mais alta para a população de Juiz de Fora. Verificamos, também, que a enzima trealase segue a cinética de Michaelis-Menten e através de sua equação estimamos os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Os resultados obtidos nos ensaios com glicosidase e amilase (enzimas responsáveis pela hidrólise de açúcares) indicam que apenas amilase apresentou diferença significativa em sua atividade entre as populações, com um valor mais alto para a população de Jacarezinho. Podemos sugerir, então, que o alto metabolismo energético dos insetos da população de Juiz de Fora e a maior eficiência na hidrólise de açúcares na população de Jacarezinho possibilita a mitigação do custo fisiológico associado ao fenômeno de resistência nesta população.

Palavras-Chave: resistência a inseticidas, *Sitophilus zeamais*, custo fisiológico, trealase, lipase.

Abstract

Sitophilus zeamais populations of distinct susceptibility to insecticides show difference in the mobilization of energy reserves, what may allow the production of their defense tools, without impairing their reproductive performance. Enzymatic assays with energy-metabolism enzymes, including those involved to sugar hydrolysis were therefore carried out to test this hypothesis. Activities of trehalase, glycogen phosphorylase, lipase, glycosidase and amylase were assessed on Jacarezinho and Juiz de Fora resistant populations, and on Sete Lagoas susceptible population. In addition, concentration-mortality and respirometry bioassays indicated significant differences among the populations. According to the obtained results, the Jacarezinho population showed respiration rate significantly higher than the other two populations, which were similar. Among the energy-metabolism enzymes, trehalase and lipase showed significant difference among the three populations, showing higher activity in the Juiz de Fora population. Trehalase followed the Michaelis-Menten kinetic allowing the estimation of the K_M and V_{max} kinetic parameters. The results obtained in the assays with glycosidase and amylase (sugar hydrolysis) indicate that only amylase showed significant difference in activity among the populations, with higher activity in the Jacarezinho population. These results are suggestive of the higher energy metabolism of the Juiz de Fora population and higher efficiency of sugar hydrolyses in the Jacarezinho population probably mitigating the physiological cost associated with insecticide resistance in this population.

Key words: insecticide resistance, *Sitophilus zeamais*, physiological cost, trehalase, lipase.

INTRODUÇÃO

O caruncho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), é um inseto-praga de grãos armazenados de reconhecida importância econômica (Throne, 1994; Danho *et al.*, 2002). O controle deste inseto é feito principalmente por inseticidas, sendo que o uso intenso desses compostos levou ao aparecimento de diversos casos de resistência (Guedes *et al.*, 1995).

A resistência a inseticidas em pragas de produtos armazenados é um caso particular de resistência, pois além dos prejuízos diretos associados a esta, ainda pode ser disseminada pelo comércio de produtos infestados por indivíduos resistentes (Champ & Dyte, 1976; Guedes, 1991; Subramanyam & Hagstrum, 1996).

Os mecanismos de resistência são o resultado de alterações no genoma do indivíduo, capacitando-o a sobreviver em situações de exposição a doses supostamente letais de inseticidas (Oliveira *et al.*, 2005). Os principais mecanismos de resistência, de acordo com a divisão proposta por Brattsten *et al.*, (1986), são agrupados em comportamentais, fisiológicos e bioquímicos, dentre os quais, o terceiro é de ocorrência mais freqüente e que leva a níveis mais elevados de resistência.

A evolução da resistência a inseticidas está intimamente relacionada com a existência de custos adaptativos associados à expressão do fenômeno (Oliveira *et al.*, 2005). O pleno conhecimento dos mecanismos que regulam estes custos possibilita o desenvolvimento de estratégias de controle que podem vir a serem utilizadas no manejo integrado de pragas (Oliveira *et al.*, 2005). Estes custos geralmente são notados na redução da performance reprodutiva dos indivíduos, ou até mesmo debilitando outros processos fisiológicos importantes para a manutenção dos indivíduos (Foster *et al.*, 2000; Coustau *et al.*, 2000; Arnaud & Haubruge, 2002; Fragoso *et al.*, 2005).

Guedes *et al.*, (2006), realizando estudos com populações de *S. zeamais* de diferentes níveis de susceptibilidade a piretróides, observaram diferenças na morfologia do corpo gorduroso e na taxa respiratória dos insetos, sugerindo uma maior mobilização de reservas para resistir à ação tóxica de inseticidas nas populações resistentes a estes compostos, o que pode estar associado a custos adaptativos do fenômeno da resistência na ausência de inseticidas. Em outros estudos, foi verificado que a manutenção dos mecanismos que conferem resistência a moléculas inseticidas pode demandar uma quantidade de energia adicional e suficiente para tornar os fenótipos resistentes

desfavorecidos adaptativamente em relação aos susceptíveis na ausência de inseticidas (Chevillon *et al.*, 1999; Coustau *et al.*, 2000; Boivin *et al.*, 2001, 2003).

Em contrapartida, existem diversos estudos que também demonstram a inexistência de custos fisiológicos associados à resistência a inseticidas em algumas linhagens (Kence & Jdeide, 1997; Baker *et al.*, 1998; Oppert *et al.*, 2000; Haubruge & Arnaud, 2001; Fragoso *et al.*, 2005). Fragoso *et al.* (2005), utilizando estudos demográficos, relatam que *S. zeamais* provenientes da população resistente de Jacarezinho apresentam desempenho reprodutivo semelhante àquele apresentado pela população padrão de susceptibilidade, demonstrando que a resistência a inseticidas em populações desta praga pode não incorrer em custo fisiológico adicional capaz de modificar sua performance reprodutiva.

Apesar do consumo de O₂ ou a produção de CO₂ representar a soma das demandas energéticas necessárias aos processos fisiológicos dos insetos (Clarke, 1993), são poucos os estudos que utilizam a taxa respiratória média como indicador da capacidade adaptativa de populações de insetos a diferentes condições ambientais (Marais & Chow, 2003). Variações na taxa respiratória média dos insetos podem auxiliar na detecção de custos adaptativos associados à resistência a inseticidas, enquanto modificações na morfologia do corpo gorduroso sugerem a disponibilidade e mobilização de reservas para manutenção do organismo possibilitando sua sobrevivência frente a moléculas tóxicas (Guedes *et al.*, 2006).

No trabalho realizado por Guedes *et al.* (2006) observou-se que *S. zeamais* provenientes da população de Jacarezinho apresentavam maiores valores de taxa respirométrica e de massa corpórea do que os apresentados pelas populações de Sete Lagoas (susceptível) e Juiz de Fora (resistente). Esta maior atividade respirométrica parece estar propiciando aos indivíduos provenientes de Jacarezinho maior eficiência no acúmulo e conseqüente mobilização de suas moléculas de reservas, o que lhes possibilita a produção de seus aparatos de defesa contra inseticidas, sem que isto ocasione em prejuízo para a sua performance reprodutiva.

Para testar esta hipótese e verificar se existem diferenças na mobilização das reservas energéticas, realizamos ensaios enzimáticos com as possíveis enzimas responsáveis pelo metabolismo energético (mobilização de carboidratos e lipídios), incluindo as enzimas responsáveis pela degradação de açúcares provenientes desta mobilização.

Durante a atividade de vôo, ocorre a liberação de neurohormônios que vão ativar algumas enzimas responsáveis pela mobilização de reservas energéticas no corpo gorduroso. Glicogênio fosforilase (Goldsworthy & Mordue, 1989; Candy *et al.*, 1997; Van der Horst *et al.*, 2001) e lipase (Fahmy *et al.*, 2004) são as duas enzimas a serem ativadas durante o vôo, sendo a primeira responsável pela mobilização do glicogênio armazenado levando o aumento dos níveis de trealose na hemolinfa (Goldsworthy & Mordue, 1989; Candy *et al.*, 1997; Van der Horst *et al.*, 2001). A segunda enzima, lipase, converte os triacilgliceróis que estão armazenados no corpo gorduroso em diacilgliceróis, sendo posteriormente transportados para os músculos de vôo pelas lipoforinas (Fahmy *et al.*, 2004). Nos músculos de vôo, diacilgliceróis são hidrolisados e os ácidos graxos liberados são oxidados para fornecer energia ao inseto (Ogoyi *et al.*, 1998; Ryan & Van der Horst, 2000). Lipases estão envolvidas também na digestão (Brahimi-Horn *et al.*, 1989; Biesiot & Capuzzo, 1990) permitindo a absorção dos triacilgliceróis pelo trato intestinal (Steiner *et al.*, 2003).

Para completar o grupo das enzimas responsáveis pelo metabolismo energético dos insetos tem-se a trealase. Na hemolinfa esta enzima é responsável pela hidrólise do dissacarídeo trealose em duas moléculas de glicose (Applebaum, 1985; Beenackers *et al.*, 1985; Friedman, 1978), e é largamente encontrada em plantas, animais e microorganismos (Knuesel *et al.*, 1998). Embora os mamíferos usualmente não ingerirem alimentos contendo trealose e não possuem este dissacarídeo no sangue, eles possuem alta atividade de trealase no intestino, indicando que esta enzima pode estar envolvida na digestão e/ou transporte deste açúcar (Sacktor, 1968).

Glicosidase e amilase são enzimas responsáveis pela degradação de açúcares. A primeira é uma enzima largamente encontrada em organismos vivos, assim como animais, plantas, fungos e bactérias (Esen, 1993), sendo responsável pela hidrólise de dissacarídeos ou oligossacarídeos (Byeon *et al.*, 2005) que são liberados após a ação das enzimas de metabolismo energético e também após a atividade de enzimas que hidrolisam glicídios de cadeia longa. Dependendo do monossacarídeo removido, a glicosidase é chamada glicosidase (glicose), galactosidase (galactose), xilosidase (xilose) e outros (Ferreira *et al.*, 2001).

A enzima amilase é responsável pela hidrólise do amido em maltose, que em seguida é hidrolisada em glicose pela glicosidade (Zeng & Cohen, 2000) ou pode ser utilizada pelas enzimas do metabolismo energético. Muitos organismos, incluindo

insetos que constituem sérias pragas em grãos armazenados, vivem sob uma dieta rica em polissacarídeos e dependem da efetividade de suas amilases para sobrevivência (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se existem diferenças na atividade enzimática de enzimas envolvidas no metabolismo energético dos insetos provenientes de duas populações resistentes e uma população susceptível a inseticidas de *S. zeamais*. As populações resistentes testadas foram as de Jacarezinho e de Juiz de Fora e a população susceptível foi de Sete lagoas. Além disso, foram realizados bioensaios concentração-resposta e também testes respirométricos para as três populações.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Populações de *S. zeamais*

Três populações de *S. zeamais* foram utilizadas neste estudo. A população padrão de susceptibilidade utilizada é proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo - CNPMS), localizado na cidade de Sete Lagoas/MG. Esta população é considerada como padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides e vem sendo mantida em condições de laboratório por aproximadamente vinte anos (Guedes *et al.* 1994, 1995, Ribeiro *et al.* 2003). As outras duas populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas, coletada em moinho de grãos na cidade de Juiz de Fora/MG, Brasil, no início de 1999 e estabelecida a partir de 500 indivíduos, é também resistente ao malation (Fragoso *et al.*, 2003). A segunda população resistente foi coletada originalmente em unidades armazenadoras de sementes de milho em Jacarezinho/PR no final da década de 80 e mostra alta resistência a DDT e piretróides. Todas as populações foram criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (LD 12:12h).

b) Bioensaios concentração-resposta

Bioensaios concentração-resposta seguiram os métodos adaptados dos estudos de resistência a inseticidas em *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), utilizando frasco de vidro de 20mL (Guedes *et al.*, 1996, 1997; Guedes & Zhu, 1998).

Um tratamento controle (apenas acetona) e sete a nove diferentes concentrações de permetrina variando de 0,0570 a 14,2531 g i.a./cm² e 1,14 a 1.140,25 g i.a./cm² foram aplicados na população susceptível (Sete Lagoas) e nas duas populações resistentes ao inseticida (Juiz de Fora e Jacarezinho), respectivamente. Cinco repetições, cada uma com vinte insetos adultos não-sexados, foram usadas para cada concentração. Em cada repetição, a parte interna do frasco de vidro de 20mL foi coberta com 400 L de inseticida dissolvido em acetona e as concentrações inseticidas foram calculadas como g i.a./cm² de superfície tratada. A abertura de cada vidro foi tampada evitando que os insetos escapassem e aqueles que foram incapazes de andar após 48h de exposição ao inseticida foram considerados como mortos. Os dados de concentração-mortalidade foram sujeitos à análise de probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2001).

c) Ensaios Respirométricos

Ensaios de respirometria foram realizados em condições de laboratório utilizando-se um respirômetro do tipo CO₂ Analyser TR 2 (Sable System International, Las Vegas EUA), e metodologia adaptada de Daniel & Smith (1994) e Guedes *et al.*, (2003). Para a determinação da taxa respiratória média (produção de CO₂) foram utilizados grupos de vinte insetos adultos e não sexados devidamente acondicionados em câmaras com capacidade volumétrica de 25mL conectadas a um sistema completamente fechado. As câmaras foram mantidas conectadas ao sistema por um período de 2,2 horas antes da mensuração da quantidade de CO₂ produzido pelos insetos. Para realizar a varredura de todo o CO₂ produzido no interior de cada câmara, fazia-se a passagem de ar isento de CO₂ a um fluxo de 600 mL/min por um período de dois minutos. Essa corrente de ar arrastava todas as moléculas de CO₂ produzidas até um leitor de infravermelho acoplado ao sistema e que prontamente mensurava (em µmol/hora) o CO₂ produzido pelos insetos e contido no interior de cada câmara.

d) Preparação das enzimas

Para os ensaios de glicosidase e trealase, três amostras aleatórias de 300 insetos adultos não-sexados de cada população foram coletadas, imersas em solução de KCl 1,5% e homogeneizadas em 6,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0. O extrato bruto foi filtrado em gaze de algodão e centrifugado em 10.000g_{max} por 15 min. O precipitado foi descartado e alíquotas do sobrenadante (extrato enzimático) foram

retiradas para determinação de proteína e atividade das enzimas. Para o ensaio de glicogênio fosforilase, foram utilizados três amostras de 100 insetos adultos não-sexados para a mesma quantidade de tampão e para os ensaios de amilase e lipase esse número diminuiu para 20 insetos que foram homogeneizados em 5,0 mL de tampão.

e) Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Warburg-Christian (1941) para determinação de atividade específica.

f) Ensaio enzimáticos

Todos os ensaios foram realizados com três repetições. Para o ensaio da glicosidase utilizou-se o método descrito por Hill & Orchard (2005), complementando com o método do açúcar redutor (ácido dinitrosalicílico - DNS) descrito por Miller (1959). O substrato foi preparado a partir de sacarose 1,33% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,4. A reação foi iniciada com a adição de 1mL do extrato enzimático em 1mL de sacarose e incubada a 40°C por 20 min. A atividade foi interrompida com a adição de 1mL de DNS 0,044M, o que reduziu a glicose liberada. A curva padrão da glicose foi feita com concentrações entre 1,0 e 9,0 mM. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 540 nm.

