

CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS

FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO EM  
*Erinnyis ello* (LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE).

Tese de Doutorado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica do Instituto  
de Química da Universidade de São Paulo

SÃO PAULO

1985

CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS

FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO EM  
*Erinnyis ello* (LEPIDOPTERA: SPHINGIDAE).

Tese de Doutorado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica do Instituto  
de Química da Universidade de São Paulo

SÃO PAULO  
1985

A meus pais e irmão

OFEREÇO

A minha esposa Angela

A minha filha Gisele

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Walter Ribeiro Terra pela orientação e estímulo durante a realização desta tese.

Ao professor Dr. Alberto de Freitas Ribeiro do Instituto de Biociências pela realização da parte morfológica desta tese.

Ao professor César Freire Carvalho do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras pelo auxílio na escolha do inseto que foi o objeto de estudo desta tese.

Aos professores do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura de Lavras, que desdobraram-se em suas atividades possibilitando assim a realização deste trabalho.

A Clélia Ferreira pela contribuição em parte desse trabalho, pela leitura do manuscrito e pela amizade.

Aos companheiros de laboratório Fernando Espinoza e Osvaldo Marinotti pelas sugestões na realização da parte imunológica desta tese e pela amizade.

Aos companheiros de laboratório Agnaldo Valentin, Antonio G. de Bianchi e Sirley D. Pereira, pela amizade.

A Ana Maria Rocha, Luiza Y. Nakabayashi e ao Sr. João Rocha pela auxílio técnico prestado e pela amizade.

Aos membros do Instituto de Biociências Márcio V. Cruz, Waldir Caldeira e J.A. Bilotta pelo excelente trabalho técnico prestado.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela oportunidade concedida para a realização do curso de pós-graduação.

À CAPES, através do PICD, e ao CNPq, pelas bolsas de estudo concedidas.

Durante a elaboração desta tese, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, FINEP e CNPq.

## ÍNDICE

|  | Pág. |
|--|------|
| Abreviaturas .....   | 1    |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 3    |
| 1.1. O processo digestivo .....  | 3    |
| 1.2. Hidrolases envolvidas na digestão em insetos .....  | 5    |
| 1.3. Digestão em larvas de <i>Rhynchosciara americana</i> .....  | 11   |
| 1.4. Digestão em insetos distintos de <i>Rhynchosciara americana</i> .....   | 16   |
| 1.5. Objetivos desta tese .....  | 24   |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 26   |
| 2.1. Materiais .....   | 26   |
| 2.2. Animais .....   | 26   |
| 2.3. Digestibilidade e utilização do alimento pelas larvas .....   | 27   |
| 2.4. Tempo de tráfego do bolo alimentar .....  | 27   |
| 2.5. Preparação de amostras do ventrículo, seções do ventrículo, folhas e fezes .....  | 28   |
| 2.6. Obtenção do material regurgitado e fluido ectoperitrofico .....   | 29   |
| 2.7. pH dos conteúdos do intestino .....   | 30   |
| 2.8. Microscopia óptica e eletrônica .....   | 30   |
| 2.9. Preparação de microvilosidades por precipitação diferencial com cálcio .....  | 31   |
| 2.10. Preparação de membranas de microvilosidades das células do epitélio ventricular das larvas de <i>E. ello</i> ..            | 32   |
| 2.11. Preparação de microvilosidades por sonicação do epitélio ventricular anterior e posterior da larva de <i>E. ello</i> ..... | 33   |

|   | Pág. |
|---|------|
| 2.12. Centrifugação diferencial de homogeneizados das regiões anterior e posterior e do epitélio do ventrículo total da larva de <i>E. ello</i> ..... | 33   |
| 2.13. Preparação de microvilosidades de células ventriculares e sua solubilização por Triton X-100 .....  | 34   |
| 2.14. Solubilização de enzimas de membrana por papaína ...  | 35   |
| 2.15. Solubilização de enzimas de membranas por pH alcalino .....   | 36   |
| 2.16. Eletroforese e determinação de atividades enzimáticas em géis de poliacrilamida .....   | 36   |
| 2.17. Determinação do peso molecular em géis de poliacrilamida .....  | 37   |
| 2.18. Determinação do peso molecular por centrifugação em gradiente de densidade .....  | 38   |
| 2.19. Eletrofocalização e determinação de atividades enzimáticas em géis .....  | 38   |
| 2.20. Determinação de atividades enzimáticas e de proteínas .....   | 39   |
| 2.21. Inibição da hidrólise de celobiose por ONP $\beta$ Gal e inibição da hidrólise de ONP $\beta$ Gal por celobiose .....                           | 44   |
| 2.22. Identificação da configuração do carbono anomérico da glicose liberada pela celobiase .....   | 44   |
| 2.23. Determinação do Km e Ki das hidrolases .....  | 45   |
| 2.24. Purificação da amilase e da maltase .....   | 46   |
| 2.25. Preparação de anticorpos contra a amilase solúvel da larva de <i>E. ello</i> .....  | 47   |
| 2.26. Imunodifusão e imunoeletroforese .....  | 48   |
| 3. RESULTADOS .....   | 49   |
| 3.1. Organização espacial do processo digestivo em larvas de <i>E. ello</i> .....   | 49   |

|  | Pág. |
|--|------|
| 3.1.1. Consumo do alimento e tempo de tráfego do bo <u>l</u> o alimentar .....   | 49   |
| 3.1.2. pH do conteúdo luminal do tubo digestivo ...  | 49   |
| 3.1.3. Distribuição das hidrolases entre as regiões do tubo digestivo da larva de <i>E. ello</i> .....                             | 50   |
| 3.1.4. Excreção das enzimas digestivas .....   | 57   |
| 3.1.5. Injeção de corante na hemolinfa e no tubo di <u>g</u> estivo de <i>E. ello</i> .....  | 58   |
| 3.1.6. Microscopia óptica e eletrônica .....   | 59   |
| 3.1.6.1. Histologia do ventrículo .....  | 59   |
| 3.1.6.2. Ultraestrutura das células da regi <u>õ</u> anterior e média do ventrículo  | 59   |
| 3.1.6.3. Ultraestrutura das células da regi <u>õ</u> posterior do ventrículo .....   | 62   |
| 3.1.7. Centrifugação diferencial de homogeneizados de células do ventrículo de <i>E. ello</i> .....                                | 66   |
| 3.1.7.1. Marcadores enzimáticos de frações subcelulares .....  | 66   |
| 3.1.8. Atividades enzimáticas nas diferentes regi <u>õ</u> es do ventrículo da larva de <i>E. ello</i> .....                       | 70   |
| 3.1.9. Centrifugação diferencial de homogeneizados das células do ventrículo anterior e posteri <u>o</u> r de <i>E. ello</i> ..... | 71   |
| 3.1.10. Preparação de microvilosidades por precipita <u>ç</u> ão diferencial com cálcio .....                                      | 78   |
| 3.1.11. Preparação de microvilosidades por sonicação   | 84   |
| 3.1.12. Atividade de hidrolases e ultraestrutura das vesículas presentes no fluido ectoperitrófico                                 | 87   |
| 3.2. Caracterização das enzimas digestivas da larva de <i>E. ello</i> .....  | 87   |

