



## ANÁLISE DA MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO INSETO *Callosobruchus maculatus*

Leonardo Figueira Reis de Sá <sup>1\*</sup>

Antonia Elenir Amancio Oliveira<sup>1</sup>

Olga Lima Tavares Machado<sup>1</sup>

**Resumo:** O inseto *Callosobruchus maculatus* é a principal praga de grãos armazenados de *Vigna unguiculata* e, portanto, o estudo de seu ciclo de vida é importante não apenas para uma investigação básica, mas também para o desenvolvimento de novo métodos de controle. No presente trabalho nós investigamos a mobilização de proteínas e aminoácidos durante o desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus*. Foram caracterizados importantes eventos morfológicos do desenvolvimento embrionário, como a extensão e retração da banda germinal e fechamento dorsal. Através de estratégias qualitativas e quantitativas foi demonstrada a degradação de proteínas durante todo o desenvolvimento embrionário. Também foi demonstrada a variação de diferentes aminoácidos durante o desenvolvimento do embrião. Atividades proteolíticas em pH 3,4, 5,0 e 8,0, características das proteases aspárticas, cisteínicas e serínicas, respectivamente, variaram consideravelmente a embriogênese. Tomados em conjunto os resultados deste trabalho demonstram a importância do metabolismo de proteínas durante o metabolismo do inseto *Callosobruchus maculatus*.

**Palavras-chave:** *Callosobruchus maculatus*. Embriogênese. Metabolismo

### 1- Introdução

O gênero *Callosobruchus* é amplamente difundido no mundo, particularmente em regiões tropicais e subtropicais. Esse gênero compreende 20 espécies, incluindo o inseto *Callosobruchus maculatus*, considerado a principal praga de sementes de *Vigna unguiculata*. O ciclo de vida deste inseto ocorre em torno de 23 a 30 dias em condições ótimas de temperatura e humidade. Após a oviposição das fêmeas sobre o tegumento de sementes de *V. unguiculata*, o período de desenvolvimento embrionário e eclosão larval ocorre em torno de cinco a seis dias (SOUZA et al., 2011). Após a eclosão a larva atravessa o tegumento e atinge os cotilédones, onde irá se desenvolver, passando por um estágio de pupa, que por sua vez, irá se transformar em um inseto adulto. A infestação do inseto *C. maculatus* reduz severamente o valor

nutricional, potencial de germinação e o valor comercial das sementes (CRUZ et al., 2016).

A embriogênese é um evento crítico para o sucesso do desenvolvimento de insetos e, conseqüentemente, para a infestação de sementes. O desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* compreende os principais eventos clássicos da embriogênese de insetos, como formação de blastoderme celular, extensão e retração da banda germinal, segmentação do embrião, formação de apêndices e fechamento dorsal, que é completado em torno de 96 horas após a postura dos ovos (DE SÁ et al., 2014).

Dadas as perdas econômicas decorrentes da predação de *C. maculatus*, o controle da infestação é fundamental para a produção de espécies suscetíveis como *V. unguiculata* (KARUNGI et al., 2000). Interferir no desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* parece ser uma abordagem atraente na prevenção do desenvolvimento de larvas e penetração nas sementes e subsequente dano ao embrião das mesmas. Para isso, é importante compreender os principais aspectos moleculares inerentes ao desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*. Embora os principais eventos celulares da embriogênese de *C. maculatus* tenham sido descritos (DE SÁ et al., 2014) as diferentes vias metabólicas primárias envolvidas na mobilização de reservas durante o desenvolvimento embrionário permanecem ainda não caracterizadas. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo a caracterização da mobilização do conteúdo de proteínas e aminoácidos durante o desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus*.

## **2- Materiais e métodos**

### **2.1- Insetos e sementes**

O inseto *C. maculatus* foi obtido a partir de uma colônia, mantida no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biotecnologia e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Para a criação foram usadas sementes de *V. unguiculata* (cv. fradinho) que foram infestadas com fêmeas de 2 dias de idade por 24 h. As sementes infestadas foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, de boca larga fechados com tampas plásticas perfuradas. Os frascos foram mantidos em câmaras de crescimento do tipo B.O.D, à temperatura de 28 °C e umidade ambiente. A cada

geração de insetos emergidos novas sementes foram infestadas para a continuidade da criação.

As sementes de *Vigna unguiculata* foram obtidas comercialmente no mercado central da Cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.