Para o ensaio da trealase utilizamos o método descrito por Dahlqvist (1968), complementado também com o método do açúcar redutor como descrito por Miller (1959). O substrato foi preparado misturando-se trealose 50 mM em tampão acetato de sódio 70 mM, pH 4,9. A mistura de reação consistiu de 0,2 mL de substrato, 1,6 mL de tampão acetato de sódio 70 mM, pH 4,9 e 0,2 mL de extrato enzimático. Esta mistura foi incubada a 37°C por 30 min, sendo interrompida com 1mL de DNS 0,044M, o que reduziu a glicose liberada. A curva padrão da glicose foi feita como descrito para a enzima glicosidase.

A atividade da enzima glicogênio fosforilase foi medida de acordo com o método de Tolman & Steele (1980). Determinou-se o fosfato inorgânico liberado da glicose-1-fosfato na presença de glicogênio que serviu como um desencadeador da reação. O ensaio consistiu de 20 µL de glicogênio 0,5%, 100 µL de glicose-1-fosfato 25 mM, 100 µL de NaF 100 mM, 0,5 mL de tampão Tris-HCl 30mM pH 7,0, 100 µL de 5'-AMP 2,5 mM e 100 µL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a

30° C por 15 min. e interrompida com 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v). O fosfato inorgânico (Pi) foi determinado pelo método de Fiske e Subbarow (1925) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 725 nm.

Para o ensaio de amilase utilizamos Kit da BIOCLIN (QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), contendo substrato e reagente de cor. Esta reação é baseada na cinética de tempo fixo (Caraway). O extrato enzimático foi incubado com o substrato de amido e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 660 nm.

Para o ensaio de lipase também utilizamos Kit da BIOCLIN (QUIBASA – Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), contendo tampão, inibidor enzimático, reagente de cor, substrato e acetona. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 410 nm.

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

g) Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados para trealase. As reações foram realizadas com concentrações de trealose que variavam de 0,31 a 25 mM. As absorbâncias provenientes de cada concentração foram convertidas em valores de velocidade enzimática (nmol/min/mg de proteína) e plotadas no gráfico de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk através do programa SigmaPlot (SPSS, 2000), gerando então, os parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_M .

Para a obtenção do gráfico de Michaelis-Menten para as enzimas amilase e lipase, as reações foram realizadas com alíquotas de substrato que variavam de 25 a 200 μ L e 10 a 80 μ L, respectivamente. As absorbâncias provenientes de cada alíquota foram convertidas em valores de velocidade enzimática (unidade de amilase/dL/mg de proteína, para amilase e UI/mg de proteína, para lipase) e os dados foram plotados utilizando-se o programa SigmaPlot (SPSS, 2000).

h) Análise Estatística

Os dados de concentração-resposta frente à exposição a permetrina foram sujeitos à análise de PROBIT utilizando o procedimento PROC PROBIT do SAS (SAS

Institute, 2001). Os dados da produção de CO₂ e atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidos por teste de média (LSD).

RESULTADOS

a) Bioensaios concentração-resposta

Os resultados dos bioensaios para permetrina, com populações de caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Toxicidade de permetrina em uma população susceptível (Sete Lagoas) e duas populações resistentes a esse composto (Juiz de Fora e Jacarezinho).

Populações	Inclinação ± EPM	CL ₅₀ (95% IC) (g i.a./cm ²)	RR*	X ²	gl	P
Sete Lagoas	1,18 ± 0,07	0,62 (0,50 - 0,75)	-	10,43	7	0,16
Juiz de Fora	0,87 ± 0,27	177,44 (27,38 - 451,88)	286,19	13,99	7	0,05
Jacarezinho	0,79 ± 0,23	75,12 (1,85 - 317,23)	121,16	10,66	5	0,06

*: Razão de Resistência: CL₅₀ da população resistente/CL₅₀ da população susceptível

Os dados de toxicidade indicaram que os insetos provenientes de Sete Lagoas foram significativamente mais susceptíveis a permetrina que as outras populações, baseado em sua CL₅₀. A resposta desta população foi utilizada para estabelecer a razão de resistência, sendo a maior razão apresentada pela população de Juiz de Fora (2,36 vezes maior que a população de Jacarezinho).

b) Respirimetria

Diferenças significativas na taxa respiratória, medidas aqui como produção de CO₂ (µmol/hora/inseto), foram observados entre as populações (Figura 2). A população de Jacarezinho apresentou uma taxa respiratória significativamente mais alta que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora, que foram similares (F = 23,05, gl_{erro} = 5, p = 0,003). Este resultado suporta a idéia de que a população de Jacarezinho apresenta uma taxa metabólica maior que as outras duas populações.

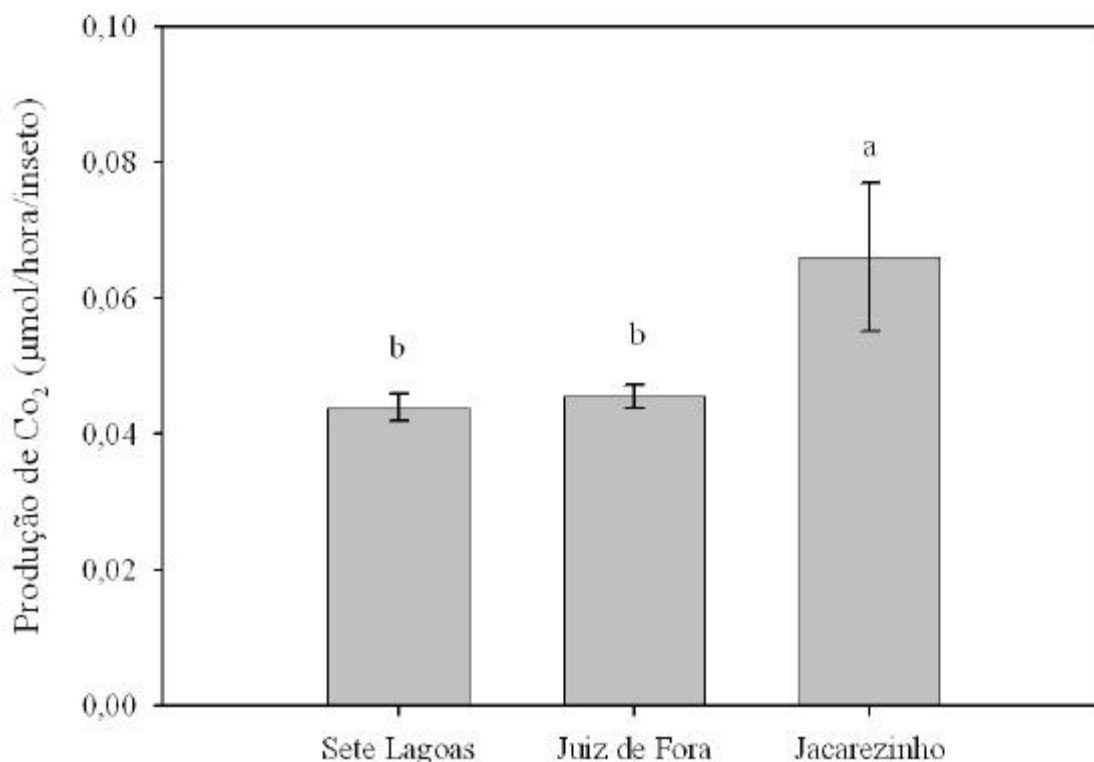


Figura 1. Produção de CO₂ (µmolCO₂/hora/inseto) (\pm SE) de insetos adultos provenientes de três populações de caruncho-do-milho, *S. zeamais*. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste da diferença mínima significativa (LSD, $p < 0,05$).

c) Enzimas de metabolismo energético

Foram determinadas atividades específicas das enzimas de metabolismo energético atuando na mobilização de carboidratos e lipídeos (glicogênio fosforilase, trealase e lipase) em três populações de *S. zeamais*. Não foram levados em consideração fatores como jejum, pré-reprodução, exposição a drogas e regulação hormonal. Além disso, foram determinadas, também, atividades das enzimas amilase e glicosidase, responsáveis pela hidrólise de açúcares. Estas últimas enzimas podem estar diretamente ligadas às enzimas envolvidas no metabolismo energético, atuando como fornecedoras de açúcares para o metabolismo (no caso de amilase) ou hidrolisando os açúcares durante o metabolismo (no caso de glicosidase). Entre as enzimas responsáveis pela mobilização de carboidratos (glicogênio fosforilase e trealase) e hidrólise de açúcares provenientes do metabolismo (glicosidase), apenas trealase apresentou diferença

significativa em sua atividade entre as três populações ($F = 72,39$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p < 0,0001$) (Figuras 2), tendo os insetos da população de Juiz de Fora maior atividade frente às demais. Glicogênio fosforilase ($F = 0,25$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,7894$) e glicosidase ($F = 1,43$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,3101$) não apresentaram diferença significativa em sua atividade e são mostradas na Tabela 2.

A trealase de *S. zeamais* segue a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato usada, pois todas as três populações investigadas apresentaram curvas de velocidade do tipo hiperbólica (Figura 3).

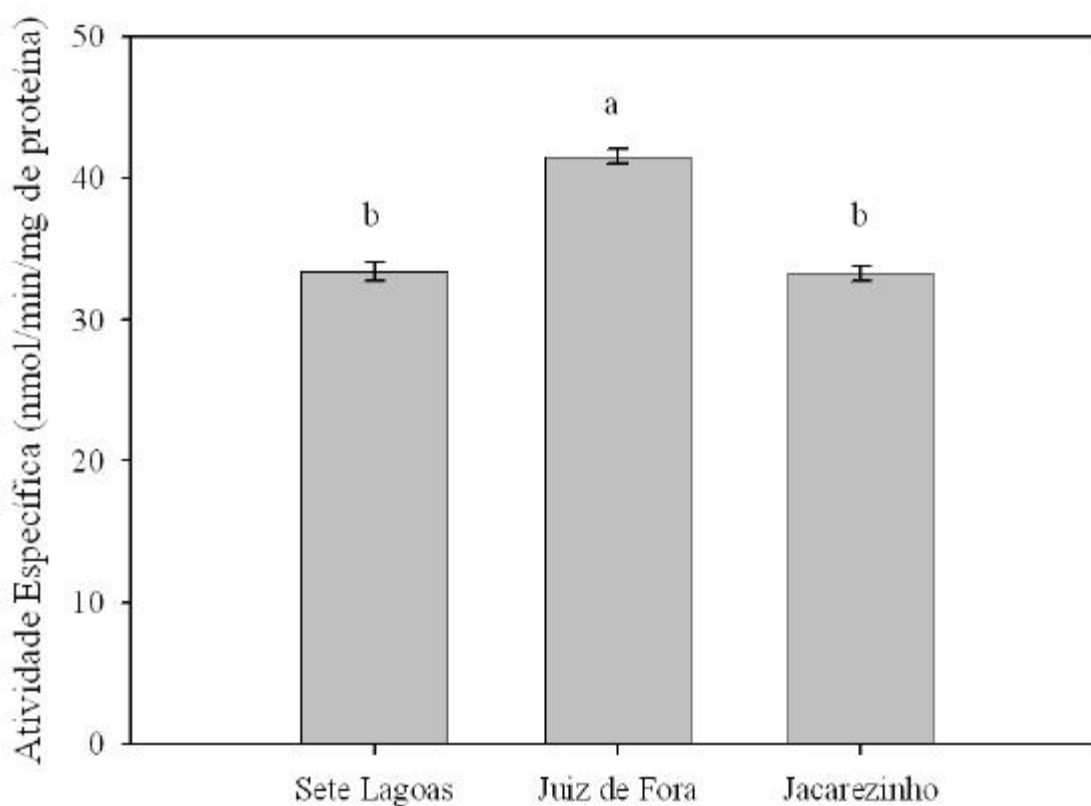


Figura 2: Atividade específica (nmol/min/mg de proteína) de trealase nas três populações de *S. zeamais*. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste da diferença mínima significativa (LSD, $p < 0,05$).