|   | Pág. |
|---|------|
| 3.2.1. Propriedades da aminopeptidase ligada a membrana .....   | 89   |
| 3.2.2. Propriedades da tripsina solúvel e da tripsina associada a membrana .....  | 92   |
| 3.2.3. Propriedades da carboxipeptidase solúvel e da carboxipeptidase associada a membrana ...                                    | 93   |
| 3.2.4. Propriedades da amilase solúvel e da amilase associada a membrana .....  | 93   |
| 3.2.5. Propriedades da $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, $\alpha$ -galactosidase e trealase ventriculares de <i>E. ello</i> ..... | 99   |
| 3.2.6. Propriedades da maltase ventricular da larva de <i>E. ello</i> .....   | 103  |
| 3.2.7. Propriedades da $\beta$ -frutosidase ventricular da larva de <i>E. ello</i> .....  | 109  |
| 3.2.8. Propriedades da celobiase ventricular da larva de <i>E. ello</i> .....   | 109  |
| 3.2.8.1. Peso molecular e pI da celobiase .   | 109  |
| 3.2.8.2. Efeito da temperatura sobre a celobiase .....  | 111  |
| 3.2.8.3. Especificidade de substrato da celobiase .....   | 111  |
| 3.2.8.4. Inibição da celobiase por Tris e lactonas .....  | 117  |
| 3.2.8.5. Inativação térmica da celobiase ..   | 118  |
| 3.2.8.6. Configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase e o parâmetro $\rho$ .....                                   | 118  |

|   | Pág. |
|---|------|
| 4. DISCUSSÃO .....  | 122  |
| 4.1. O cenário da ação digestiva nas larvas de <i>E. ello</i> ..  | 122  |
| 4.2. A natureza dos agentes da digestão nas larvas de <i>E. ello</i> .....                                | 125  |
| 4.3. A distribuição das enzimas nas diferentes regiões do tubo digestivo da larva de <i>E. ello</i> ..... | 131  |
| 4.4. Digestão e secreção de enzimas digestivas nas larvas de <i>E. ello</i> .....                         | 143  |
| 5. RESUMO .....   | 151  |
| 6. ABSTRACT .....   | 154  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 157  |

## ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| pAP $\beta$ Gal,  | p-aminofenil- $\beta$ -D-galactosídeo               |
| pAP $\beta$ Gli,  | p-aminofenil- $\beta$ -D-glicosídeo                 |
| BAPA,             | $\alpha$ -N-Benzoil-DL-Arginina p-nitroanilida      |
| cf.,              | confrontar com                                      |
| CMC,              | carboximetil celulose                               |
| EDTA,             | etilenodiaminotetracetato de sódio                  |
| G-6-P,            | glicose-6-fosfato                                   |
| INT,              | violeta de p-iodonitrotetrazolium                   |
| LPNA,             | L-leucina p-nitroanilida                            |
| MOPS,             | ácido morfolinopropano sulfônico                    |
| Mr,               | peso molecular relativo                             |
| NAD,              | $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo         |
| NADP,             | $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| pNP $\beta$ Fuc,  | p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucosídeo                  |
| pNP $\alpha$ Gal, | p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo              |
| oNP $\beta$ Gal,  | o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo               |
| pNP $\beta$ Gal,  | p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo               |
| oNP $\beta$ Gli,  | o-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo                 |
| pNP $\alpha$ Gli, | p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo                |
| pNP $\beta$ Gli,  | p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo                 |
| pNPNAG,           | p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo    |
| NPP,              | p-nitrofenil fosfato                                |
| pNPT $\beta$ Gli, | p-nitrofenil-1 Tio- $\beta$ -D-glicosídeo           |
| pNP $\beta$ Xil,  | p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilosídeo                  |
| P $\beta$ Gal,    | fenil- $\beta$ -D-galactosídeo                      |
| P $\beta$ Gli,    | fenil- $\beta$ -D-glicosídeo                        |
| PHMB,             | p-hidroximercúrio benzoato                          |
| PMS,              | fenazina metasulfato                                |
| p/v,              | peso por volume                                     |

rpm, rotações por minuto  
SDS, dodecil sulfato de sódio  
TCA, ácido tricloroacético  
Tris, tris-(hidroximetil) aminometano  
v/v, volume por volume  
Z-Gly-Leu carbobenzoxiglicil-L-leucina  
Z-Gly-Phe carbobenzoxiglicil-L-fenilalanina  
Z-Val-Leu carbobenzoxivalil-L-leucina

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O processo digestivo

Digestão é a sequência de modificações que o alimento ingerido sofre até ser transformado em moléculas mais simples que podem ser utilizadas pelo organismo.

A digestão entre os animais superiores ocorre usualmente em alguma cavidade do corpo sob a ação de enzimas secretadas (digestão luminal ou cavital), e/ou sob a ação de enzimas ligadas à membrana das células que recobrem a superfície luminal do órgão onde se verifica a digestão (digestão em membrana).

A digestão dos polímeros, tais como polissacarídeos e proteínas, que correspondem a maior massa do alimento usualmente consumido pelos animais pode ser dividida em três fases distintas: digestão primária, digestão intermediária e digestão final. A digestão primária consiste no ataque às ligações internas dos polímeros por enzimas normalmente secretadas resultando em oligômeros. Na digestão intermediária os oligômeros resultantes da digestão primária são hidrolisados até oligômeros de menor peso molecular pelas mesmas enzimas responsáveis pela digestão primária e/ou por enzimas diferentes, geralmente também secretadas. Na digestão final os oligômeros resultantes (mais frequentemente dímeros e trímeros) são hidrolisados até monômeros que podem ser absorvidos e utilizados no metabolismo celular.

As enzimas hidrolíticas envolvidas na digestão primária e intermediária são usualmente secretadas por células presentes na parede do trato digestivo ou por glândulas, como o hepatopâncreas dos crustáceos e moluscos e o pâncreas dos vertebrados. A saliva em alguns animais tem a função de apenas lubrificar o alimento, enquanto

que em outros ela contém enzimas importantes na digestão.

Um tipo interessante de digestão primária e intermediária é a digestão extra-intestinal (ou extra-corpórea). Nesse caso, exemplificado por alguns insetos carnívoros, o animal injeta enzimas em sua presa, que é completamente histolisada antes de seus fluidos serem sugados (CHAPMAN, 1982).

A digestão final é mal conhecida na maioria dos animais. Entre os mamíferos, a digestão final é realizada por enzimas hidrolíticas presentes na membrana plasmática que recobre as microvilosidades das células intestinais (KENNY & BOOTH, 1978). Em vista disso, tem sido proposto que na maioria dos organismos a digestão final seja realizada em membranas celulares (UGOLEV & DE LAEY, 1973), embora sejam necessários muito mais estudos para assegurar a generalidade dessa proposição. Nessas membranas encontram-se também carregadores envolvidos na absorção. Parece haver uma associação entre esses carregadores e as enzimas hidrolíticas, pois observa-se que a absorção de açúcares recém clivados é mais rápida que se os mesmos produtos forem adicionados no lúmen intestinal (BARNARD, 1973).