## **2.2- Fixação e marcação dos embriões de *C. maculatus* com DAPI**

Os experimentos de fixação e marcação de embriões seguiram a metodologia previamente descrita por De Sá e colaboradores (2014). Sementes de *V. unguiculata* foram infestadas com fêmeas de 2 dias após a oviposição (DAO) por 4 h a 28 °C em B.O.D. Nos tempos de 24, 36, 48 e 60 horas após a oviposição (HAO) foram retirados 70 g de sementes de *V. unguiculata*, e colocadas em frascos contendo 150 mL de cloro comercial (2-2,5 % de hipoclorito de sódio). As sementes foram agitadas levemente por 30 segundos para a digestão do exocóricion (camada mais externa da casca do ovo) e assim possibilitar o descolamento do ovo da superfície do tegumento. Os ovos foram recuperados com o auxílio de uma peneira (Falcon cell strainer-70 µm Nylon mesh, Becton Dickinson). Os ovos retidos pela peneira foram recolhidos com o auxílio de um pincel de cerdas finas. Em seguida, colocados em frascos contendo uma solução fixadora formada por: 3,8 mL de PBST (tampão fosfato de sódio 0,15 M, Tween 20 0,05 %, pH 7,6), 1,2 mL de formaldeído 37 % e 5 mL de heptano. A mistura foi agitada em uma plataforma rotatória a 220 rpm por 1 hora. Após repouso de 5 minutos, a fase inferior (contendo PBST e formaldeído) foi retirada e 8 mL de metanol resfriado a -20 °C foram adicionados ao tubo, seguido de vigorosa agitação manual por 40 segundos. A solução foi removida e os ovos contendo os embriões fixados foram lavados com metanol por três vezes. Para a retirada dos embriões do interior dos ovos, os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por 10 segundos e agitados vigorosamente. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Para a análise da morfologia embrionária em microscópio de fluorescência, os embriões foram marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Os embriões foram reidratados com tampão PBST, seguidos de três lavagens com mesmo tampão. Após isso, uma solução de DAPI de 5 µg/ml de tampão PBST foi adicionada aos embriões que foram incubados por 10 minutos a -4°C. Os embriões marcados foram lavados novamente com PBST e visualizados ao microscópio de fluorescência.

## **2.2- Obtenção e quantificação proteica em embriões de *C. maculatus***

Sementes de *V. unguiculata* foram infestadas com fêmeas férteis com 2 dias de idade por 4 horas a 28 °C. Posteriormente, ovos de diferentes horas após a oviposição (4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96) foram retirados da superfície dos tegumentos individualmente com o auxílio de uma agulha e colocados em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1M; NaCl 0,15M, pH 7,2), na proporção de 1,3 ovos/ $\mu$ L. Em seguida, os ovos foram macerados por 1 minuto, agitados por 30 minutos a 4 °C e centrifugados por 5 minutos a 10000 x g a 4 °C. Os sobrenadantes foram submetidos a dosagem de proteínas de acordo com o método de Smith e colaboradores (1985), usando ácido bicinconínico (BCA). As absorbâncias foram medidas a 560 nm e para a determinação da concentração foi utilizada uma curva de albumina sérica bovina pura (BSA) como padrão.

### **2.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As proteínas totais solúveis de ovos durante o desenvolvimento embrionário foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % contendo SDS segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações. A eletroforese foi realizada utilizando um gel de empacotamento formado por SDS 0,1 %; acrilamida 5 %; bis-acrilamida 0,25 %; Tris-HCl 0,75 M, pH 6,8; TEMED 0,04 % e persulfato de amônio 0,08 % e um gel de separação contendo SDS 0,1 %; acrilamida 12 %; bis-acrilamida 0,06 %; Tris-HCl 0,375 M, H 8,8; TEMED 0,02 % e persulfato de amônio 0,5 %.

Para a extração das proteínas das amostras inicialmente 50 ovos de diferentes horas após a oviposição (HAO) foram macerados manualmente em 50  $\mu$ L de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, azul de bromofenol 1 %, pH 6,8, agitados por 30 min à 4 °C e centrifugadas a 7000 x g por 5 minutos. O sedimento foi descartado e 25  $\mu$ L do sobrenadante foram então aplicadas em cada poço do gel de empacotamento.

A eletroforese foi efetuada em ambiente de tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) por aproximadamente 2 horas com uma voltagem de 60 V, para corrida no gel de empacotamento e 80 V no gel de separação. O gel foi corado com uma solução corante (0,9 g de azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 mL de ácido acético) e descorado por uma solução descorante (35 % de metanol e 10 % de ácido acético).

#### **2.4- Quantificação da atividade de proteases cisteínicas em embriões de *C. maculatus***

A atividade de proteases cisteínicas foi quantificada de acordo com o método descrito por Michaud e colaboradores (1994), usando azocaseína como substrato e papaína pura como padrão. Ovos foram homogeneizados em tampão (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM, pH 5,6), em uma proporção de 2 ovos por  $\mu\text{L}$ . O extrato foi agitado por 4 horas a 4°C e centrifugado a 4000 x g por 5 minutos a 4°C. Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi incubada com 80  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1% a 37°C por uma hora. A reação foi parada com 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10%. As reações foram centrifugadas a 2000 x g por 1 minuto e 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M foi adicionado ao sobrenadante. A leitura das absorbâncias foi feita em comprimento de onda de 440 nm. A atividade de proteases cisteínicas foi calculada utilizando uma curva padrão de papaína pura.