Tabela 2: Atividades de glicogênio fosforilase e glicosidase (Média ± EPM) de populações de *S. zeamais*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si.

Populações	Enzimas	
	Glicogênio fosforilase	Glicosidase
	nmol/min/mg proteína	
Sete Lagoas	1497,47 a	13,95 a
Juiz de Fora	1683,18 a	10,86 a
Jacarezinho	1528,23 a	12,11 a

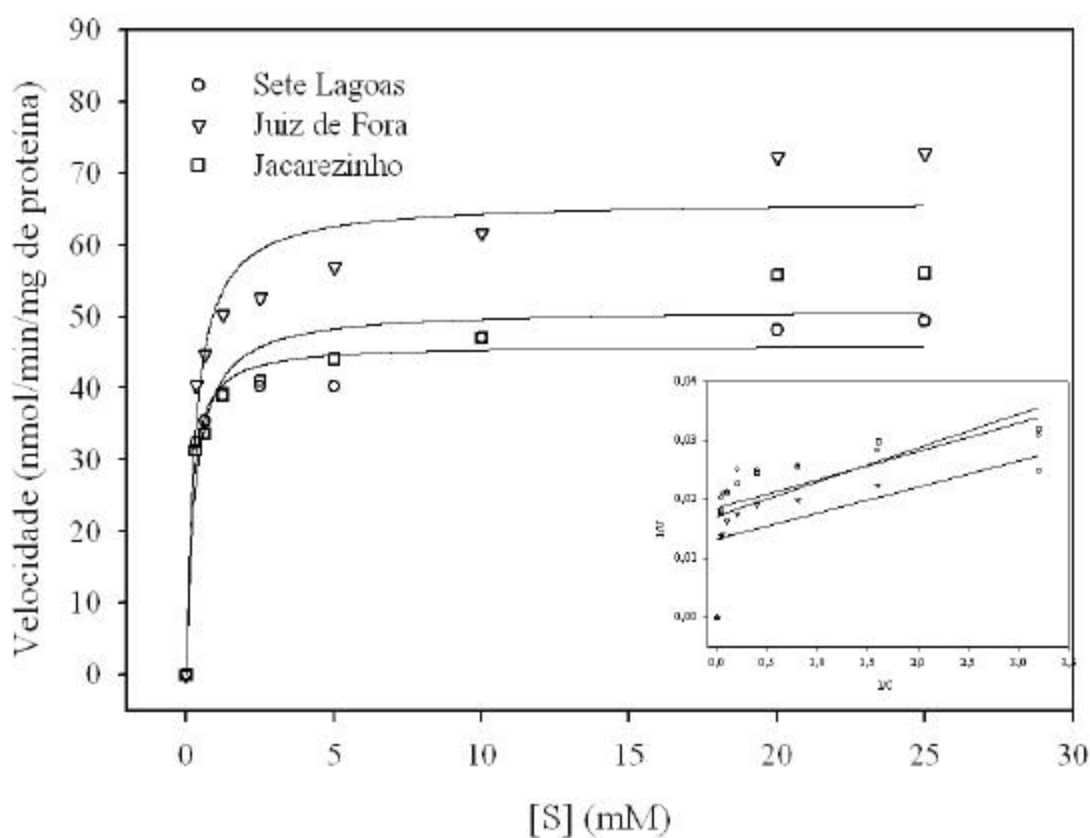


Figura 3: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de trealase de *S. zeamais* das populações de Sete Lagoas, Juiz de Fora e Jacarezinho. A linha hiperbólica foi obtida a partir dos dados experimentais usando a equação de Michaelis-Menten. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

O modelo da equação de Michaelis-Menten foi derivado para considerar as propriedades cinéticas das enzimas. A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) são os parâmetros cinéticos determinados pela

hipérbole. A primeira, isto é K_M , representa a concentração de substrato na qual a velocidade atinge a metade da velocidade máxima e na sua forma mais simples é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato. O parâmetro cinético $V_{m\acute{a}x}$ é atingido quando todos os sítios ativos estão preenchidos com moléculas de substrato. Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima trealase para as três populações estudadas foram, portanto, determinados: $K_M = 0,16 \pm 0,04$ e $V_{m\acute{a}x} = 46,10 \pm 1,44$, para Sete Lagoas; $K_M = 0,28 \pm 0,08$ e $V_{m\acute{a}x} = 66,14 \pm 3,06$, para Juiz de Fora; $K_M = 0,29 \pm 0,08$ e $V_{m\acute{a}x} = 51,08 \pm 2,33$, para Jacarezinho.

Lipase e amilase apresentaram diferença significativa em suas atividades entre as três populações ($F = 22,80$, $gl_{erro} = 6$, $p = 0,0016$, para lipase; $F = 20,19$, $gl_{erro} = 6$, $p = 0,0022$, para amilase) (Figuras 4A e 4B, respectivamente) e seguem a cinética de Michaelis-Menten nas faixas das alíquotas de substrato utilizadas (Figuras 5A e 5B, respectivamente). A população de Juiz de Fora apresentou maior atividade de lipase, enquanto a população de Jacarezinho apresentou maior atividade de amilase.

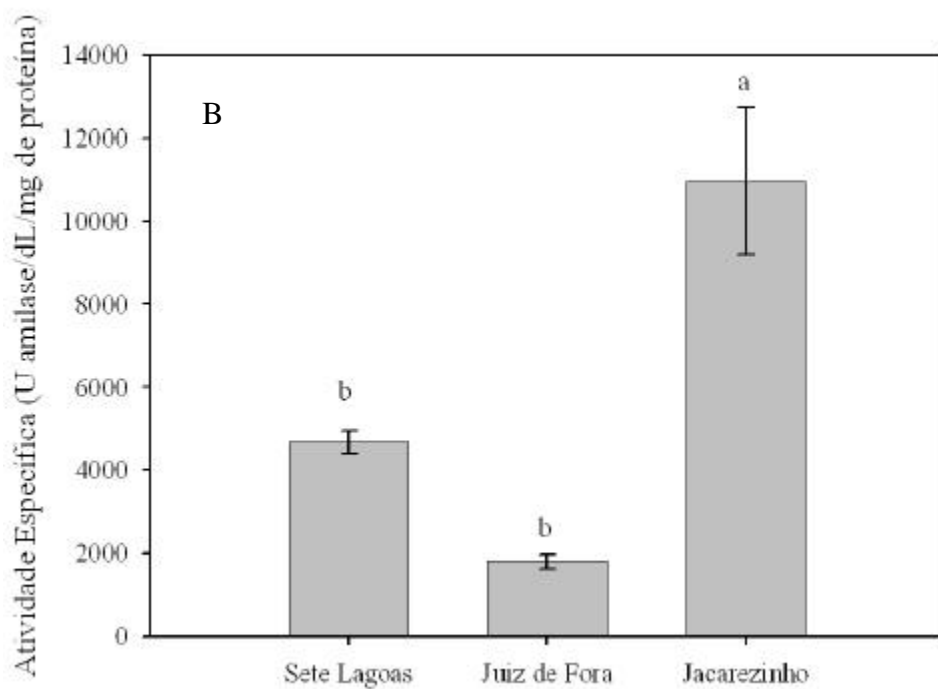
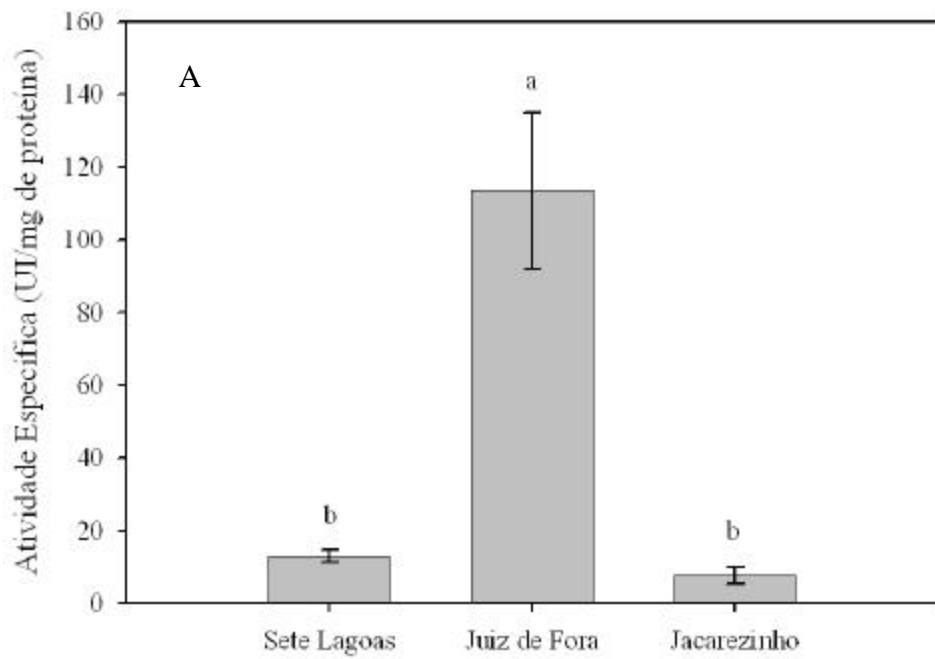


Figura 4: Atividade específica (UI/mg de proteína) de lipase (A) e (U amilase/dL/mg de proteína) de amilase (B) nas três populações de *S. zeamais*. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste da diferença mínima significativa (LSD, $p < 0,05$).

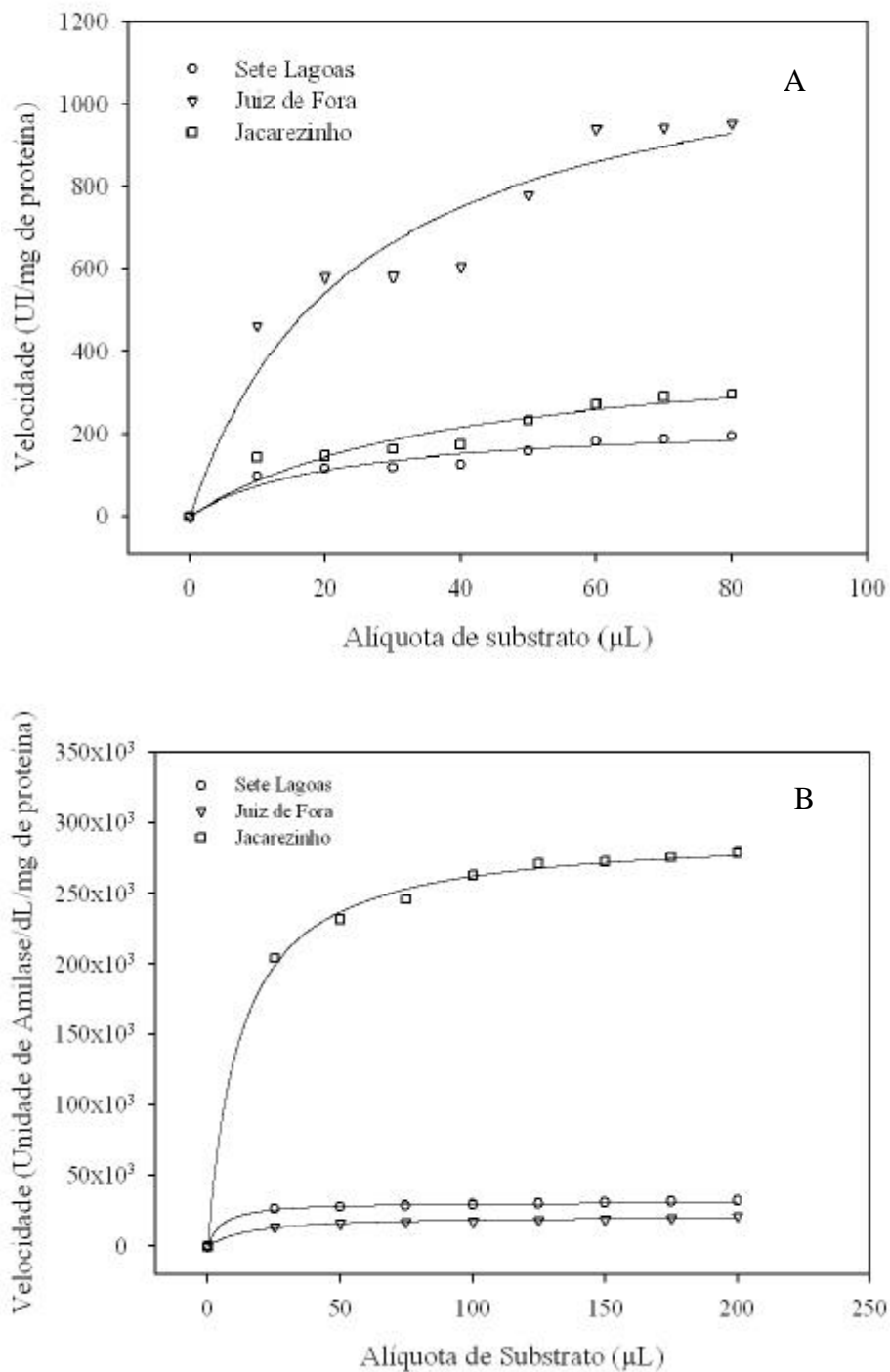


Figura 5: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de lipase (A) e amilase (B) de *S. zeamais* das populações de Sete Lagoas, Juiz de Fora e Jacarezinho. A linha hiperbólica foi obtida a partir dos dados experimentais usando a equação de Michaelis-Menten.