O processo digestivo dos insetos tem sido estudado há cerca de um século, embora permaneçam numerosas lacunas nesse conhecimento (revisões em DADD, 1970; HOUSE, 1974b; CHAPMAN, 1982; ANDRIES, 1982, 1983, 1984; WOLFERSBERGER, 1984). Isso resulta do fato de poucas enzimas digestivas de insetos terem sido estudadas detalhadamente quanto a seus parâmetros físico-químicos e cinéticos e da existência de raros trabalhos sobre a distribuição dessas enzimas no canal alimentar.

Dessa forma, pouco se sabe sobre a organização espacial do processo digestivo, isto é, sobre a sequência de eventos pelos quais o alimento passa nas diferentes regiões do tubo digestivo do

inseto, desde a sua ingestão até a sua absorção. O avanço dos conhecimentos nessa área tem sido prejudicado principalmente pela dificuldade de se coletar amostras de enzimas de diferentes sítios do tubo digestivo dos insetos e, também, pelo não estabelecimento pelos diferentes autores de critérios adequados para distinguir enzimas secretadas daquelas presentes nos espaços luminiais devido a des~~ca~~mação e/ou rompimento celular durante a dissecção.

## 1.2. Hidrolases envolvidas na digestão em insetos

O alimento consumido pelos insetos, assim como pelos demais animais, é composto primordialmente por carboidratos, proteínas e lipídeos. Esses alimentos para serem utilizados pelos insetos necessitam primeiramente serem hidrolisados até moléculas absorvíveis e, esse trabalho, é realizado pelas enzimas presentes no tubo digestivo.

As enzimas envolvidas na digestão de lipídeos por insetos foram revistas por TURUNEN (1979) e não mais serão comentadas aqui.

As proteínas digestivas de insetos descritas até o presente, são do tipo serina proteinase, sulfidril proteinase ou metalo-proteinase. Poucas dessas enzimas, entretanto, foram purificadas até a homogeneidade. As sulfidrilproteinases foram descritas e purificadas de *Rhodnius prolixus* (GARCIA et al., 1978) e as metaloproteinases, de *Tineola bisselliella* (WARD, 1975a, b). As serina proteinases são as principais proteinases encontradas nos insetos, sendo ativas em pHs alcalinos ou neutros, com especificidade similares àquelas da tripsina ou quimotripsina de mamíferos (revisão em LAW et al., 1977). Entre as serina proteinases descritas e purificadas até a homogeneidade encontram-se a quimotripsina de *Vespa orientalis* (JANY et al., 1974) e a tripsina de *Manduca sexta*. Esta última a -

presenta um peso molecular de 24.000, possui uma serina e uma histidina no sítio ativo e cliva ligações peptídicas contendo lisina e arginina (MILLER et al., 1974). Em *Bombyx mori* foram encontradas duas proteinases, uma semelhante a tripsina, com Km para L-BAPA de 2,8 mM, e outra que provavelmente é uma quimotripsina. Essas duas enzimas possuem pesos moleculares de 23.000 e atividade máxima em pH alcalino (pH 10) (SASAKI & SUSUKI, 1982). A tripsina de *Bombyx mori* ocorre predominantemente ligada a membranas e é bioquímica e imunologicamente idêntica àquela encontrada no fluido digestivo (regurgitado das larvas) (EGUCHI & IWAMOTO, 1982; EGUCHI et al., 1982; EGUCHI & ARAI, 1983).

As aminopeptidases digestivas de insetos tem sido pouco estudadas (LAW et al., 1977). Os estudos mais completos foram realizados em *Tineola bisselliella* e em *Rhynchosciara americana*. Em *T. bisselliella* foram encontradas 16 aminopeptidases solúveis, das quais 9 foram caracterizadas (WARD, 1975c, d, e). Essas aminopeptidases são capazes de hidrolisar di, tri e oligopeptídeos sequencialmente a partir da extremidade N-terminal, possuem pequena especificidade e foram consideradas em dois grupos de acordo com a sua migração eletroforética. As principais diferenças entre os dois tipos é o peso molecular (240.000 para as aminopeptidases de migração menor e 94.000 para as de migração maior) e a capacidade de hidrolisar ligações envolvendo prolina, característica das aminopeptidases de migração maior (WARD, 1975d, e). As aminopeptidases de *R. americana* ocorrem na forma solúvel e ligadas a membrana das microvilosidades. A forma solúvel possui um peso molecular de 120.000, ampla especificidade em relação ao resíduo N-terminal e hidrolisa tetrapeptídeos mais eficientemente do que os tripeptídeos e quase não tem atividade sobre dipeptídeos (FERREIRA & TERRA, 1982a, 1984). Ocorrem duas aminopeptidases ligadas a membrana em *R. americana* e, assim como a solúvel, as enzimas de membrana apresentam ampla especifici-

dade em relação ao resíduo N-terminal.

A aminopeptidase majoritária ataca preferencialmente tripeptídeos em relação aos tetrapeptídeos, enquanto que a minoritária tem uma preferência reversa (FERREIRA & TERRA, 1985 e informação pessoal). Outras aminopeptidases solúveis purificadas e parcialmente caracterizadas foram as de *Glossina morsitans* (GOODING & ROLSETH, 1976) e de *Attagenus megatoma* (BAKER & WOO, 1981).

As carboxipeptidases digestivas foram melhor estudadas nas frações solúveis das células intestinais de *Tineola bisselliella* e *Attagenus megatoma*. Em *T. bisselliella* foram encontradas duas carboxipeptidases sulfidrílicas das quais uma delas foi purificada e caracterizada, apresentando um ótimo de pH entre 7,5 e 7,7, peso molecular de 72.000 e preferência para Z-Gly-Leu (WARD, 1976), enquanto que em *A. megatoma* encontrou-se também duas carboxipeptidases com ótimo de pH entre 7,5 e 8,5, peso molecular de 35.000, sendo uma semelhante à carboxipeptidase A e outra com preferência para Z-Val-Leu (BAKER, 1981).

As amilases encontradas nos insetos são do tipo  $\alpha$ -amilase (revisão em DADD, 1970). Algumas amilases foram purificadas até a homogeneidade: a amilase de *Callosobruchus chinensis* (PODOLER & APPLEBAUM, 1971), a amilase de *Tenebrio molitor* (BUONOCORE et al., 1976) e a amilase de *B. mori* (KANEKATSU, 1978). A amilase de *B. mori* (Mr 57.000) possui cálcio em sua molécula e, quando este é removido por diálise contra EDTA, a enzima tem a sua estabilidade diminuída, embora não haja uma grande diminuição na sua atividade. O padrão de ação dessa enzima varia de acordo com o pH em que é ensaiada. A pH 9,2 possui um grau de ataque múltiplo similar ao da  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae*, que é 1,7 (KUNG et al., 1953), enquanto que a pH 9,2 possui um grau de ataque múltiplo maior que o da  $\alpha$ -amilase de pâncreas de porco, que é 6,0 (ROBYT & FRENCH, 1967). O

padrão de ação da amilase de *R. americana* é do tipo  $\alpha$ -amilase, com grau de ataque múltiplo entre 1,6 e 6,0 (TERRA et al., 1977), o mesmo ocorrendo com a do Coleoptera *Sitophilus zeamais* (BAKER, 1983).