#### **2.5- Quantificação da atividade de proteases serínicas em embriões de *C. maculatus***

A atividade de proteases serínicas foi determinada utilizando BApNa como substrato e tripsina pura como padrão, obedecendo a metodologia descrita por Demartini e colaboradores (2007). Os ovos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, na proporção de 2 ovos por  $\mu\text{L}$ , agitados por 1 hora a 4°C e centrifugados a 4000 x g por 5 minutos a 4°C. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 38  $\mu\text{L}$  de BApNa 5mM e 212  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 a 37°C por 1 hora. A reação foi parada com 150  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30 % e a absorbância mensurada em um comprimento de onda de 440 nm.

#### **2.6- Quantificação da atividade de proteases aspárticas em embriões de *C. maculatus***

Ovos foram homogeneizados em tampão glicina-HCl 50 mM, pH 3,4, em uma proporção de 2 ovos por  $\mu\text{L}$ . Os extratos foram agitados por 2 horas a 4°C e centrifugados a 10000 x g por 15 minutos a 4°C. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubadas com 80  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1%, a 37°C por 1 hora. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Michaud e colaboradores (1994).

#### **2.7- Quantificação de aminoácidos livres em embriões de *C. maculatus***

Ovos de diferentes períodos de desenvolvimento (4, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96) foram coletados em uma solução de HCl 0,02 M na proporção de 1,3 ovos/ $\mu$ L. A solução contendo os ovos foi centrifugada por 10500 x g por 10 minutos a 4 °C, macerada por 2 minutos e centrifugada a 10000 x g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante foi utilizado nas análises de aminoácidos livres seguindo metodologia de Smith e colaboradores (1985). Os aminoácidos foram detectados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em um cromatógrafo Shimadzu modelo LC- 10AD, equipado com coluna de troca catiônica (Amino-Na) e detector de fluorescência. A coluna foi submetida a um fluxo de 0,5 mL/min e eluição com um gradiente crescente de pH, de acordo com instruções do fabricante.

Os aminoácidos foram detectados por fluorescência de excitação/emissão de 350 nm e 450 nm, respectivamente, utilizando derivatização pós-coluna empregando uma solução 0,08 % de orto-ftaldialdeído (OPA) em tampão carbonato de sódio. A coluna foi padronizada com uma mistura de aminoácidos contendo 500 pmoles de cada um dos aminoácidos ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), treonina (Thr), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), arginina (Arg), serina (Ser), isoleucina (Ile) e glutamina (Gln).

## **2.8- Análise estatística**

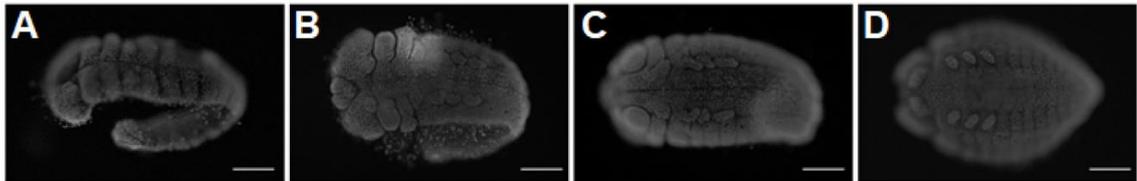
Todos os experimentos foram realizados com um mínimo de duas repetições independentes e os dados apresentados são a média e desvio padrão calculados baseados em todas as repetições. O cálculo da média e desvio e os tratamentos estatísticos foram feitos utilizando o programa Graph-Pad Prism 5.0.

## **3- Resultados**

### **3.1- Desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre sementes de *V. unguiculata***

Nossas observações sobre eventos importantes do desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus* (extensão e retração da banda germinal e fechamento dorsal) corroboram as descritas por De Sá e colaboradores (2014). Em

resumo, no intervalo de 24 HAO os embriões estavam na transição entre a extensão e a retração da banda germinal (Figura 1A). Em 36 e 48 HAO os embriões se apresentaram durante o estágio de retração da banda germinal (Figura 1A e B). Finalmente, em 60 HAO os segmentos torácicos são evidentes e o fechamento dorsal estava em processo (Figura 1D).