DISCUSSÃO

Nos insetos, o corpo gorduroso é o principal local de síntese e armazenamento de carboidratos, lipídeos e proteínas, que são prontamente utilizados como fonte de energia para as mais variadas atividades (Chown & Nicolson, 2004). Os carboidratos são armazenados principalmente na forma de trealose e glicogênio, e os lipídeos na forma de diacilgliceróis ou triacilgliceróis (Lehninger *et al.*, 2000).

Diferenças na morfologia do corpo gorduroso e na taxa respiratória média foram relatadas em um trabalho realizado por Guedes *et al.*, (2006), em populações de *S. zeamais* com susceptibilidade distinta a inseticidas piretróides. Estes padrões citomorfológicos em células de corpo gorduroso das populações resistentes sugerem uma maior disponibilidade de proteínas totais e carboidratos neutros em insetos destas populações. O maior acúmulo provavelmente contribui para que os insetos resistentes tenham uma maior capacidade de mobilização de reservas na tentativa de suprir a demanda energética necessária para ativar seus mecanismos de resistência a inseticidas e de resistir à ação tóxica destes compostos, o que pode estar associado à mitigação de custos adaptativos do fenômeno de resistência na ausência de inseticidas. A manutenção dos mecanismos que conferem resistência a moléculas inseticidas pode demandar uma quantidade de energia adicional e suficiente para tornar os fenótipos resistentes desfavorecidos adaptativamente em relação aos susceptíveis (Chevillon *et al.*, 1999; Coustau *et al.*, 2000; Boivin *et al.*, 2001, 2003).

Os resultados dos ensaios respirométricos obtidos neste estudo, demonstram que a população de Jacarezinho possui taxa metabólica maior que as demais populações, reafirmando os resultados obtidos por Guedes *et al.*, (2006), que também encontrou alta taxa respiratória nesta população resistente. Acredita-se que este incremento no metabolismo pode estar associado à mitigação do custo fisiológico, possibilitando os insetos desta população produzirem seus aparatos de defesa sem comprometer os outros processos fisiológicos.

O custo da resistência a inseticidas em insetos é frequentemente associado com o custo de manutenção do mecanismo de defesa do organismo (Coustau *et al.*, 2000). No caso da população de Jacarezinho, acredita-se que este custo esteja sendo mitigado, pois de acordo com os trabalhos de Fragoso *et al.*, (2005) e Guedes *et al.*, (2006) a energia

alocada está sendo suficiente tanto para seu desenvolvimento e reprodução como para resistência a inseticidas.

Para testar esta hipótese realizamos ensaios com enzimas do metabolismo energético, ou seja, enzimas responsáveis pela mobilização de carboidratos e lipídeos presentes no corpo gorduroso dos insetos, como também enzimas responsáveis pela degradação de açúcares. De acordo com os resultados obtidos, as enzimas trealase, lipase e amilase apresentaram diferença significativa em suas atividades entre as três populações. As duas primeiras enzimas apresentaram atividade mais alta na população resistente de Juiz de Fora, em contraste com o resultado de amilase, que apresentou atividade mais alta na população de Jacarezinho.

A trealose é um dissacarídeo de mobilização imediata utilizado como fonte de energia para a realização de todos os processos fisiológicos dos insetos (Lehninger *et al.*, 2000). A baixa atividade de trealase na população de Jacarezinho sugere a possibilidade de mitigação do custo fisiológico associado à resistência, pois mesmo os insetos apresentando maiores células de corpo gorduroso (Guedes *et al.*, 2006) e conseqüentemente maior acúmulo de reservas, parecem utilizar sua energia armazenada apenas quando precisam ativar seu mecanismo de defesa, ou seja, durante exposição a inseticidas. Na ausência do agente tóxico, maneira com o qual os insetos têm sido mantidos, a população de Jacarezinho utiliza suas reservas para os processos fisiológicos básicos, apresentando então, taxa metabólica menor que a outra população resistente (Juiz de Fora), que aloca energia para seu desenvolvimento e para sua defesa desnecessariamente. O resultado da enzima lipase também confirma esse menor gasto energético da população de Jacarezinho e a alta atividade desta enzima para a população de Juiz de Fora, explicando ainda a origem do carboidrato que é mobilizado pela enzima trealase nesta mesma população.

Os lipídios estão armazenados na forma de triacilgliceróis (Willmer *et al.*, 2005). Muitos animais contêm células que são especializadas para a síntese, armazenamento e mobilização desses triacilgliceróis, por exemplo, corpo gorduroso em insetos e tecido adiposo em vertebrados (Willmer *et al.*, 2005). Triacilglicerol é hidrolisado a ácido graxo e glicerol pelas lipases (Willmer *et al.*, 2005). O glicerol assim produzido pode ser convertido a gliceraldeído 3-fosfato e então metabolizado para glicose ou glicogênio pela gliconeogênese (Willmer *et al.*, 2005). Gliconeogênese é uma via universal em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos, e as reações que dela fazem parte

são as mesmas em todos os casos. (Lehninger *et al.*, 2000). Os precursores importantes da glicose nos animais são o lactato, o piruvato, o glicerol e a maioria dos aminoácidos (Lehninger *et al.*, 2000). A diminuição dos carboidratos nas células e a redução da glicemia constituem estímulos básicos que desencadeiam o aumento da gliconeogênese (Guyton & Hall, 1996). A diminuição dos carboidratos pode provocar diretamente a reversão de muitas reações da glicólise e da via do fosfogliconato, permitindo assim, a conversão do glicerol em carboidratos (Guyton & Hall, 1996).

Depois que os lipídios são convertidos em carboidratos na forma de glicogênio, este é hidrolisado pela enzima glicogênio fosforilase, que não apresentou diferença significativa em sua atividade entre as três populações. O glicogênio então é hidrolisado, liberando trealose, que posteriormente é metabolizada pela trealase.

Em insetos, como em outros organismos, o glicogênio (polissacarídeo de ligações glicosídicas (1-4) e ramificações (1-6) a cada 7 ou 20 resíduos ao longo da cadeia principal) é utilizado como reserva de glicose para utilização em diferentes pontos do ciclo de vida (Tolmasky *et al.*, 2001). A degradação deste açúcar pela glicogênio fosforilase é o passo limitante para a biossíntese de trealose (Park & Keeley, 1996).

Finalmente, verificamos que a enzima trealase presente nas três populações de *S. zeamais* segue a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração do substrato utilizado. A atividade catalítica de trealase não aumenta ou diminui em resposta a determinados sinais, ou seja, não é regulada por enzimas alostéricas (Lehninger *et al.*, 2000). Os parâmetros cinéticos da enzima (K_M e $V_{m\acute{a}x}$) foram estimados pela derivação da equação de Michaelis-Menten e de acordo com os resultados obtidos, o substrato utilizado nos ensaios apresentou maior afinidade pela trealase da população de Sete Lagoas devido ao menor valor de K_M .

A enzima amilase é responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas -1,4 dentro do amido e polissacarídeos relacionados (Lehninger *et al.*, 2000). Além disso, esta enzima tem um papel central no metabolismo de carboidratos fazendo com que organismos que possuem uma dieta rica em amido dependam da efetividade de suas amilases para sobreviver (Titarenko & Chrispeels, 2000). Este é o caso de insetos que são sérias pragas agrícolas e consomem órgãos de plantas ricos em amido, assim como sementes e raízes (Titarenko & Chrispeels, 2000). As populações resistentes estudadas apresentam diferenças na mobilização de amido. A alta atividade de amilase na

população de Jacarezinho sugere maior importância desta enzima no metabolismo digestivo como fornecedora de grande quantidade de carboidrato para acúmulo no corpo gorduroso desta mesma população. O amido digerido parece ser utilizado apenas para estocagem e não para fornecimento de açúcares para o metabolismo energético. Entretanto, a baixa atividade de amilase na população de Juiz de Fora sugere que o açúcar utilizado para a formação de trealose parece não ser proveniente do amido e que baixa quantidade deste polissacarídeo parece ser digerido e posteriormente acumulado nas células de corpo gorduroso.

Com a realização deste trabalho podemos sugerir que o metabolismo energético dos insetos da população de Jacarezinho ocorre eficientemente possibilitando a mitigação do custo fisiológico associado ao fenômeno de resistência nesta população. Acredita-se que os insetos provenientes desta população alocam suas reservas energéticas de maneira balanceada, ou seja, apenas quando o organismo realmente necessita. O mecanismo de defesa parece ser ativado apenas quando requerido. No entanto, a população de Juiz de Fora reage de maneira diferente, pois parece ocorrer gasto adicional de energia, gerando um alto e desnecessário metabolismo energético.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Arnaud, L., Haubruge, E., 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56, 2435-2444.
- Applebaum, S.W., 1985. Biochemistry of digestion. In: Kerkut GA, Gilbert L.I., (Eds.), *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology*, Vol. 4. Pergamon Press, New York, pp. 279–311.
- Baker, J.E., Perez-Mendonça, J., Beeman, R.W., Throne, J.E. 1998. Fitness of a malathion-resistant strain of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal Economic Entomology* 91, 50-55.
- Beenackers, A.M.Th., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J.A., 1985. Biochemical processes directed to flight muscle metabolism. In: Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology, and Pharmacology*, Vol. 10, Pergamon Press, New York, pp. 451–86.
- Biesiot, P.M., Capuzzo, J.M., 1990. Digestive protease, lipase and amylase activities in stages larvae of the American lobster *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95, 47–54.
- Boivin, T., d'Hières, C.C., Bouvier, J.C., Beslay, D., Sauphanor, B., 2001. Pleiotropism of insecticide resistance in the codling moth *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99, 381-386.
- Boivin, T., Bouvier, J.C., Beslay, D., Sauphanor, B., 2003. Phenological segregation of insecticide resistance alleles in the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): a case study of ecological divergences associated with adaptive changes in populations. *Genetical Research* 81, 169-177.
- Brahimi-Horn, M.C., Guglielmino, M.L., Sparrow, L.G., Logan, R.I., Moran, P.J., 1989. Lipolytic enzymes of the digestive organs of the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) comparison of the stomach and pyloric caeca. *Comparative Biochemistry Physiology* 92, 637–643.
- Brattsten, L.B., Holyoke, C.W. Jr., Lee Per, J.R., Raffa, K.F., 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science* 231, 1255-1260.
- Byeon, G.M., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Kim, I., Kang, P.D., Lee, S.M., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2005. A digestive α -glucosidase from the silkworm, *Bombix mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 141, 418-427.
- Candy, D.J., Becker, A., Wegener, G., 1997. Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117, 497–512.

- Champ, B.R., Dyte, C.E., 1976. Global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. Rome, FAO/UN, p. 356.
- Chevillon, C., Raymond, M., Guillemaud, T., Lenormand, T., Pasteur, N., 1999. Population genetics of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 147-157.
- Chown, S.L. & Nicolson, S.W. 2004. *Insect Physiological Ecology: mechanisms and patterns*. Oxford University Press, 243p.
- Clarke, A. 1993. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Functional Ecology* 7, 139-149.
- Coustau, C., Chevillon, C., French-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 378-383.
- Dahlqvist, A. 1968. Assay of intestinal disaccharides. *Analytical Biochemistry* 22, 99-107.
- Danho, M., Gaspar, C., Haubruge, E. 2002. The impact of grain quality on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research* 38, 259-266.
- Daniel, S.H., Smith, R.H. 1994. Functional anatomy of the egg pore in *Callosobruchus maculatus*: a trade-off between gas-exchange and protective functions? *Physiology Entomology*, 19: 30-38.
- Esen, A., 1993. α -glucosidases: overview. In: Esen, A. (Ed.), α -glucosidases. *Biochemistry and Molecular Biology*, ACS Symposium Series, Vol. 533. American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-14.
- Fahmy, A.S., Abdel-Gany, S.S., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A., 2004. Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 137, 159-168.
- Ferreira, A.H.P., Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C. 2001. Purification, molecular cloning, and properties of a β -glucosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1065-1076.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375.
- Foster, S.P., Denholm, I., Devonshire, A.L. 2000. The ups and downs of insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) in the U.K. *Crop Protection* 19, 873-879.

- 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). *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.
- Friedman, S., 1978. Trealose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. *Annual Review Entomology* 23, 389-407.
- Goldsworthy, G., Mordue, W., 1989. Adipokinetic hormones: functions and structure. *Biological Bulletin* 177, 218-224.
- 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., Lima, J.O.L., 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.L., 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., Dover, B.A., Kambhampati, S., 1996. Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and malathion in Brazilian and US populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 89, 27-32.
- Guedes, R.N.C., Kambhampati, S., Dover, B.A., Zhu, K.Y., 1997. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) from the United States and Brazil. *Bulletin of Entomological Research* 87, 581-586.
- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., 1998. Characterization of malathion resistance in a Mexican population of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Science* 53, 15-20.
- Guedes, R.N.C., Smith, R.H., Guedes, N.M.P. 2003. Host suitability, respiration rate and the outcome of larval competition in strains of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology* 28, 1-9.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B.M., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1116p.