As celulasas ocorrem como secreções próprias dos tubos digestivos (ou de seus anexos) em várias ordens de insetos: Coleoptera (WIGGLESWORTH, 1972), Thysanura (LASKER & GIESE, 1956), Dictyoptera (WHARTON et al., 1965), Orthoptera (MORGAN, 1976), Diptera (TERRA et al., 1979). Entretanto, até o presente, nenhuma caracterização das celulasas foi tentada em insetos. Deve-se acrescentar que a maioria dos relatos de ocorrência de celulase em insetos referem-se, na verdade, a celulasas presentes no alimento ingerido pelos insetos ou a produtos de simbioses (MARTIN, 1983).

As glicosidades encontradas no tubo digestivo de insetos são:  $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidases,  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidases, trealases,  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases e raramente  $\beta$ -frutosidases (DADD, 1970; CHIPPENDALE, 1978). Com exceção das trealases (que serão comentadas mais abaixo), a maioria das glicosidases foram estudadas somente de maneira superficial.

As sacarases de insetos estudadas em detalhes foram, com uma única exceção, apenas as obtidas de animais inteiros. Assim, MARZLUF (1969) mostrou a existência em *Drosophila melanogaster* de sacarases ligadas a membrana e solúveis, sendo que estas últimas ocorrem como uma família de isoenzimas. Mais tarde HUBER & LEFEBVRE (1971) purificaram uma das sacarases solúveis de *D. melanogaster* e mostraram que ela tinha um peso molecular de cerca de 100.000 e era fortemente inibida por PIMB e Tris. Mais recentemente duas sacarases solúveis de *Apis mellifera* foram purificadas até a homogeneidade e caracterizadas física e cineticamente (HUBER & THOMPSON, 1973; HUBER, 1975; HUBER & MATHISON, 1976). Ambas as sacarases solúveis de *A. mellifera* são  $\alpha$ -glicosidases inespecíficas, pouco sensíveis a

reagentes sulfidrilas, apresentando atividade de transglicosilação e como ocorrem principalmente no abdômen de *A. mellifera* (HUBER, 1975; HUBER & MATHISON, 1976), é razoável supor que elas se encontrem no tubo digestivo. *Periplaneta americana* é o único inseto que teve a sua sacarase parcialmente purificada a partir de tubos digestivos isolados. A enzima é solúvel e corresponde a uma  $\alpha$ -glicosidase inespecífica, embora a preparação pareça estar contaminada por outras glicosidases (KATAGIRI, 1979).

Muito poucas  $\beta$ -glicosidases (revisão em MORGAN, 1975a) e  $\beta$ -galactosidases (revisão em MORGAN, 1975b) de insetos em geral, e de seu tubo digestivo em particular, foram caracterizadas. Os estudos mais completos dessas enzimas em tubos digestivos de insetos foram realizados em *L. migratoria* e *R. americana*. No primeiro inseto, MORGAN (1975c) usando filtração em gel, desnaturação térmica e focalização isoelétrica mostrou que apenas uma espécie molecular (Mr 110.000) é responsável pela hidrólise de celobiose e lactose, enquanto que as atividades de aril- $\beta$ -glicosidases e aril- $\beta$ -galactosidases são distintas entre si e da enzima que cliva celobiose e lactose. Todas as enzimas referidas são solúveis. Em *R. americana* a  $\beta$ -glicosidase é ligada à membrana das microvilosidades (FERREIRA & TERRA, 1980, 1982b) e cliva  $\beta$ -glicosídeos,  $\beta$ -galactosídeos e  $\beta$ -fucosídeos em um mesmo sítio ativo (FERREIRA & TERRA, 1983). A  $\beta$ -glicosidase solubilizada por Triton X-100 possui um peso molecular de 106.000 e um peso molecular de 65.000 quando solubilizada por tratamento com papaína. Essa enzima opera segundo uma cinética de equilíbrio rápido e a hidrólise da ligação glicosídica ocorre sem inversão da configuração, envolvendo a formação de um íon carbônio intermediário (FERREIRA & TERRA, 1983).

A trealase é uma das carboidrases de insetos com distribuição mais ampla, ocorrendo principalmente no intestino médio, mús

culo do vôo, corpo gorduroso e glândulas labiais (WYATT, 1967). Algumas trealases solúveis foram descritas e purificadas a partir de insetos inteiros (KALF & RIEDER, 1958; FRIEDMAN, 1960; DERR & RANDALL, 1966; GUILLOUX et al., 1968; HUBER & LEFEBVRE, 1971; GIEBEL & DOMNAS, 1976) e a partir de seu tubo digestivo (TERRA et al., 1978). Entre os Lepidoptera, essa enzima foi purificada a partir de larvas e pupas inteiras de *B. mori* (SAITO, 1960; SUMIDA & YAMASHITA, 1977) e de larvas inteiras de *Manduca sexta* (DAHLMAN, 1971). Nas larvas de *B. mori* foram encontradas uma trealase solúvel com peso molecular 134.000 e km 0,3 mM e uma trealase ligada a membranas com peso molecular 67.000 e km 1 mM. A trealase de *M. sexta* descrita apresenta um peso molecular de 250.000 e km de 0,6 mM. Essas trealases possuem um ótimo de pH em torno de 6.0.

A atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase tem sido determinada nas várias partes dos insetos como corpo gorduroso, intestino, fluido da muda, hemolinfa e tubos de Malpighi (POWNING & IRZYKIEWICZ, 1964; KIMURA, 1977). Entretanto, as únicas  $\beta$ -N-acetilglicosaminidasas de insetos purificadas até a homogeneidade e caracterizadas são aquelas encontradas na hemolinfa de larvas e pupas e no fluido da muda, como por exemplo, em *B. mori* (KIMURA, 1976, 1977) e em *M. sexta* (DZIADIK-TURNER et al., 1981; KOGA et al., 1982). A  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase do fluido da muda de *M. sexta* possui um peso molecular entre 60.000 e 70.000, km para pNPNAG de 0,18 mM e 2 grupos no sítio ativo com pKs de 3,8 e 8,1, enquanto que a  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase da hemolinfa da larva é um dímero com subunidades de 14.000 e 47.000 de peso molecular e km para pNPNAG de 0,16 mM. A  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase da hemolinfa da larva de *B. mori* é um dímero com subunidades de 61.000 de peso molecular e km para pNPNAG de 3,6 mM. A  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase encontrada no fluido da muda é diferente daquela encontrada na hemolinfa das larvas, a julgar pelos estudos imunológicos e bioquímicos realizados. A enzima do fluido da

muda cliva bem oligossacarídeos com 6 resíduos e deve ser, portanto, uma exoquitinase cuja função parece estar ligada ao catabolismo de quitina. Por outro lado, a enzima da hemolinfa das larvas é muito pouco ativa sobre oligossacarídeos e sua função é ainda desconhecida. As  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases de intestino médio foram estudadas em *P. americana* (Km para quitobiose igual a 0,3 mM) (POWNING & IRZYKIEWICZ, 1964) e em *R. americana* (TERRA & FERREIRA, 1983), onde ela cliva pPNAG e pPNAGAL com kms de 0,56 e 2,4 mM respectivamente e apresenta um peso molecular de 141.000. A função da  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase no intestino médio de *R. americana* parece ser a de hidrolisar as cadeias de carboidratos associados às glicoproteínas da dieta (TERRA & FERREIRA, 1983).