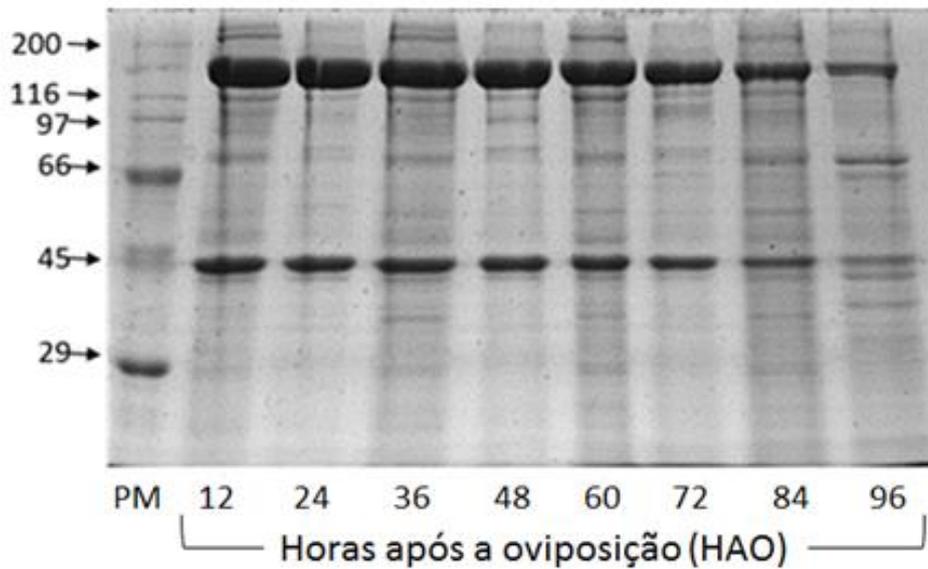


**Figura 1: Visão ventral de eventos morfológicos do desenvolvimento embrionário de *C. maculatus*.** (A) 24 HAO, (B) 36 HAO, (C) 48 HAO e (D) 60 HAO. Barra branca = 50  $\mu$ m

### **3.2- Variação dos níveis de proteínas e aminoácidos livres durante o desenvolvimento em brionário de *C. maculatus***

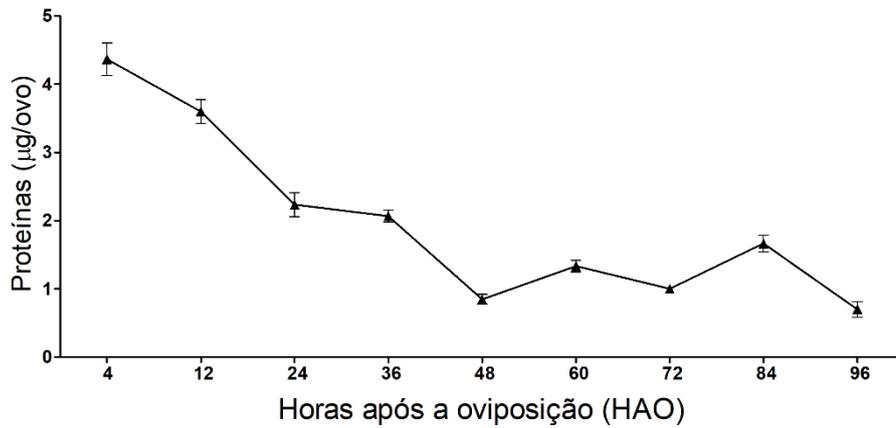
Inicialmente, foi feita a visualização do perfil proteico de ovos de *C. maculatus* durante o desenvolvimento embrionário através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % (Figura 2). Foi observado um perfil proteico onde duas bandas principais de aproximadamente 150 e 45 kDa, estiveram presentes em todos os intervalos de tempo analisados, diminuindo de intensidade progressivamente até o final da embriogênese em 96 HAO.

Para uma avaliação mais detalhada do possível consumo de proteínas, foi feita a quantificação dos níveis de proteínas totais solúveis nos ovos durante o desenvolvimento do embrião. Como pode ser observado na figura 3, nas primeiras 48 HAO ocorreu uma forte redução ( $\approx$  80%) nos níveis proteicos. Esses níveis se mantiveram constantes até 84 HAO, voltando a sofrer um novo decréscimo em 96 HAO. No final do processo em 96 HAO, restaram apenas aproximadamente 15% dos níveis proteicos iniciais.