- 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.
- Hill, S.R., Orchard, I., 2005. In vitro analysis of the digestive enzymes amylase and α -glucosidase in the midguts of *Locusta migratoria* L. in response to the myosuppressin, SchistoFLRFamide. *Journal of Insect Physiology* 51, 1-9.
- Kence, M., Jdeidi, T., 1997. Effect of malathion on larval competition in house fly (Diptera: Muscidae) populations. *Journal of Economic Entomology* 90, 59-65.
- Knuesel, I., Murao, S., Shin, T., Amachi, T., Kayser, H., 1998. Comparative studies of suidatrestin, a specific inhibitor of trehalases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 639-646.
- Lehninger, A.I., Nelson, D.I., Cox, M.M., 2000. *Principles of Biochemistry*, 3rd edition, Worth Publishers Inc., New York, 1200p.
- Marais, E., Chow, S.L., 2003. Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria* sp.. *Journal of Experimental Biology* 206, 4565-4574.
- Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jiménez, A., Valdés-Rodríguez, S., Délano-Frier, J., Blanco-Labra, A., 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126, 425-433.
- Miller, G.L., 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Ogoyi, B.O., Osir, E.O., Olembo, N.K., 1998. Fat body triacylglycerol lipase in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria* (Forshal) (Orthoptera: Acrididae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 119, 163-167.
- 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.
- Oppert, B., Hammel, R., Throne, J.E., Kramer, K.J., 2000. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96, 281-287.
- Park, J.H., Keeley, L.L., 1996. Calcium-dependent action of hypertrehalosemic hormone on activation of glycogen phosphorylase in cockroach fat body. *Molecular and Cellular Endocrinology* 116, 199-205.

- 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.
- Ryan, R.O., Van der Horst, D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in enzyme production. *Annual Review Entomology* 45, 233–260.
- Sacktor, B.S., 1968. Trealase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. *Proceedings of the National Academy Science* 60, 1007–1014.
- SAS Institute, 2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th edition, SAS Institute, Cary, NC.
- SPSS Inc., 2000. SigmaPlot 2000 User's Guide, Revised Edition. SPSS Inc., Chicago.
- Steiner, J.M., Wilson, B.G., Williams, D.A., 2003. Purification and partial characterization of feline classical pancreatic lipase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134, 151–159.
- Subramanyam, B.H., Hagstrum, D.W., 1996. Resistance measurement and management. In: Subramanyam, B.H.; Hagstrum, D.W. (Eds.), *Integrated management of insects in stored products*, Marcel Dekker, New York, pp. 331-397.
- Throne, J.E., 1994. Life history of immature maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. *Environmental Entomology* 23, 1459-1471.
- Titarenko, E., Chrispeels, M.J., 2000. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 979-990.
- Tolman, J.H., Steele, J.E., 1980. The control of glycogen metabolism in the cockroach hindgut: the effect of the corpora cardiaca-corpora allata system. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 66, 59.
- Tolmasky, D.S., Rabossi, A., Quesada-Allué, L.A., 2001. Synthesis and mobilization of glycogen during metamorphosis of the medfly *Ceratitis capitata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392, 38-47.
- Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J.A., Diederer, J.H.B., 2001. Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *International Review of Cytology* 211, 179–240.
- Warburg, O., Christian, W., 1941. Isohierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochemische Zeitschrift* 310, 384-421.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2005. *Environmental Physiology of Animals*. 2nd editon. Blackwell Publishing, 754p.

Zeng, F., Cohen, A.C., 2000. Partial characterization of α -amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolari*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126, 9–16.

Enzimas Digestivas em Populações de Caruncho-do-Milho
Resistentes e Susceptível a Piretróides

Resumo

Populações de *S. zeamais* de susceptibilidade distinta mostram que os indivíduos provenientes da população resistente de Jacarezinho apresentam maiores áreas de trofócitos, de maneira a favorecer maior acúmulo de substâncias de reserva (proteínas totais e carboidratos neutros totais) no interior destes. Esta maior reserva pode ser resultado de um maior acúmulo de carboidratos e proteínas, sendo este acúmulo resultado de uma maior eficiência digestiva. Para testar esta hipótese realizamos ensaios enzimáticos com as enzimas digestivas e também enzimas responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento. Verificamos se existem diferenças nas atividades de proteases, celulases, poligalacturonase e pectina liase nas populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora, e na população susceptível de Sete Lagoas. De acordo com os resultados obtidos entre as enzimas digestivas, apenas atividade de protease total não diferiu significativamente entre as três populações. As populações de Juiz de Fora e Jacarezinho mostraram as mais altas atividades de serino protease (amidásica), cisteíno protease e celulase. Em contrapartida, a maior atividade de serino protease (esterásica) foi exibida pela população de Juiz de Fora. Entre as enzimas de acesso do inseto ao alimento, pectina liase não apresentou diferença significativa em sua atividade entre as três populações, sendo que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora apresentaram atividades mais altas para poligalacturonase. A análise de variáveis canônicas foi realizada mostrando diferença significativa entre as populações. As enzimas serino-protease (amidásica e esterásica), cisteíno-protease e celulase foram as enzimas que mais contribuíram para a divergência entre as populações. Os parâmetros cinéticos foram também calculados para as quatro enzimas responsáveis pela divergência entre as populações. Podemos sugerir então, que a alta atividade de proteases e celulase na população de Jacarezinho possibilita a mitigação do custo fisiológico associado à resistência nos insetos desta população.

Palavras-Chave: resistência a inseticidas, caruncho-do-milho, custo fisiológico, proteases, celulase.

Abstract

S. zeamais populations of distinct susceptibility show that the insects from the resistant population from Jacarezinho has greater trophocytes area, favoring higher accumulation of reserves (total proteins and total neutral carbohydrates). This greater reserve can result from the greater accumulation of carbohydrates and proteins, and this accumulation may result from a higher digestive efficiency. To test this hypothesis, enzymatic assays with the digestive enzymes were carried out, as well as assays with enzymes involved in providing food access to the insects. There were significant differences in the activities of proteinases, cellulase, polygalacturonase and pectin lyase in the resistant populations from Jacarezinho and Juiz de Fora, and in the susceptible population from Sete Lagoas. Only the total proteinase activity did not differ significantly among the three populations. The populations from Juiz de Fora and Jacarezinho showed higher activities of serine-proteinase (amidolytic), cysteine-proteinase and cellulase. However, the highest activity of serine-proteinase (esterolytic) was exhibited by the population from Juiz de Fora. Among the enzymes of access to food, pectin lyase did not show significant difference in activity among the three populations. The populations from Sete Lagoas and Juiz de Fora showed higher activities of polygalacturonase. The canonical variate analysis indicated significant difference among the populations. Serine-proteinase (amydolytic and esterolytic), cysteine-proteinase and cellulase were the enzymes that most contributed to the divergence among the populations. The kinetic parameters were calculated for the four enzymes mainly responsible for divergence between the populations.

Key words: insecticide resistance, maize weevil, physiological cost, proteinases, cellulases.

INTRODUÇÃO

As modificações causadas pelo fenômeno de resistência a inseticidas, geralmente induzem efeitos deletérios no inseto (Coustau *et al.*, 2000), usualmente chamado de custo fisiológico. Como resultado, o aumento da taxa metabólica se torna necessário para os indivíduos resistentes manterem o mecanismo de defesa. Se não ocorrer um incremento no metabolismo, a realocação de energia pode prejudicar outros processos fisiológicos envolvidos com o desenvolvimento do inseto, como manutenção e reprodução (Hostetler *et al.*, 1994; Harak *et al.*, 1999; Chown & Gaston, 1999). Entretanto, existem alguns estudos que mostram ausência deste custo em indivíduos resistentes a inseticidas (Beeman & Nanis, 1986; Haubruge & Arnaud, 2001; Raymond *et al.*, 2001).

Fragoso *et al.* (2005), realizando estudos de crescimento populacional com populações resistentes e susceptível de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), observou que o desempenho reprodutivo da população resistente de Jacarezinho é semelhante ao apresentado pela população padrão de susceptibilidade, demonstrando que a resistência a inseticidas nesta população resistente pode não incorrer em custo fisiológico adicional capaz de modificar sua performance reprodutiva.

Foi observado também por Guedes *et al.*, (2006), que as populações resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora) apresentam maiores áreas de trofócitos, de maneira a favorecer maior acúmulo de substâncias de reservas (proteínas totais e carboidratos neutros totais) no interior destes.

Os resultados acima sugerem que o armazenamento das reservas provenientes da digestão de proteínas e carboidratos, e sua mobilização no corpo gorduroso de insetos da população resistente, particularmente Jacarezinho, ocorram de maneira eficiente, tornando esta população uma excelente competidora devido a maior obtenção de energia e capacidade de manutenção da resistência. A maior eficiência na mobilização de reservas pode ser resultado de um maior acúmulo de carboidratos e proteínas, sendo que este acúmulo deverá resultar em uma maior eficiência digestiva. Para testar esta hipótese realizamos ensaios enzimáticos com enzimas responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento e também enzimas do sistema digestivo e verificamos se existem diferenças em suas atividades, nas três diferentes populações. Suspeita-se que a atividade destas enzimas possa estar relacionada com a mitigação de custo adaptativo na

população resistente de Jacarezinho. Foram realizados ensaios com as enzimas poligalacturonase, pectina liase, celulase e proteases.

Poligalacturonase e pectina liase são duas enzimas pertencentes ao grupo das pectinases e são responsáveis pela degradação da pectina, componente principal da lamela média da parede celular de plantas (Shen *et al.*, 1996). Estas enzimas estão presentes na glândula salivar dos insetos, sendo utilizadas para quebrar o material vegetal que foi ingerido (Shen *et al.*, 1996). Estas enzimas são responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento.

No aparelho digestivo dos insetos encontram-se enzimas como celulase e proteases que atuam em macromoléculas. A hidrólise da celulose é realizada enzimaticamente através da ação sinérgica de três tipos de enzimas pertencentes ao grupo das celulases: endoglucanases, exoglucanases e celobiasas (Henrissat *et al.*, 1985; Beguin & Aubert, 1994). A celulose é a maior fonte de alimento para muitas espécies de insetos, especialmente para xilófagos e/ou fitófagos, e a presença da enzima celulolítica pode ser vantajosa para aumentar a disponibilidade de energia e nutrientes (Wei *et al.*, 2005). Muitos trabalhos mostram que estas enzimas são produzidas pelos insetos (Watanabe *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004), pelos organismos simbioses que vivem no intestino destes (Ohtoko *et al.*, 2000) ou ambos (Watanabe *et al.*, 1998; Ohtoko *et al.*, 2000; Breznake & Brune, 1994).

As proteases são enzimas proteolíticas, ou seja, hidrolisam ligações peptídicas das proteínas e são encontradas em todas as células e tecidos, além de ajudarem na digestão de alimentos protéicos (Lehninger *et al.*, 2000). São divididas em quatro subclasses, de acordo com o seu mecanismo catalítico: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil proteases e metalo proteases (Xavier, 2002). As serino-proteases são as enzimas mais estudadas, sendo encontradas em vírus, bactérias e em eucariotos (Xavier, 2002). No grupo dos insetos, serino-proteases estão presentes na maioria das espécies, principalmente em lepidópteros (Reeck *et al.*, 1999). Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina que participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos, incluindo, além da digestão, a ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, na resposta imune de insetos e plantas (Wilson *et al.*, 1997; Gorman *et al.*, 2000a e 2000b), desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (Gill *et al.*, 1996). Cisteíno-protease é outra subclasse também bastante estudada e encontrada em sua grande maioria nos coleópteros (Zhu-

Salzman *et al.*, 2003) e os estudos a respeito destas enzimas se baseiam principalmente no controle de pragas de grãos ou sementes através do uso de inibidores de cisteíno-proteases.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se existem diferenças na atividade enzimática das possíveis enzimas responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento e também das enzimas responsáveis pelo sistema digestivo. Os insetos são provenientes de duas populações resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora) e uma população susceptível (Sete Lagoas) de *S. zeamais*.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Populações de *S. zeamais*

Três populações de *S. zeamais* foram utilizadas neste estudo. A população padrão de susceptibilidade utilizada é proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo - CNPMS), localizado na cidade de Sete Lagoas/MG. As outras duas populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas foi coletada em moinho de grãos na cidade de Juiz de Fora/MG, Brasil, no início de 1999 e a segunda foi coletada originalmente em unidades armazenadoras de sementes de milho em Jacarezinho/PR no final da década de 80. Todas as populações foram criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (LD 12:12h).

b) Preparação das enzimas

Para a determinação da atividade de proteases, três amostras aleatórias de 40 insetos adultos (para atividades proteásica, amidásica e esterásica) ou 100 insetos adultos (para cisteíno-proteases) não-sexados de cada população foram coletadas, imersas em solução de KCl 1,5% e homogeneizadas em 5,0 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M, pH8,0. O extrato foi filtrado em gaze de algodão e centrifugado em 10.000 *g*_{max} por 15 min. O precipitado foi descartado e alíquotas do sobrenadante foram retiradas para determinação de proteína e atividade das enzimas. Para os ensaios de celulasas, poligalacturonase e pectina liase foram coletadas três amostras de 500 insetos adultos não-sexados os quais foram homogeneizados em 6,0 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M, pH8,0 e 7,0 mL do mesmo tampão para as duas últimas enzimas.

c) **Determinação da concentração de proteína**

A concentração de proteína nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Warburg - Christian (1941).

d) **Determinação da Atividade Enzimática**

Para as enzimas proteolíticas foram determinadas as atividades de protease total, serino-proteases e cisteíno-proteases. Para a atividade de protease total utilizou-se como substrato azocaseína 2% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, 37° C segundo o método descrito por Tomarelli *et al.*, (1949). A mistura de reação consistiu de 250 µL de substrato e 300 µL de extrato enzimático, que foi incubada a 37° C por 30 min. Logo após, a reação foi paralisada com 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (v/v) (TCA) e deixada em repouso por 15 min no gelo. Antes da leitura em 440 nm adiciona-se 1,4 mL de NaOH 1,0M.