### 1.3. Digestão em larvas de *Rhynchosciara americana*

Antes de comentarmos a organização do processo digestivo nas larvas de *R. americana*, que é o inseto melhor estudado em relação a este assunto, descreveremos sumariamente a anatomia dos tubos digestivos dos insetos. O tubo digestivo dos insetos é um tubo de comprimento e grau de complexidade variáveis conforme o grupo taxonômico e a fase de desenvolvimento do inseto. O tubo digestivo dos insetos é dividido em três regiões: anterior, média e posterior. A região anterior (intestino anterior) é formada pela cavidade bucal, faringe e esôfago, terminando na válvula cardíaca. Essa região é geralmente revestida por uma cutícula impermeável, não tendo portanto, função digestiva. Suas funções principais são condução e armazenamento do alimento. A região posterior (intestino posterior), que inicia-se na abertura dos tubos de Malpighi e termina no ânus, é também geralmente revestida por uma cutícula impermeável, sendo suas funções principais a absorção de íons e água e a formação das fezes. A região média (intestino médio), localizada entre o intes-

tino anterior e o intestino posterior, tem normalmente a forma de um cilindro alongado de diâmetro aproximadamente uniforme e pode ou não apresentar cecos gástricos os quais, quando presentes, possuem forma, tamanho e localização variada (Figuras 1 e 2). Quando os cecos estão ausentes, o intestino médio é também denominado de ventrículo. O intestino médio não apresenta revestimento por cutícula, sendo de regra o órgão responsável pela digestão (secreção das enzimas digestivas e absorção dos produtos da digestão). No intestino médio, o alimento é normalmente separado do epitélio ventricular por uma membrana tubular que envolve o alimento, denominada membrana peritrófica, e que pode estar ausente em alguns insetos. Quando a membrana peritrófica está presente, ela delimita dois compartimentos luminais distintos: o espaço endoperitrófico, que corresponde à região interior à membrana peritrófica, e o espaço ectoperitrófico, que é formado pela região entre as células do ventrículo e a membrana peritrófica e pelo lúmen dos cecos gástricos, quando estes estão presentes (Figura 1).

O intestino médio é o órgão responsável pela digestão nas larvas de *R. americana*, apresentando mais de 97% das atividades enzimáticas encontradas no tubo digestivo inteiro. As atividades encontradas no intestino anterior, intestino posterior e glândulas salivares são provavelmente contaminações de enzimas originadas do intestino médio. Nessa região do canal alimentar, as enzimas foram ensaiadas em preparações obtidas do epitélio ventricular, conteúdo da membrana peritrófica e fluido ectoperitrófico. As atividades específicas das despolimerases (amilase, celulase e tripsina) encontradas nas preparações de fluido ectoperitrófico e de conteúdo da membrana peritrófica foram maiores que as atividades específicas encontradas nas células do epitélio ventricular, sugerindo que essas enzimas são secretadas para o lúmen do intestino, penetrando a seguir no interior da membrana peritrófica. Se as atividades dessas

enzimas no fluido ectoperitrófico e conteúdo da membrana peritrófica fossem devido a descamação e/ou rompimento celular durante a dissecção, suas atividades específicas deveriam ser iguais ou inferiores às atividades específicas medidas nas células. Isso se explica pelo fato de que as proteínas celulares (incluindo as próprias enzimas) seriam diluídas pelas proteínas previamente presentes no fluido ectoperitrófico e no interior da membrana peritrófica (TERRA et al., 1979).

A trealase, aminopeptidase e a  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase devem ser secretadas para o espaço ectoperitrófico, baseando em raciocínio similar ao exposto em relação às despolimerases. Entretanto, a atividade específica dessas enzimas no conteúdo da membrana peritrófica é inferior à atividade específica dessas mesmas enzimas nas células do epitélio ventricular e cecos gástricos, sugerindo que elas não devem penetrar no interior da membrana peritrófica (TERRA et al., 1979; FERREIRA & TERRA, 1983).

Celobiase, maltase,  $\alpha$  e  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -manosidase,  $\beta$ -fucosidase, glicilglicina dipeptidase, carboxipeptidase, esterase, fosfatase ácida e fosfatase alcalina são restritas as células. Sua ocorrência no fluido ectoperitrófico e no conteúdo da membrana peritrófica pode ser explicado pela descamação e/ou rompimento celular durante a dissecção (TERRA et al., 1979; TERRA & FERREIRA, 1983).

As enzimas que atravessam a membrana peritrófica (amilase, celulase e tripsina) (TERRA et al., 1979) apresentam diâmetros moleculares menores do que 7 nm (TERRA & FERREIRA, 1983), enquanto que as enzimas que são restritas ao fluido ectoperetrófico (trealse e aminopeptidase, cf TERRA et al., 1979;  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, cf TERRA & FERREIRA, 1983) possuem diâmetros moleculares superiores a 8 nm (TERRA & FERREIRA, 1983). Assim, as enzimas envolvidas na digestão intermediária dos alimentos devem ser impedidas de alcan-

çar o espaço endoperitrófico por serem incapazes de atravessar os poros da membrana peritrófica. Os poros da membrana peritrófica de *R. americana* devem ter, portanto, um diâmetro entre 7 e 8 nm.

Através do uso de centrifugação diferencial de homogeneizados preparados em diferentes condições, assim como, do uso de precipitação diferencial de membranas com cálcio, FERREIRA & TERRA (1980) foram capazes de mostrar que a fosfatase alcalina está ligada à membrana plasmática das microvilosidades celulares.

Celobiase,  $\beta$ -fucosidase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\alpha$ -mannosidase apresentam uma distribuição semelhante à da fosfatase alcalina, embora apresentando uma pequena atividade na fração solúvel. Além disso, essas enzimas apresentam, como a fosfatase alcalina, uma atividade específica maior nas microvilosidades das células dos cecos gástricos do que no homogeneizado inicial, sugerindo que elas ocorrem majoritariamente na membrana plasmática das microvilosidades (FERREIRA & TERRA, 1980). A maltase solúvel ocorre principalmente entre as frações de partículas pequenas que se sedimentam de forma semelhante aos lisossomos de vários organismos (PITT, 1975). Como a atividade específica da maltase é maior nas microvilosidades purificadas das células dos cecos gástricos do que no homogeneizado inicial, os dados favorecem a hipótese que ela ocorra também ligada à membrana plasmática das microvilosidades (FERREIRA & TERRA, 1980).