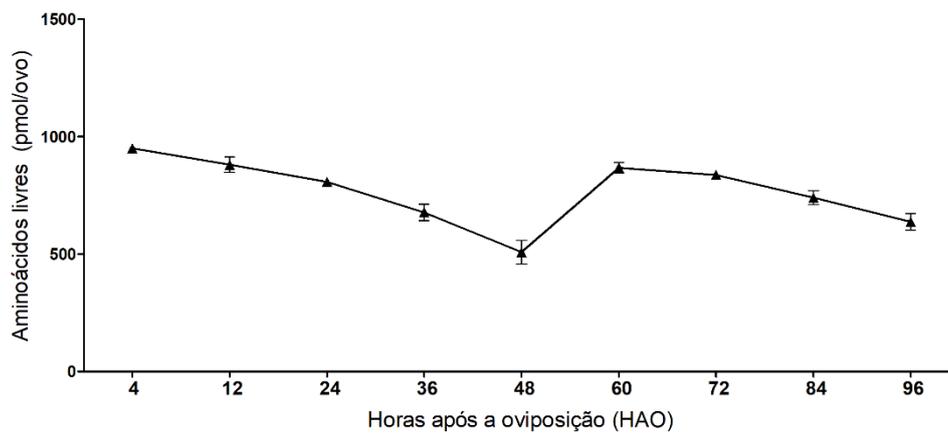


**Figura 2: Visualização por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) de proteínas totais solúveis durante o desenvolvimento embrionário de *Callosobruchus maculatus* sobre sementes naturais de *Vigna unguiculata*. Pesos moleculares em kilodaltons (PM): Miosina (200),  $\beta$ -Galactosidase (116), Fosforilase b (97), Albumina Bovina(66), Albumina de ovo (45) e Anidrase Carbônica(29).**

Os resultados das análises quantificação de aminoácidos livres em embriões revelaram que nas primeiras 48 HAO os níveis decresceram aproximadamente 50 %. Após esse período, os valores apresentaram um aumento até 60 HAO e novamente sofreram uma redução até 96 HAO (Figura 4). Quando analisados individualmente os resultados mostraram que a concentração de muitos aminoácidos oscilou durante o desenvolvimento embrionário, sendo o glutamato o aminoácido majoritário, enquanto prolina, metionina e fenilalanina apresentam as menores concentrações. No período de 4 a 96 HAO os aminoácidos alanina, glicina, histidina e tirosina tiveram seus níveis aumentados, enquanto asparagina, glutamina, treonina, serina e lisina diminuíram durante o mesmo período (Tabela 1).



**Figura 3: Quantificação dos níveis totais de proteínas solúveis durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre sementes de *V. unguiculata*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.**



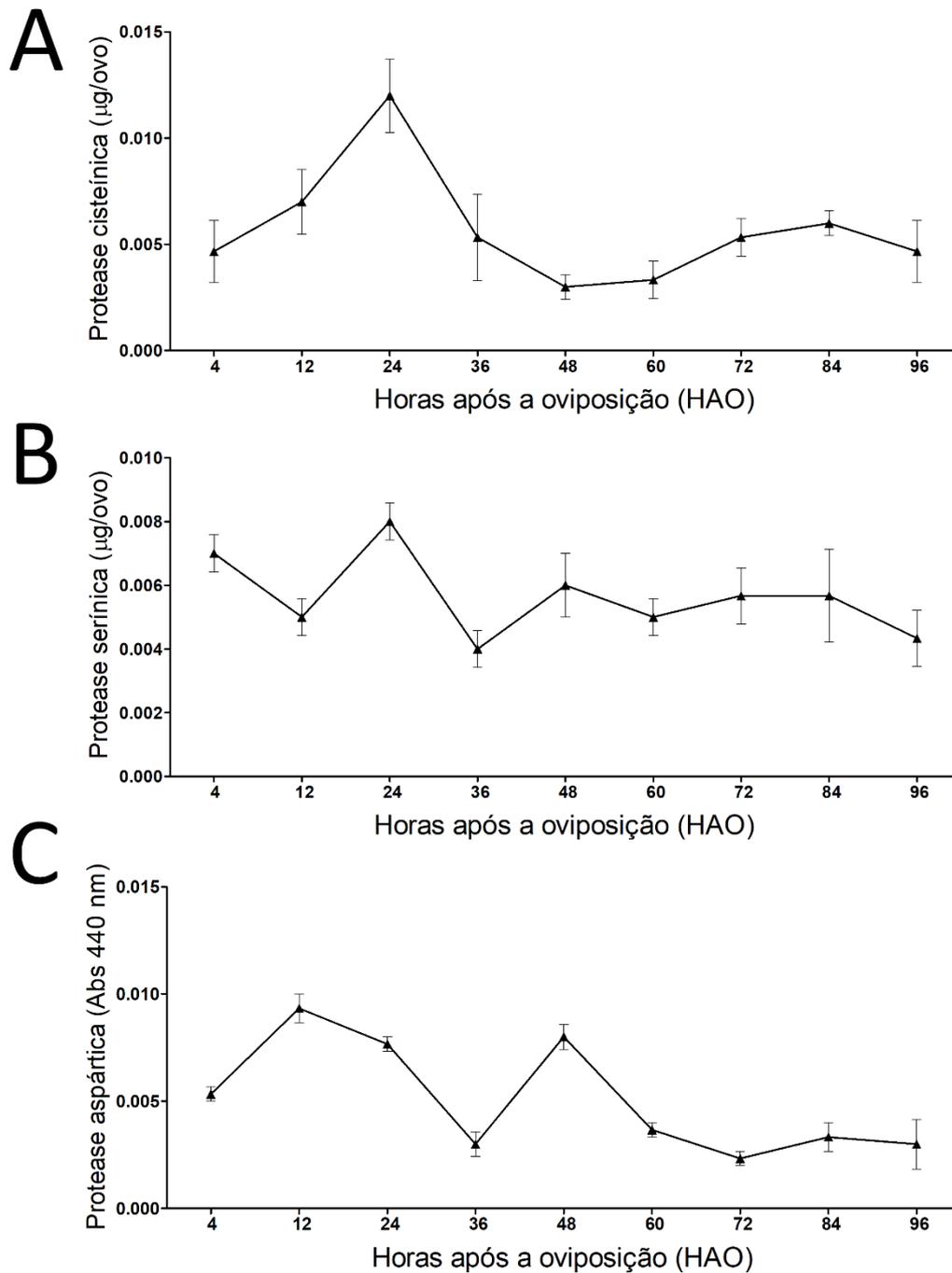
**Figura 4: Quantificação dos níveis de aminoácidos livres totais solúveis durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre sementes de *V. unguiculata*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.**