A atividade de serino-proteases foi determinada com dois diferentes substratos: L-BApNA (N- -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride), determinando atividade amidásica e L-TAME (N- -p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride), determinando atividade esterásica. A atividade amidásica foi determinada de acordo com o método descrito por Erlanger *et al.* (1961), com o L-BApNA 60mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com CaCl₂ 20mM. A mistura de reação consistiu de 5mL de substrato e 0,6 mL de extrato enzimático, incubada a 25° C por 2,5 min. Logo após, a leitura foi realizada em um comprimento de onda de 410 nm. O coeficiente de extinção molar de 8800M⁻¹cm⁻¹ para o produto formado foi utilizado para os cálculos de atividade. A atividade esterásica foi medida de acordo com o método descrito por Hummel (1959), com o L-TAME 0,1mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM. A mistura de reação consistiu de 0,5 ml de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, 0,5 mL de substrato e 250 µL de extrato enzimático, incubada a 25° C por 2,5 min. Logo após, a leitura foi realizada em um comprimento de onde 247 nm e para os cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹cm⁻¹.

O ensaio de cisteíno-protease foi realizado utilizando-se o mesmo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), mas com a adição de um inibidor de serino-protease (0,1 mL de benzamidina 10 mM na mistura de reação). O princípio de ação e o coeficiente de

extinção molar utilizado nos cálculos foram os mesmos do ensaio de atividade sobre o L-BApNA para serino-proteases.

O ensaio para celulase foi realizado de acordo com o método descrito por Lee *et al.* (2004) e pelo método do açúcar redutor (ácido dinitrosalicílico – DNS) descrito por Miller (1959). O substrato foi preparado dissolvendo-se carboximetilcelulose 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0. A mistura de reação consistiu de 1,0 mL de substrato e 1,0 ml de extrato enzimático, com incubação a 37° por 30 min.. A reação foi paralisada com ácido dinitrosalicílico (DNS), que reduziu a glicose liberada. A curva padrão da glicose foi feita com concentrações de 1,0 a 9,0 mM e a leitura realizada em comprimento de onda de 540 nm.

A atividade da poligalacturonase foi realizada de acordo com o método descrito por Doostdar *et al.* (1997) e pelo método do açúcar redutor (DNS) descrito por Miller (1959). O substrato foi preparado dissolvendo-se ácido poligalacturônico 1,3% (p/v) em tampão acetato de sódio 100 mM e cloreto de sódio 2,5M, com pH final de 4,8. A mistura de reação consistiu de 1,0 mL de substrato e 1,0 mL do extrato enzimático, com incubação a 40° C por 20 min. A curva padrão do ácido galacturônico foi realizada com concentrações que variavam de 0,3 a 2,7 mM e a leitura foi feita em comprimento de onda de 540 nm.

O ensaio de pectina liase foi realizado de acordo com o método de Albershein (1966). O substrato foi preparado através de pectina 2,5% (p/v) em tampão fosfato 0,05M, com pH final de 6,8. A mistura de reação consistiu de 1,0 mL de substrato e 1,5 mL do extrato enzimático com incubação a 40° C por 30 min. Em seguida, o ensaio foi paralisado com a adição de 4,5 mL de HCl 0,01M e a leitura realizada em um comprimento de onda de 235 nm. Para os cálculos utilizamos coeficiente de extinção molar de 5500 M⁻¹cm⁻¹ e 1 unidade de atividade de pectina liase (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1nmol de produto/mL/min.

Todos os reagentes citados acima foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

e) Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados para os ensaios de serino-proteases, cisteíno-proteases e celulases. As reações foram realizadas com concentrações de substrato que variavam de 0,109 a 1,09 mM para L-BApNA e 0,008 a 0,08 mM para L-

TAME, nos ensaios de serino-proteases; 0,1 a 1,0 mM para L-BApNA no ensaio de cisteíno-proteases e 0,015 a 0,12 g/L para celulasas. O gráfico de Michelis-Menten e Lineweaver-Burk foram feitos através do programa SigmaPlot (SPSS, 2000), gerando então, os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_M .

f) Análise Estatística

Os resultados das atividades de cada enzima para as três populações foram submetidos à análise de variáveis canônicas (CVA) usando o procedimento PROC CANDISC do SAS (SAS Institute, 2001). A significância da separação entre enzimas, indicada pela ordenação através da CVA, foi determinada pela comparação dos pares canônicos entre pares de enzimas usando o teste F aproximado ($p < 0,05$). Além disso, os dados de atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidos por teste de média (LSD).

RESULTADOS

a) Enzimas digestivas

Foram determinadas atividades específicas de enzimas do sistema digestivo (proteases e celulasas) nas três populações de *S. zeamais*, e também atividades das enzimas responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento, como a poligalacturonase e pectina liase (Tabela 1).

Tabela 1: Atividades de enzimas digestivas e de acesso ao alimento (Média ± EPM) de populações de *S. zeamais*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si.

Populações	Enzimas						
	Enzimas Digestivas				Enzimas de Acesso		
	Proteases				Celulase	Pectinases	
	Protease Total	Serino-protease (amidásica)	Serino- protease (esterásica)	Cisteíno- protease		Poligalacturonase	Pectina Liase
	(abs./mg proteína)	(nmol/s/mg proteína)			(nmol/min/mg proteína)		(U/mg proteína)*10 ⁻⁷
Sete Lagoas	0,24 ± 0,01 a	0,045 ± 0,0016 b	0,35 ± 0,05 b	0,03 ± 0,002 b	14,70 ± 0,30 b	9,83 ± 0,65 a	0,0137 ± 5,11 a
Juiz de Fora	0,25 ± 0,01 a	0,074 ± 0,0045 a	3,08 ± 0,47 a	0,05 ± 0,001 a	16,19 ± 0,65 a	9,44 ± 0,69 a	0,0134 ± 0,174 a
Jacarezinho	0,29 ± 0,02 a	0,064 ± 0,0043 a	1,07 ± 0,18 b	0,05 ± 0,003 a	17,59 ± 0,52 a	4,15 ± 0,22 b	0,945 ± 2,72 a

De acordo com análise de variância e subsequente teste de média apenas a atividade de protease total não diferiu significativamente entre as populações estudadas ($F = 2,79$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,1394$). As populações de Juiz de Fora e Jacarezinho não apresentaram diferença significativa entre elas, mostrando as mais altas atividades de serino-protease (amidásica) ($F = 15,56$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0042$), cisteíno-protease ($F = 25,96$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0011$) e celulase ($F = 23,85$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0014$). Em contrapartida, a maior atividade de serino-protease (esterásica) foi exibida apenas pela população de Juiz de Fora ($F = 22,65$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0016$).

Entre as enzimas de acesso do inseto ao alimento, pectina liase não apresentou diferença significativa de sua atividade entre as três populações ($F = 5,01$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0526$), sendo que as populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora apresentaram atividades mais altas de poligalacturonase ($F = 31,18$, $gl_{\text{erro}} = 6$, $p = 0,0007$).

A análise de variáveis canônicas (CVA) para as enzimas digestivas e de acesso do inseto ao alimento indicou diferença significativa entre as populações, considerando a atividade das mesmas. Foram calculados dois eixos canônicos, sendo apenas o primeiro significativo ($p < 0,05$) e responsável por 99,99% da variância total observada (Tabela 2).

Tabela 2: Eixos canônicos e suas cargas (entre estrutura canônica) de populações de caruncho-do-milho (*S. zeamais*) baseado na atividade de enzimas digestivas e de acesso do inseto ao alimento destas populações.

Variáveis (enzimas)	Eixos canônicos	
	1	2
Protease (total)	0.50	0.86
Serino-protease (amidásica)	0.99	0.11
Serino-protease (esterásica)	0.83	0.55
Cisteíno-protease	0.98	0.15
Celulase	0.99	0.03
Poligalacturonase	-0.37	0.92
Pectina liase	-0.35	0.93
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001
Correlação canônica quadrada	1,00	1,00

Baseado em suas cargas canônicas, serino-proteases (amidásica e esterásica), cisteíno-proteases e celulasas (eixo 1) foram as enzimas que mais contribuíram para a divergência entre as populações.

O diagrama de ordenação derivado da análise de variáveis canônicas foi realizado com os dois eixos e mostrou diferença significativa entre as populações estudadas, separando a população susceptível (Sete Lagoas) das outras duas populações resistentes (Jacarezinho e Juiz de Fora) (Figura 1).

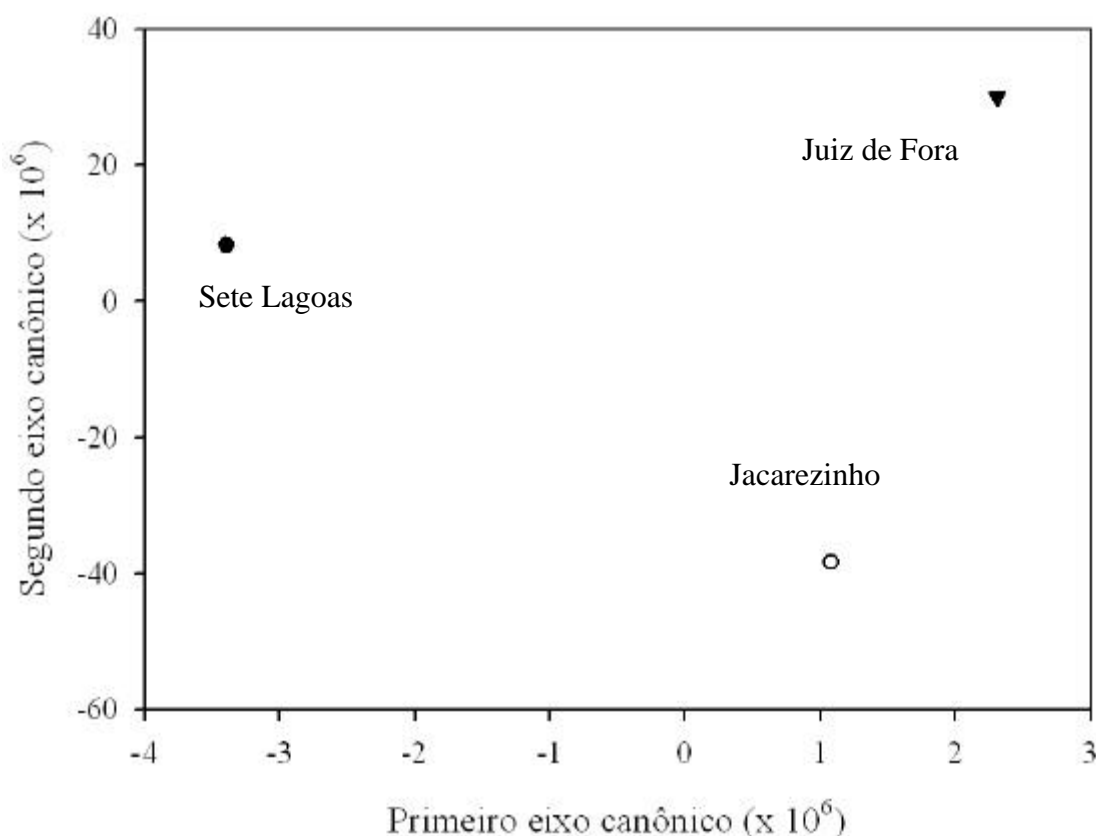


Figura 1: Diagrama de ordenação (CVA) mostrando a discriminação das três populações de *S. zeamais*, baseado na atividade das enzimas digestivas e de acesso do inseto ao alimento. Os símbolos são as populações e representam as médias das classes de variáveis canônicas.

b) Parâmetros cinéticos

As curvas de velocidade do tipo hiperbólica foram obtidas para as quatro enzimas que contribuíram para a divergência das populações, mostrando que serino-protease (amidásica e esterásica), cisteíno-protease e celulase de *S. zeamais* seguem a

cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentração de substrato usada (Figura 2, 3A e 3B, 4). Os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ destas mesmas enzimas foram, portanto, determinados utilizando a equação do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten (Tabela 3).