Os resultados obtidos com  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, aminopeptidase, dipeptidase e carboxipeptidase sugerem que elas ocorrem ligadas à membrana plasmática e no citossol (FERREIRA & TERRA, 1980; TERRA & FERREIRA, 1983). Trealase ocorre predominantemente na fração solúvel, o que significa que ela é típica de citossol (FERREIRA & TERRA, 1980).

Aminopectidase, carboxipeptidase, celobiase e maltase a -

presentam atividades específicas semelhantes nas microvilosidades preparadas a partir das células dos cecos gástricos e do ventrículo posterior, embora a atividade dessas hidrolases sejam maiores nas microvilosidades dos cecos gástricos. Por outro lado, as atividades específicas daquelas enzimas nas microvilosidades das células do ventrículo anterior são muito inferiores. Isso levou FERREIRA & TERRA (1982b) a concluir que a digestão final em *R. americana* deve ocorrer majoritariamente ao nível das microvilosidades das células dos cecos gástricos e em menor quantidade ao nível das microvilosidades das células do ventrículo posterior. O ventrículo anterior provavelmente não deve estar associado à digestão final.

A velocidade de excreção das enzimas que penetram no interior da membrana peritrófica de *R. americana* são muito baixas, sugerindo a existência de algum mecanismo pelo qual essas enzimas são recuperadas do alimento não digerido, antes de serem excretadas (TERRA & FERREIRA, 1981). Esses e outros dados levaram à proposição da existência de uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (TERRA & FERREIRA, 1981) (Figura 1). De acordo com este modelo, o alimento e as despolimerases são conduzidas para a região posterior do ventrículo no interior da membrana peritrófica, enquanto que no espaço ectoperitrófico haveria um fluxo de água da região posterior do ventrículo em direção aos cecos. Isso resultaria numa recuperação gradual das enzimas presentes no interior da membrana peritrófica à medida que as moléculas poliméricas que elas hidrolisam se tornassem pequenas o suficiente para acompanhá-las através da membrana peritrófica e, a seguir, para os cecos (TERRA & FERREIRA, 1981).

A análise da ultraestrutura do intestino médio da larva de *R. americana* mostrou que as células dos cecos e do ventrículo posterior possuem características de células absorptivas de água e aque

las do ventrículo anterior, secretoras (FERREIRA et al., 1981). Isso permitiria a existência de um fluxo de fluidos do ventrículo anterior para os cecos gástricos e ventrículo posterior. Como a superfície absorptiva de fluidos dos cecos gástricos é maior que a do ventrículo posterior, o principal fluxo de fluidos deve ocorrer do ventrículo para os cecos (FERREIRA et al., 1981). Essas considerações estão apresentadas na forma de um modelo geral da digestão em *R. americana* na Figura 1.

#### 1.4. Digestão em insetos distintos de *Rhynchosciara americana*

A organização espacial do processo digestivo está muito relacionada com a anatomia do intestino médio, como exemplificado no item anterior, para *R. americana*, embora possa também depender da posição filogenética do inseto estudado. As principais diferenças anatômicas encontradas no intestino médio dos insetos consistem no número e na posição dos cecos gástricos e na presença ou ausência de membrana peritrófica. A Figura 2 exemplifica os tipos principais de tubos digestivos que ocorrem entre os insetos.

Antes de começar a revisão dos processos digestivos nos diferentes grupos de insetos, apresentaremos uma pequena resenha da filogenia dos insetos. Embora exista grande discussão a respeito dos detalhes da filogenia das ordens de insetos (ver discussão em BOUDREAUX, 1979; KRISTENSEN, 1981), apresentaremos esquemas simplificados para os quais existe consenso.

Os insetos Neoptera, que inclui todos insetos alados (exceto as ordens Ephemeroptera e Odonata, isto é, os assemelhados às libélulas), derivam-se de um ancestral comum ao longo de três linhas principais: a linha Ortopteróide (que inclui as ordens: Orthoptera, os gafanhotos; Isoptera, os cupins e Dictyoptera, as baratas