**Tabela 1: Porcentagem de cada aminoácido proteico dentro do quantitativo dos aminoácidos livres durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre sementes de *V. unguiculata*. Os valores são expressos em porcentagem. \*= aminoácidos não detectados.**

Aminoácidos (%)	Horas após a oviposição sobre <i>V. unguiculata</i>								
	4	12	24	36	48	60	72	84	96
Alanina	4,0	4,4	5,1	5,8	5,8	5,3	6,0	7,4	9,7
Arginina	5,3	2,1	1,7	1,6	1,6	1,6	1,9	1,5	1,2
Asparagina	7,4	10,2	16,5	12,7	12,7	7,8	8,3	7,5	4,4
Fenilalanina	1,5	1,7	2,8	2,3	2,3	1,3	1,4	1,5	2,8
Glicina	0,6	0,9	2,0	4,12	4,12	4,3	3,4	3,5	3,6
Glutamato	28,6	29,5	25,9	24,6	24,6	28,4	28,4	29,8	30,4
Glutamina	7,8	5,4	3,6	3,3	3,3	2,9	2,0	1,9	0,9
Histidina	3,1	3,9	4,8	5,3	5,3	6,3	6,2	9,3	7,8
Isoleucina	1,9	1,7	1,5	1,2	1,2	1,5	1,5	1,7	1,7
Leucina	3,3	2,8	2,1	2,3	2,3	3,0	2,7	3,4	4,4
Lisina	7,7	8,2	7,2	5,9	5,9	3,7	2,5	2,2	3,5
Metionina	2,0	1,9	1,8	2,5	2,5	2,2	1,2	1,4	1,5
Prolina	0*	0*	0*	1,3	1,3	1,1	0,7	0,6	0,9
Serina	10,6	10,4	7,7	6,0	6,0	6,6	4,6	3,9	3,8
Tirosina	6,7	9,8	11,3	15,8	15,8	19,4	24,6	18,5	19,2
Treonina	6,2	4,3	2,9	2,8	2,8	1,9	1,6	1,2	0,3
Valina	3,3	2,8	3,1	2,5	2,9	3,4	3,0	3,8	4,8
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

### 3.3- Atividade de proteases durante o desenvolvimento em brionário de *C. maculatus*

As atividades proteolíticas em pH 3,4, 5,0 e 8,0, características de proteases aspárticas, cisteínicas e serínicas, respectivamente, variaram consideravelmente durante o desenvolvimento embrionário. A atividade de proteases cisteínicas aumentou acentuadamente de 4 para 24 HAO, diminuindo depois, exceto por um ligeiro aumento em 84 HAO (Figura 5A). Além disso, a atividade de proteases serínicas foi superior em 24 HAO, diminuindo em 36 HAO e permanecendo relativamente estável até o final da embriogênese em 96 HAO (Figura 5B). Por fim, as proteases aspárticas apresentaram picos de atividade em 12, 24 e 48 HAO (Figura 5C).



**Figura 5: Quantificação da atividade de proteases cisteínicas, serínicas e aspárticas durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* sobre sementes de *V. unguiculata*. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes.**

#### 4- Discussão

O desenvolvimento embrionário do inseto *C. maculatus* em sementes de *V. unguiculata* foi previamente descrito por De Sá e colaboradores (2014). Neste presente trabalho, o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* também foi acompanhado e os resultados corroboram com a descrição inicial. Os custos metabólicos do desenvolvimento embrionário, ou seja, a quantidade total de energia consumida por um embrião durante seu desenvolvimento, incluindo as demandas por crescimento, biossíntese e manutenção dos tecidos são consideradas altas (THOMPSON & STEWART, 1997). É sabido que ovos de artrópodes mobilizam grandes quantidades de proteínas do vitelo durante o desenvolvimento embrionário. Essas proteínas são consideradas reservas de aminoácidos para a síntese de novas proteínas e fonte energética para suportar o crescimento dos embriões (ABREU et al., 2004; LEAL et al., 2006; LOGULLO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1993). Quando observado o perfil proteico em gel de poliacrilamida, nossos resultados mostraram uma riqueza de bandas com massas moleculares variadas, sendo duas bandas aparentemente majoritárias de 150 e 40 kDa que diminuíram de intensidade durante o desenvolvimento, principalmente no último tempo estudado. Essa diminuição de proteínas foi confirmada pela dosagem das proteínas solúveis, que revelou um intenso catabolismo dessa reserva. Aproximadamente 50% das proteínas solúveis foram consumidas durante as primeiras 12 HAO.