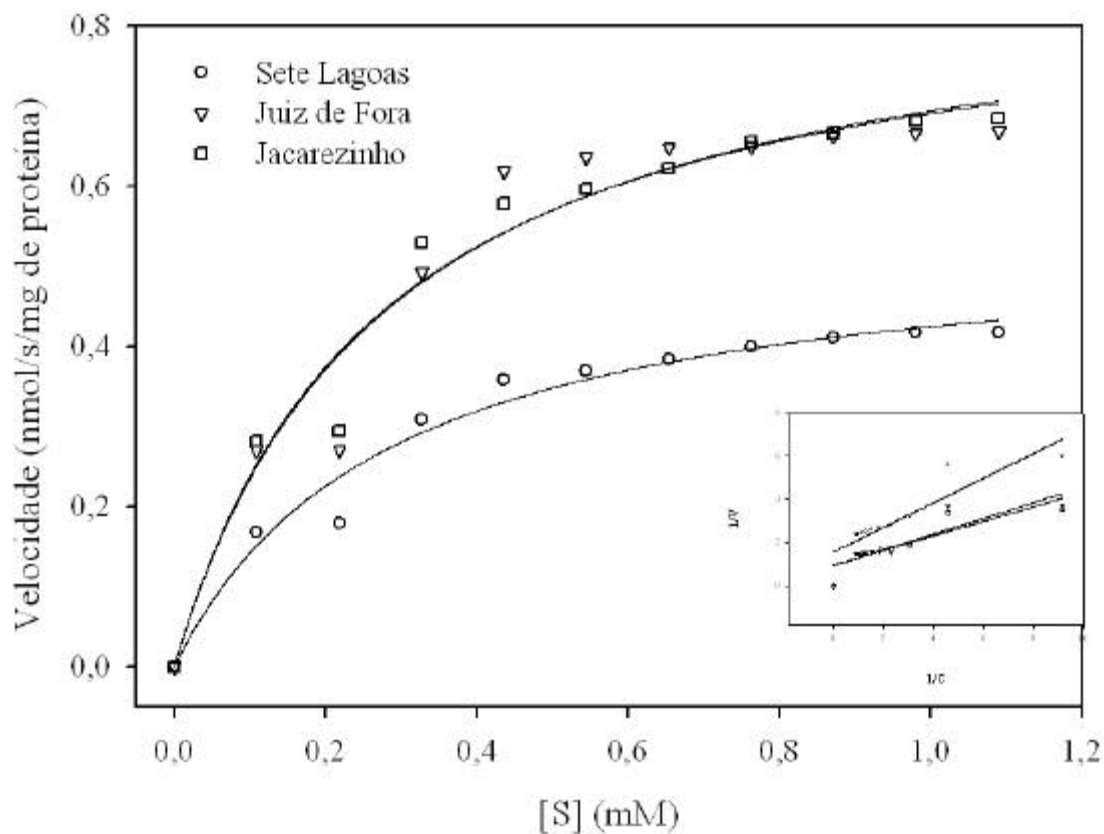


Figura 2: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino-protease (amidásica) de *S. zeamais* das populações de Sete Lagoas, Juiz de Fora e Jacarezinho. A curva hiperbólica foi obtida a partir dos dados experimentais usando a equação de Michaelis-Menten e para obtenção de K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

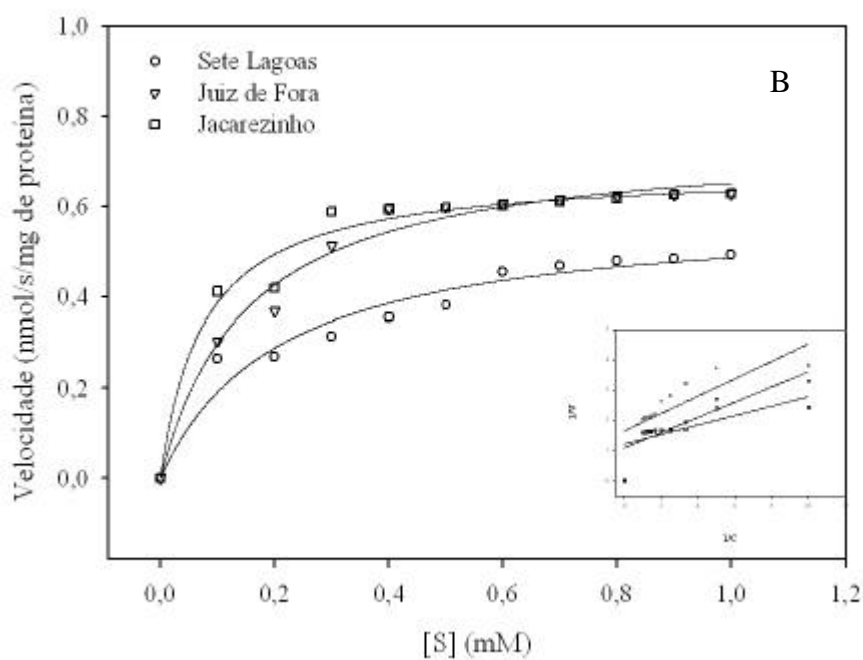
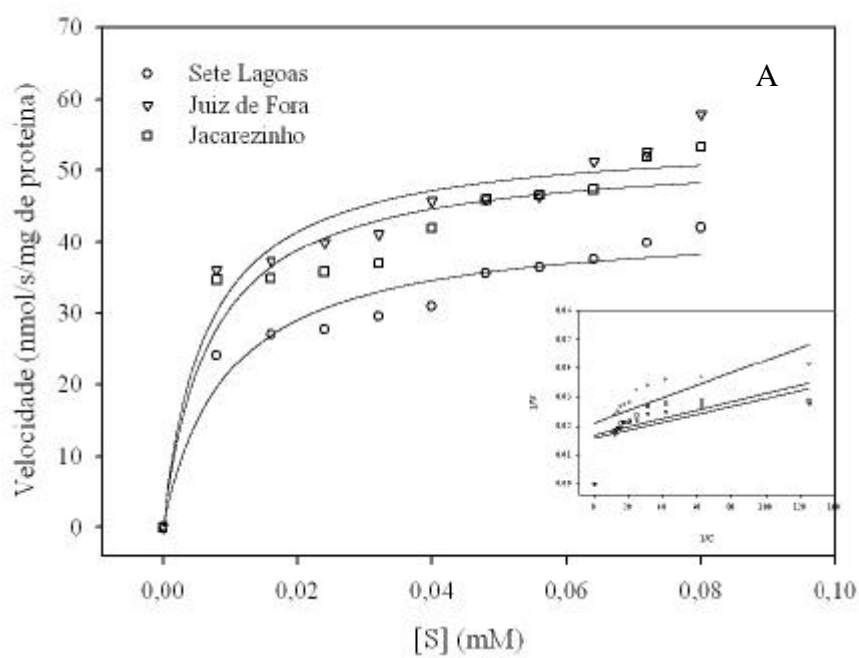


Figura 3: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de serino-protease (esterásica) (A) e cisteíno-protease (B) de *S. zeamais* das populações de Sete Lagoas, Juiz de Fora e Jacarezinho. A curva hiperbólica foi obtida a partir dos dados experimentais usando a equação de Michaelis-Menten e para obtenção de K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

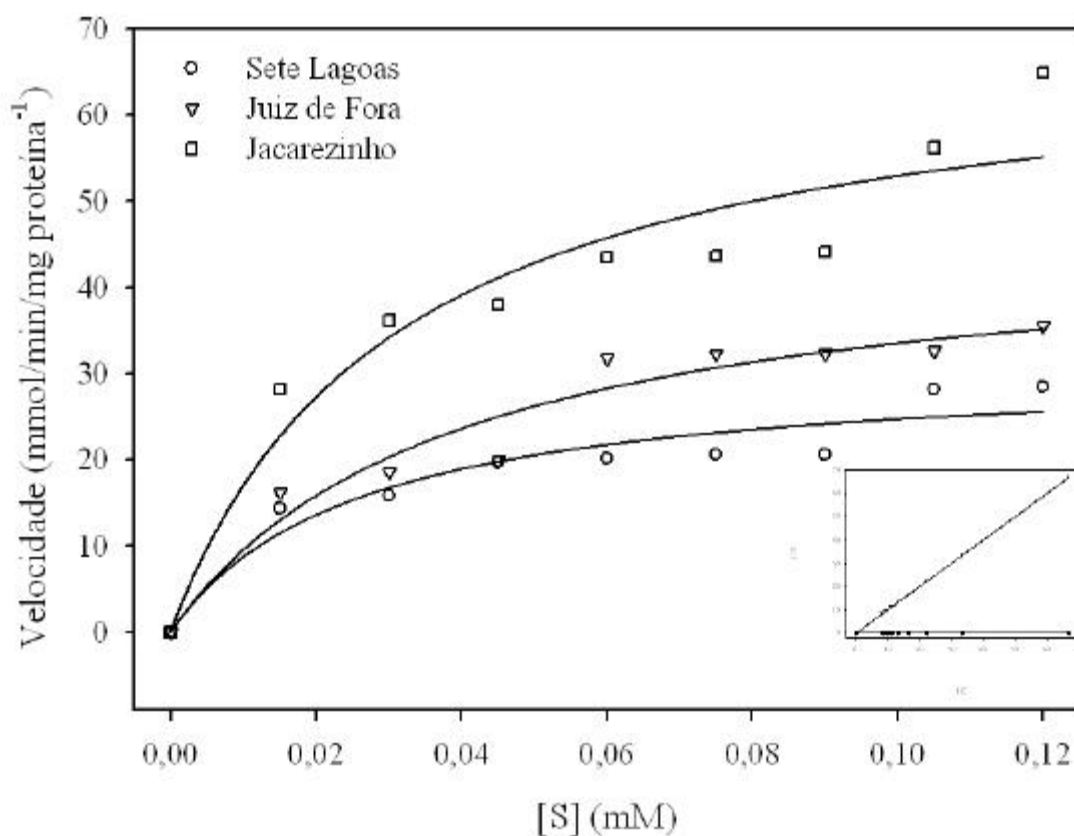


Figura 4: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de celulase de *S. zeamais* das populações de Sete Lagoas, Juiz de Fora e Jacarezinho. A curva hiperbólica foi obtida a partir dos dados experimentais usando a equação de Michaelis-Menten e para obtenção de K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos de serino-protease (amidásica e esterásica), cisteíno-protease e celulase de *S. zeamais* provenientes de uma população susceptível (Sete Lagoas) e duas populações resistentes (Juiz de Fora e Jacarezinho).

Populações	Enzimas							
	Serino-protease (amidásica)		Serino-protease (esterásica)		Cisteíno-protease		Celulase	
	K _M (mM)	V _{máx} (nmol/s/mg proteína)	K _M (mM)	V _{máx} (nmol/s/mg proteína)	K _M (mM)	V _{máx} (nmol/s/mg proteína)	K _M (mM)	V _{máx} (nmol/min/mg proteína)
Sete Lagoas	0,28 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,009 ± 0,002	42,65 ± 2,48	0,20 ± 0,04	0,58 ± 0,04	0,02 ± 0,01	30,98 ± 3,76
Juiz de Fora	0,27 ± 0,07	0,88 ± 0,07	0,006 ± 0,002	54,78 ± 2,91	0,15 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,04 ± 0,01	46,45 ± 5,51
Jacarezinho	0,26 ± 0,05	0,87 ± 0,05	0,007 ± 0,002	52,52 ± 3,18	0,07 ± 0,01	0,68 ± 0,02	0,03 ± 0,01	69,17 ± 9,37

DISCUSSÃO

Diversos estudos sobre evolução da resistência associam esse fenômeno a um custo fisiológico ao indivíduo (Raymond *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Sinkins & Hastings, 2004). Fragoso *et al.*, (2005), realizando estudos de crescimento populacional em *S. zeamais*, mostraram que a população de Jacarezinho possuía performance de desenvolvimento igual à população susceptível e superior à outra população resistente de Juiz de Fora. Outros estudos realizados por Guedes *et al.* (2006) constataram que a quantidade de reservas armazenadas nas células de corpo gorduroso de indivíduos provenientes da população resistente de Jacarezinho era significativamente superior as das demais populações utilizadas em seus estudos. Logo, a alocação de energia para a produção dos aparatos detoxificativos nesta mesma população ocorrerá sem que haja comprometimento de seu potencial reprodutivo. Outros estudos demonstram que resistência a inseticidas não necessariamente incorre em custos fisiológicos e revelam genótipos resistentes com potencial de adaptação igual ou superior aos dos susceptíveis (Kence & Jdeidi, 1997; Baker *et al.*, 1998).

Os trabalhos de Fragoso *et al.*, (2005) e Guedes *et al.*, (2006) sugerem que o custo fisiológico da população de Jacarezinho esteja sendo mitigado, pois a energia alocada está sendo suficiente tanto para seus processos fisiológicos quanto para resistência a inseticidas.

Com o objetivo de verificar quais os possíveis mecanismos que estariam possibilitando o acúmulo desta energia, realizamos ensaios com enzimas digestivas (proteases e celulase) e também, enzimas responsáveis pelo acesso do inseto ao alimento (poligalacturonase e pectina liase). O grupo das proteases é dividido em subclasses diferentes e quando determinamos a atividade de protease total, ou seja, a atividade de todas as proteases presentes em *S. zeamais*, os resultados demonstraram que não existe diferença significativa entre as três populações. Mas, quando determinamos atividade de classes específicas de proteases (serino-proteases e cisteíno-proteases) verificamos diferença significativa entre populações. Apesar de alguns estudos mostrarem que serino-proteases estão presentes em baixo nível na maioria das espécies de *Sitophilus spp.* (Baker, 1982), e que cisteíno-proteases são a classe mecanística predominante nestes mesmos insetos (Liang *et al.*, 1991; Houseman & Thie, 1993), o presente estudo mostra que serino-proteases são as enzimas

predominantes nas populações de *S. zeamais* estudadas devido a alta atividade esterásica destas.