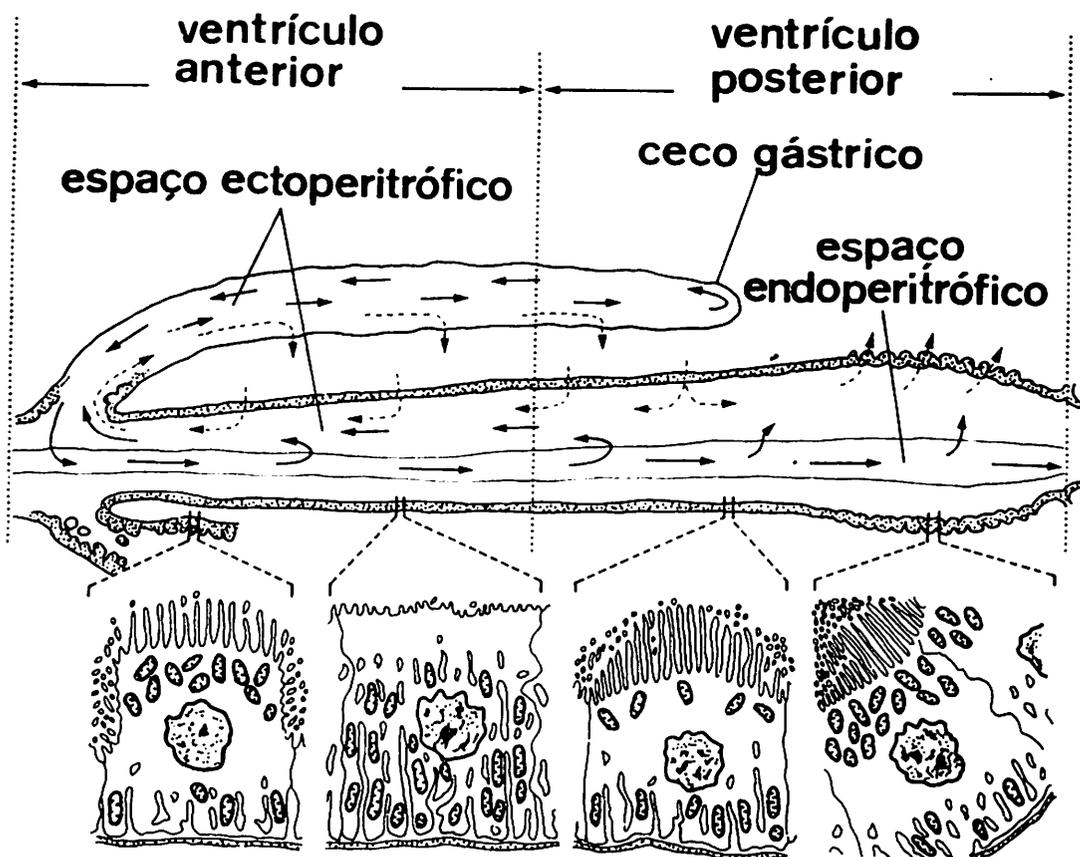


Figura 1 - Representação diagramática dos fluxos de água e da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas no intestino médio. Fluido endógeno (setas interrompidas) é transportado para o lúmen na região do ventrículo anterior, e do ventrículo posterior proximal, por células caracterizadas por invaginações da membrana basal muito desenvolvidas e microvilosidades apicais pequenas. O fluido move-se principalmente em direção aos cecos e em menor extensão para a região com dobramentos do ventrículo posterior. Nesses sítios, o fluido é absorvido por células que apresentam longas microvilosidades apicais e invaginações da membrana basal moderadamente desenvolvidas. As enzimas digestivas (setas sólidas) penetram no espaço endoperitrófico na região anterior e são recuperadas para o espaço ectoperitrófico gradativamente à medida que as moléculas dos polímeros tornam-se suficientemente pequenas para acompanhar as enzimas através da membrana peritrófica. As enzimas e os nutrientes são então levados para os cecos e em menores quantidades para a região com dobramentos no ventrículo posterior, sítios onde ocorre a digestão final e absorção do alimento (segundo FERREIRA et al., 1981).

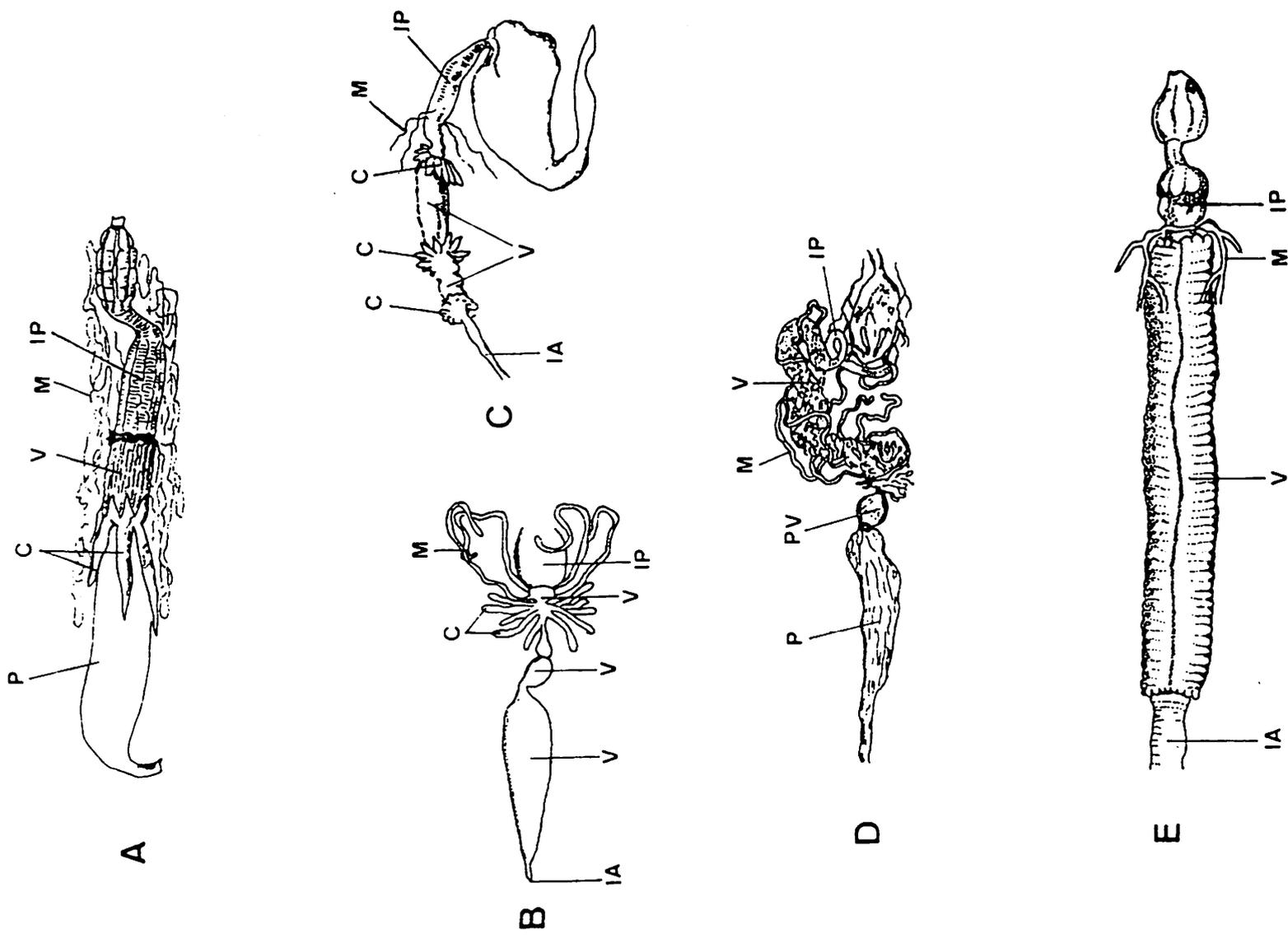


Figura 2 - Tipos anatômicos principais do tubo digestivo dos insetos. A, Orthoptera: Acrididae (ninfas e adultos); B, Hemiptera: Heteroptera (ninfas e adultos); C, Coleoptera: Scarabaeidae (larvas); D, Coleoptera: Carabidae (larvas); E, Lepidoptera: Sphingidae (larvas). Redesenhado de FERREIRA, C. (1982). C, cecos; IA, intestino anterior; IP, intestino posterior; M, tubos de Malpighi; P, papo; PV, próventrículo; V, ventrículo.

tas), a linha Hemipteróide (que inclui a ordem Hemiptera, os percevejos hematófagos e os de plantas) e a linha Holometabola. Os insetos Holometabola, que em contraste com os insetos das outras duas linhas, apresentam metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adulto) e evoluíram ao longo de dois ramos principais: o ramo Neuroptera-Coleoptera e o ramo Hymenoptera-Panorpoide. O tronco Coleoptera deu origem à ordem Coleoptera (besouros). O tronco Hymenoptera deu origem aos Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas) e o tronco Panorpoide originou duas linhas: uma levando à ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) e a outra à ordem Diptera (moscas e mosquitos).