Vários autores têm investigado a dinâmica metabólica durante a embriogênese de outras espécies. Durante o desenvolvimento embrionário dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Hyalomma dromedarii*, os níveis de proteínas totais se mantiveram constantes (CAMPOS et al., 2006; KAMEL; SHALABY; GHAZY, 1982). No coleóptera *Rhynchophorus palmarum* também não foram observadas alterações nos níveis proteicos durante a embriogênese (SANTANA et al., 2014). Por outro lado, em *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria*, foi observado um aumento sutil dos níveis proteicos durante o desenvolvimento embrionário (NEMEC, 2002). De forma semelhante ao observado em nossos resultados, em *Drosophila melanogaster* os níveis proteicos decrescem aproximadamente 40% dos níveis iniciais (MEDINA; LEON; VALLEJO, 1988). Essa redução pode estar relacionada com a degradação dos grânulos de vitelo durante a embriogênese.

Uma das funções da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos (LOGULLO et al., 1998; YAMAMOTO; TAKAHASHI, 1993), que são necessários para a produção de energia ou de novas proteínas que desempenham

funções vitais relacionadas ao metabolismo, estruturas, transporte e armazenamento (CHAPMAN, 2013). Em nossos resultados, foi demonstrado que durante o desenvolvimento embrionário de *C. maculatus* os níveis totais de aminoácidos livres reduziram pela metade nas primeiras 48 HAO, seguido de um aumento até 60 HAO e uma nova redução até 96 HAO. Quando comparados os níveis de proteínas e aminoácidos livres durante as primeiras 48 HAO pôde-se observar um sincronismo nas reduções. Esses resultados sugerem que no início da embriogênese assim que os aminoácidos são disponibilizados já são encaminhados para suas rotas metabólicas, não ficando livres. Quando os aminoácidos foram analisados separadamente foi observado que os níveis de glutamato, alanina, glicina, histidina, tirosina e prolina tiveram seus níveis aumentados, enquanto os níveis de asparagina, glutamina, treonina, serina e lisina diminuíram durante o período de 4-96 HAO. Alguns aminoácidos em insetos são envolvidos em processos de morfogênese, como a tirosina que possui um papel essencial na esclerotização cuticular (AHMED; HOPKINS; KRAMER, 1983). Outros ainda, como o glutamato, originam neurotransmissores (CHAPMAN, 2013) ou como a prolina livre que é considerada fonte de  $\alpha$ -cetoglutarato para o ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração celular (FAHMY et al., 2004).

A vitelina é a principal proteína de reserva presente no vitelo (NORDIN et al., 1990; CECCHETTINI et al., 2001; TUFAIL & TAKEDA, 2008) e durante o desenvolvimento embrionário é degradada por proteases específicas (CECCHETTINI et al., 2001; GIORGI et al. 1997;).

No presente trabalho, foram observados picos de atividade de proteases cisteínicas, serínicas e aspárticas, principalmente nas primeiras 48 horas do desenvolvimento de *C. maculatus*. Participações dessas diferentes classes de proteases na degradação de proteínas do vitelo já forma observadas em uma ampla gama de insetos, como *Drosophila melanogaster*, *Rhodnius prolixus*, *Bombyx mori* e *Acheta domesticus* (BRADLEY & ESTRIDGE 1997; GIORGI et al., 1997; NUSSENZVEIG et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1992), assim como no nematoide *Caenorhabditis elegans* (BRITTON & MURRAY, 2004). Em *C. Elegans*, mutações com perda de função em genes de proteases cisteínicas, essenciais para a degradação de proteínas do vitelo, causaram alterações na degradação e estrutura das proteínas do vitelo, resultando em uma anormal fusão dos grânulos de vitelo (BRITTON & MURRAY, 2004). Resultados semelhantes forma observados em *D. melanogaster* (GRAY et al., 1998).

Tomados em conjunto, nossos resultados apontam que o metabolismo energético dos embriões de *C. maculatus* seja um processo dinâmico que varie com a progressão dos estádios morfológicos e que o sucesso da embriogênese pode estar relacionado, pelo menos em parte, pela degradação das proteínas do vitelo.

## 5- Referências Bibliográficas

ABREU, L. A. et al. **Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 5, p. 443–449, 2004.