A alta atividade amidásica e também de cisteíno-protease nos insetos de Jacarezinho sugere que durante a digestão ocorre liberação de grande quantidade de aminoácidos, que são utilizados em grande parte, para a síntese protéica. Posteriormente estas proteínas formadas são armazenadas nas células trofocíticas do corpo gorduroso dos insetos e utilizadas para o crescimento e desenvolvimento do organismo (Guedes et al., 2006). Estas reservas são mobilizadas de maneira mais eficiente, pois os insetos da população de Jacarezinho apresentam melhor performance de desenvolvimento frente à outra população resistente. Em contrapartida, para a população de Juiz de Fora, podemos sugerir que a alta atividade amidásica, esterásica e de cisteíno protease incorre apenas em gasto adicional de energia para os insetos, pois a maioria dos aminoácidos liberados durante a digestão de proteínas pode estar sendo alocado apenas para a manutenção do organismo e para o seu mecanismo de defesa. Conseqüentemente seu crescimento e desenvolvimento estão sendo prejudicados em decorrência do custo fisiológico existente nesta população.

Ainda dentro do grupo das enzimas hidrolíticas, assim como as proteases, temos a celulase, enzima responsável pela hidrólise das ligações β -1,4, entre as unidades de glicose que formam a celulose (Lehninger *et al.*, 2000). A digestão de celulose ocorre normalmente em insetos xilófagos, ou seja, que se alimentam de madeira, ou onívoros com dieta nutricionalmente pobre, especialmente aqueles cujo intestino é colonizado por microrganismos (Chown & Nicolson, 2004). Os insetos mais conhecidos que digerem celulose são os cupins e os gafanhotos. A idéia estabelecida por muito tempo é que as enzimas que digerem celulose são derivadas dos protozoários ou bactérias que residem no intestino dos insetos, ou fungo ingerido na dieta (Martin, 1991). Entretanto, a contribuição das enzimas endógenas tem sido fortemente debatida (Slaytor, 1992). Os insetos são quase universalmente associados com microrganismos, sendo então, difícil refutar a hipótese estabelecida de enzimas derivadas (Chown & Nicolson, 2004). Apesar de muitos simbiosiontes estarem localizados no intestino posterior, celulase endógena está presente nas glândulas salivar e intestino médio de insetos (Chown & Nicolson, 2004).

Os resultados obtidos com a atividade de celulase são semelhantes aos resultados de proteases e as populações de Juiz de Fora e Jacarezinho apresentaram atividades semelhantes e significativamente mais altas. O processo de digestão da celulose,

liberação de glicose para síntese de carboidratos e posteriormente acúmulo deste carboidrato no corpo gorduroso, ocorre na mesma proporção que as proteínas. O carboidrato armazenado é mobilizado de maneira mais eficiente, pois os insetos da população de Jacarezinho apresentam melhor performance de desenvolvimento frente à outra população resistente. Em contrapartida, para a população de Juiz de Fora, podemos sugerir que a alta atividade de celulase incorre em liberação de grande quantidade de glicose que será utilizada apenas para a manutenção do organismo e para o seu mecanismo de defesa. O crescimento e desenvolvimento estarão prejudicados em decorrência do custo fisiológico existente nesta população.

Os insetos utilizados neste estudo são uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. Sua dieta é rica principalmente em amido e a quantidade de celulose ingerida é muito pequena, proveniente apenas da parede celular do tegumento do grão. Acredita-se que a alta atividade de celulase encontrada em *S. zeamais* seja herança de outras espécies broqueadoras de madeira filogeneticamente relacionados.

Finalmente, dentro do grupo das enzimas de acesso do inseto ao alimento, encontramos poligalacturonase e pectina liase, sendo que esta última não apresentou diferença significativa em sua atividade entre as três populações ($p < 0,05$). Entretanto, poligalacturonase apresentou atividades semelhantes e mais altas para a população de Sete Lagoas e Juiz de Fora. Em um estudo realizado com *Sitophilus oryzae*, o caruncho-do-arroz, Shen *et al.* (1996) demonstraram que as pectinases deste inseto são empregadas como enzimas digestivas. Além disto, a degradação da pectina pode ajudar outras enzimas digestivas a terem acesso ao alimento (Shen *et al.*, 1996). Shen *et al.* (1996) concluíram que poligalacturonases, juntamente com pectinesterases, degradam pectina em oligossacarídeos que podem ser absorvidos pelo intestino do inseto. Desta maneira, pectina, um dos maiores componentes da parede celular das plantas, pode ser usada como fonte de energia para os insetos. Portanto, os resultados obtidos com poligalacturonase sugerem que os insetos da população de Jacarezinho utilizam pouca quantidade de pectina como fonte de energia, sendo a maioria desta energia proveniente da digestão de proteínas e carboidratos.

Os parâmetros cinéticos foram estimados apenas para as enzimas mais importantes na divergência entre as populações. As constantes obtidas com a atividade amidásica e esterásica nas três populações concordam com os trabalhos realizados por Magalhães Rocha *et al.* (1980) e Oliveira *et al.* (1993), que encontraram valores de K_M

de 15 M para TAME e 0,58mM para BApNA, respectivamente, evidenciando então a maior afinidade da serino-protease pelo substrato éster.

Serino-proteases (amidásica) e cisteíno-proteases dos insetos de Jacarezinho apresentaram maior afinidade pelo BApNA, devido ao seu menor valor de K_M ; e serino-proteases (esterásica), também de Jacarezinho, apresentaram maior afinidade pelo TAME. Entretanto, celulases dos insetos de Sete Lagoas apresentaram maior afinidade pela celulose. Estes resultados sugerem diferença na digestão de proteínas e carboidratos entre as populações resistentes e susceptível, sendo as proteínas digeridas preferencialmente pela populações resistente de Jacarezinho.

A alta atividade de proteases e também de celulase na população de Jacarezinho sugerem grande eficiência na digestão de proteínas e carboidratos com conseqüente acúmulo nas células de corpo gorduroso. Durante o ciclo de vida destes insetos, as reservas energéticas parecem ser alocadas para a manutenção do mecanismo de defesa sem que haja comprometimento dos processos fisiológicos básicos (crescimento, desenvolvimento e reprodução), possibilitando assim a mitigação do custo fisiológico associado à resistência nesta população. Entretanto, o mesmo não ocorre com a população de Juiz de Fora, pois grande parte do produto da digestão parece estar sendo utilizado apenas para a manutenção do organismo, prejudicando então o seu desenvolvimento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Albersheim, P., 1966. Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymology* 8, 628-631.
- 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.
- Baker, J.E., Perez-Mendonça, J., Beeman, R.W., Throne, J.E., 1998. Fitness of a malathion-resistant strain of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Economic Entomology* 91, 50-55.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., Chevillon, C., 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 72, 41-47.
- Beeman, R.W., Nanis, S.M., 1986. Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 79, 580-587.
- Beguín, P., Aubert, J.P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Review* 13, 25–58.
- Breznak, J.A., Brune, A., 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by térmites. *Annual Review Entomology* 39, 453–487.
- 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.
- Chown, S.L., Nicolson, S.W., 2004. *Insect Physiological Ecology: mechanisms and patterns*. Oxford University Press, 243p.
- Coustau, C., Chevillon, C., French-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 378-383.
- Doostdar, H., Gregory McCollum, T., Mayer, R.T., 1997. Purification and Characterization of an endo-polygalacturonase from gut of west indies sugarcane rootstalk borer weevil (*Diaprepes abbreviatus* L.) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 118, 861-867.
- 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., 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.

- Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X., Vulfson, E.N., 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology* 18, 162-183.
- Gorman, M.J., Andreeva, O.V., Parkewitz, S.M., 2000a. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 35-46.
- Gorman, M.J., Andreeva, O.V., Parkewitz, S.M., 2000b. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene* 251, 9-17.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B.M., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* (no prelo)
- 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.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., Scholein, M., 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technology* 3, 722-726.
- 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 *Prostephanus 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 Biochemistry Physiology* 37, 1393-1399.
- Kence, M., Jdeidi, T., 1997. Effect of malathion on larval competition in house fly (Diptera: Muscidae) populations. *Journal of Economic Entomology* 90, 59-65.
- Lee, S.J., Kim, S.R., Yoon, H.J., Kim, I., Lee, K.S., Je, Y.H., Lee, S.M., Seo, S.J., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2004. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 107-116.

- Lehninger, A.I., Nelson, D.I., Cox, M.M. 2000. Principles of Biochemistry, 3rd edition, Worth Publishers Inc., New York, 1200p.
- Li, X., Ma, L., Sun, L., Zhu, C., 2002. Biotic characteristics in deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) in China. Applied Entomological Zoology 37, 305-308.
- Liang, C., Brookhart, G., Feng, G.H., Reeck, G.R. & Kramer, K.J., 1991. Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleopteran by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. FEBS Letters 278, 139–142.
- Magalhães-Rocha, N.M., Rogana, E., Mares-Guia, M., 1980. Kinetic parameters for the activation of α - and β -trypsin by the methyl ester of the tosyl-l-arginine (Tos-l-Arg-OMe). Archives of Biochemistry and Biophysics 200, 61– 64.
- Martin, M.M., 1991. The evolution of cellulose digestion in insects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 333, 281-288.
- Miller, G.L., 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31, 426–428.
- Ohtoko, K., Ohkuma, M., Moriya, S., Inoue, T., Usami, R., Kudo, T., 2000. Diverse genes of cellulase homologues of glycosylhydrolase family 45 from the symbiotic protists in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus*. Extremophiles 4, 343–349.
- Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J., Mares-Guia, M., 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Journal of Biological Chemistry 268, 26893–26903.
- 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 Perspective. Birkhauser Verlag, Boston, pp. 125–148.
- SAS Institute, 2001. SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th edition SAS Institute, Cary, NC. Todd and Browde.
- Shen, Z., Reese, J.C., Reeck, G.R., 1996. Purification and characterization of poligalacturonase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 26, 427-433.
- Sinkins, S.P., Hastings, I.M., 2004. Male-specific insecticide resistance and mosquito transgene dispersal. Trends in Parasitology, 20: 413-416.

- Slaytor, M., 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comparative Biochemistry and Physiology B* 103, 775-784.
- SPSS Inc., 2000. *SigmaPlot 2000 User's Guide, Revised Edition*. SPSS Inc., Chicago.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L., 1949. *Journal Laboratory Clinical Medical* 34, 428.
- Xavier, L.P., 2002. Caracterização bioquímica de proteases do intestino de *Anticarsia gemmatalis* envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Dissertação de Mestrado, 83p., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Warburg, O., Christian, W., 1941. Isohierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochemische Zeitschrift* 310, 384-421.
- Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N., 1998. A cellulase gene of termite origin. *Nature* 394, 330-331.
- Wei, Y.D., Lee, S.J., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Yoon, H.J., Kim, I., Je, Y.H., Guo, X., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2005. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 331-336.
- Wilson, I., Vogel, J., Somerville, S., 1997. Signalling pathways: a common theme in plants and animals? *Current Opinion in Biology* 7, 175-178.
- Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A., Shade, R.E., Ahn, J.E., 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12, 135-145.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é uma continuação aos estudos de resistência a inseticidas em populações brasileiras de *S. zeamais* iniciados na década de 90. Estudos anteriores demonstraram, através de ensaios de crescimento populacional e características morfológicas de células do corpo gorduroso, a existência de custo fisiológico na população de Juiz de Fora e ausência do mesmo na população de Jacarezinho. Com isso, foi determinada a atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo energético e digestivo do caruncho-do-milho, com o objetivo de verificar quais seriam os possíveis mecanismos que possibilitariam a mitigação deste custo na população de Jacarezinho.

Quanto ao metabolismo energético, podemos sugerir que a mobilização imediata das reservas energéticas nos insetos da população de Jacarezinho, como trealose, parece ocorrer de maneira eficiente. O mecanismo de defesa parece ser ativado apenas quando ocorre necessidade, sem gasto adicional de energia e não prejudicando os processos fisiológicos básicos; diferente do que parece acontecer na população de Juiz de Fora. Nos insetos desta população, a energia parece ser alocada excessivamente, prejudicando outras rotas metabólicas essenciais ao desenvolvimento do organismo.

Quanto ao metabolismo digestivo, podemos sugerir que a hidrólise de proteínas e carboidratos ocorre também de maneira mais eficiente na população de Jacarezinho, pois o produto da digestão é em grande parte direcionado para as células trofocíticas do corpo gorduroso para posterior acúmulo e mobilização. Durante o ciclo de vida destes insetos, as reservas energéticas parecem ser alocadas para a manutenção do mecanismo de defesa sem que haja comprometimento dos processos fisiológicos básicos (crescimento, desenvolvimento e reprodução), possibilitando assim a mitigação do custo fisiológico associado à resistência nesta população. Entretanto, o mesmo parece não ocorrer com a população de Juiz de Fora, pois grande parte do produto da digestão pode estar sendo utilizado apenas para a manutenção do organismo, prejudicando então o seu desenvolvimento.

Neste trabalho foram testados dois parâmetros (metabolismo energético e digestivo) que poderiam estar possibilitando a mitigação do custo fisiológico na população de Jacarezinho, sendo que o segundo parâmetro apresentou resultados mais consistentes e parece ser o mecanismo responsável pela minimização deste custo associado ao fenômeno de resistência. Outros trabalhos ainda devem ser feitos para

evidenciar ainda mais estes resultados, como a purificação das enzimas mais relevantes presentes nas rotas metabólicas estudadas, assim como exposição dos insetos provenientes das três populações estudadas ao inseticida, para posterior comparação do metabolismo energético e digestivo na presença e ausência do agente tóxico.