AHMED, R. F.; HOPKINS, T. L.; KRAMER, K. J. **Tyrosine and tyrosine glucoside titres in whole animals and tissues during development of the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.).** *Insect Biochemistry*, v. 13, n. 4, p. 369–374, 1983.

BRADLEY J., ESTRIDGE, B. H. **Vitellogenin uptake and vitellin localization in insect follicles examined using monoclonal antibodies and confocal scanning microscopy.** *Invertebrate Reproduction & Development*, v. 32, p. 245–257, 1997.

BRITTON, C., MURRAY, L. **Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*.** *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 5133-143, 2004.

CAMPOS, E. et al. **Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development.** *Veterinary Parasitology*, v. 138, n. 3–4, p. 349–357, 2006.

CECCHETTINI A. et al. **Yolk utilization in stick insects entails the release of vitellin polypeptides into the perivitelline fluid.** *European Journal of Cell Biology*, v.80, p. 458–465, 2001.

CHAPMAN, R. F. **The Insects Structure and Function.** 5<sup>o</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

CRUZ, L. P. et al. **Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation.** Journal of Pest Science, v. 89, n. 1, p. 117–128, 29 mar. 2016.

DE SÁ, L. F. R. et al. **Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** Journal of Insect Physiology, v. 60, n. 1, p. 50–57, 2014.

DEMARTINI, D.R., WLODAWER, A., CARLINI, C.R. **A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants.** Journal of Experimental Botany, v. 58, p. 521–532, 2007.

FAHMY, A. S. et al. **Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) during embryogenesis.** Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, v. 137, n. 2, p. 159–168, fev. 2004.

GIORGI, F. et al. **The vitellin-processing protease of *Blattella germanica* is derived from a pro-protease of maternal origin.** Tissue Cell, v. 29, p. 293–303, 1997.

GRAY, Y. et al. **Structure and associated mutational effects of the cysteine proteinase (CP1) gene of *Drosophila melanogaster*.** Insect Molecular Biology, v. 7, p. 291–293, 1998.

KAMEL, M. Y.; SHALABY, F. Y.; GHAZY, A. E.-H. M. **Biochemical studies of tick embryogenesis DNA, RNA, haemoprotein, guanosine and guanine in developing eggs of *Hyalomma dromedarii*.** Insect Biochemistry, v. 12, n. 1, p. 15–23, 1982.

KARUNGI, J. et al. **Pest management in cowpea. Part 1. Influence of planting time and plant density on cowpea field pests infestation in eastern Uganda.** Crop Protection, v. 19, p. 231–236, 2000.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

- LEAL, A. T. et al. **Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies.** Protein expression and purification, v. 45, n. 1, p. 107–114, jan. 2006.
- LOGULLO, C. et al. **Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*.** Parasitology, v. 116, Pt 6, p. 525–532, jun. 1998.
- MEDINA, M.; LEON, P.; VALLEJO, C. G. ***Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation.** Archives of biochemistry and biophysics, v. 263, n. 2, p. 355–363, 1988.
- MICHAUD, D. et al. **Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber.** Physiologia Plantarum, v. 90, n. 3, p. 497–503, 1994.
- NEMEC, V. **Quantitative changes in protein, glycogen and fat content in the eggs of the locusts, *Locusta migratoria migratorioides* and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), during embryogenesis.** European Journal of Entomology, v. 99, n. 4, p. 557–559, 2002.
- NORDIN, J.H., BEAUDOIN, E.L., LIU, X. **Proteolytic processing of *Blattella germânica* vitellin during early embryo development.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 15, p. 119–135, 1990.
- NUSSENZVEIG, R., OLIVEIRA, P., MASUDA, H. **Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 2, p. 253–262, 1992.
- SANTANA, C. C. et al. **Embryonic development of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae): dynamics of energy source utilization.** Journal of insect science (Online), v. 14, 2014.
- SMITH, P. K. et al. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** Analytical biochemistry, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.
- SOUZA, A. J. et al. **Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae.** Crop Protection, v. 30, n. 6, p. 651–657, jun. 2011.
- TAKAHASHI, S. Y. et al. **Acid cysteine proteinase from the eggs of silkworm , *Bombyx mori*: tissue distribution, developmental changes and the sites of synthesis for the enzyme.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 22, p.369-

377, 1992

TAKAHASHI, S. Y. et al. **Cysteine proteinase from the eggs of the silkmoth, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro.** Journal of Biochemistry, v. 114, p. 267–272, 1993.

THOMPSON, M. B.; STEWART, J. R. **Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 118, n. 3, p. 647–654, 1997.

TUFAIL, M., TAKEDA, M. **Molecular characteristics of insect vitellogenins.** Journal of Insect Physiology, v. 54, p. 1447–1458, 2008.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, S. Y. **Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis.** Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, v. 106, n. 1, p. 35–45, set. 1993.