Entre os Orthoptera (pelo menos da família Acrididae), os cecos gástricos estão localizados na região anterior do ventrículo, como exemplificado na Figura 2A para o tubo digestivo do gafanhoto. Nesse inseto, os cecos ocorrem em número de seis e apresentam duas ramificações, uma anterior e outra posterior. A digestão de carboidratos entre os Orthoptera parece ser principalmente luminal. Parte das enzimas devem ser providas pelas glândulas salivares, embora um certo número seja exclusivamente secretado pelo ventrículo (celobiose,  $\alpha$ -galactosidase, lactase cf KHAN, 1962; EVANS & PAYNE, 1964; FREEMAN, 1967; <sup>R</sup>DOSTE & ZEBE, 1974). Como não existe informação sobre a distribuição das enzimas luminiais entre os espaços ecto e endoperitritrífico, não se pode saber onde deve ocorrer a digestão intermediária e a final. Entretanto, a existência de uma circulação de fluidos inferida a partir da observação do movimento de corantes no tubo digestivo do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (DOW, 1981), semelhante a descrita para *R. americana* (ver item 1.3.), é um indício de que a digestão intermediária e final deve ocorrer principalmente ao nível dos cecos gástricos. Não obstante, a digestão de carboidratos ao nível da membrana plasmática das microvilosidades das células intestinais dos Orthoptera deve ser insignificante. Essa conclusão segue-se da observação de que a maior parte das carboidrases

celulares em *L. migratoria* é solúvel (DROSTE & ZEBE, 1974). Por outro lado, os resultados sobre a digestão final de proteínas em Orthoptera são muito incompletos para se tirar qualquer conclusão.

A digestão dos Dictyoptera tem sido estudada há muito tempo (revisão em BIGNELL, 1981). Entretanto, os dados são insuficientes para a proposição de um modelo satisfatório, embora seja razoável esperar que a digestão ocorra nas baratas de forma semelhante a dos gafanhotos.

Após os estudos clássicos de anatomia comparada dos seus tubos digestivos (NOIROT & KOVOOR, 1958; KOVOOR, 1969, 1971), os Isoptera tem sido objeto recente de estudos sobre a sua fisiologia digestiva, principalmente em relação à sua capacidade de hidrolisar celulose. Nos térmitas inferiores (famílias Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae e Serritermitidae), a celulose é digerida por protozoários residentes na pança, uma região expandida do intestino posterior (HONIGBERG, 1970). Por outro lado, as térmitas superiores (família Termitidae) adquirem as celulasas  $C_1$  críticas para iniciarem a digestão de celulose a partir de suas culturas de fungos (MARTIN & MARTIN, 1978, 1979). É interessante acrescentar que o espaço ectoperitrófico de algumas térmitas apresenta-se cheio de hifas de actinomicetos (BIGNELL et al., 1980). Os resultados, entretanto, não estão claros em relação à digestão dos componentes não celulósicos da dieta e nem do possível papel das bactérias da pança das térmitas superiores.

Os Hemiptera podem apresentar cecos gástricos na região posterior do ventrículo (Figura 2B), como ocorre em certos percevejos sugadores de seiva de plantas. Esses cecos são órgãos excretores de água e parecem não ter nenhuma importância na digestão, a despeito da existência de grande quantidade de bactérias em seu interior (GOODCHILD, 1963). A inexistência de uma membrana peritrófi

ca nesses insetos deve estar relacionada com o fato deles não apresentarem uma digestão luminal, devido ao fato de apenas ingerirem a çúcares e aminoácidos (cf TERRA & FERREIRA, 1981). Os Hemiptera he matófagos, como *Rhodnius prolixus*, não apresentam membrana peretrófica e as suas enzimas digestivas apresentam propriedades que lembram aquelas dos lisossomos dos mamíferos. É possível que essas ca racterísticas resultem do fato desses percevejos terem evoluído a partir dos percevejos sugadores de seiva. Os dados existentes até o momento são, entretanto, muito esccassos para a elaboração de um modelo abrangente para a digestão nesses insetos (GARCIA et al., 1978; GARCIA & GUIMARÃES, 1979; LANE & HARRISON, 1979; BILLINGSLEY & DOWNE, 1983; HOUSEMAN & DOWNE, 1983; RIBEIRO & PEREIRA, 1983 e TERRA, FERREIRA & GARCIA, comunicação pessoal).

Os Coleoptera correspondem aos primeiros insetos Holometa bola a evoluírem e ocuparam os abundantes nichos existentes na su perfície e no subsolo que estavam disponíveis inicialmente para os insetos (EVANS, 1975). Provavelmente associado a esse sucesso precoce, os besouros retiveram várias características primitivas por um lado e, por outro lado, tornaram-se um grupo muito variado. Assim, os seus ventrículos podem estar cobertos por criptas de célu las regenerativas (p. ex. família Carabidae, Figura 2D), ou por cecos verdadeiros (p. ex. família Curculionidae, BAKER et al., 1984), ou apresentar três séries anulares de cecos gástricos (p. ex. família Scarabaeidae, Figura 2C), ou ainda não apresentar nenhum ceco gástrico (p. ex. *Tenebrio molitor*, figura semelhante a dos Lepidoptera, Figura 2E). Só existem dados abrangentes para *T. molitor* (TER RA et al., 1985) e, porisso, apenas este inseto será considerado nes sa revisão. É provável, entretanto, que a organização do processo digestivo difira entre os diferentes sub-grupos de Coleoptera pelas razões expostas acima. As dissacaridasas de *T. molitor* são secreta das para o lúmen do ventrículo e penetram no espaço endoperitrófico

devido a seu pequeno peso molecular. A digestão inicial, intermediária e final dos carboidratos nesse inseto devem ocorrer, portanto, no lúmen do ventrículo. A digestão inicial de proteínas deve ocorrer no lúmen do ventrículo, onde se encontra a maior parte da tripsina. A digestão intermediária e final das proteínas devem ocorrer na superfície das células do ventrículo pela ação da aminopeptidase ligada a membrana plasmática das microvilosidades (não há dados sobre carboxipeptidase). Dados obtidos por injeção de corantes e pela medida das taxas de excreção de enzimas levaram TERRA et al. (1985) a proporem para o ventrículo da larva de *T. molitor* um contrafluxo de fluidos semelhante ao descrito para *R. americana* (ver item 1.3.). Deve-se ressaltar, entretanto, que *T. molitor* não foi o primeiro inseto a possuir ventrículo sem cecos que teve a organização de seu processo digestivo estudada com detalhes. A primazia cabe a *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae), cujos estudos inspiraram aqueles realizados em *T. molitor*.

Entre os Hymenoptera, a fisiologia digestiva das abelhas tem sido estudada quase que só por métodos histoquímicos e métodos baseados em microscopia de varredura. Os resultados indicam que o pólen (principal alimento das abelhas adultas) é digerido após extrusão do citoplasma contido no interior das paredes dos grãos de pólen (KLUNGNESS & PENG, 1984). Os resultados obtidos com formigas são surpreendentes. A formiga cortadora de folhas *Atta colombica tonsipes*, embora apresente um amplo espectro de carboidrases no espaço endoperitrófico (coletado como fluido fecal), não possui na verdade nenhuma enzima digestiva própria. Existe evidência segura de que as enzimas digestivas do gênero *Atta* são derivadas dos fungos que elas cultivam (BOYD & MARTIN, 1975).

Os Diptera melhor estudados até hoje são a larva de *R. americana*, já discutida no item 1.3, e a larva de *Trichosia pubes* -

*cens* (ESPINOZA-FUENTES et al., 1984). Os resultados obtidos com *T. pubescens* são muito semelhantes aos obtidos com *R. americana* e não serão por isso comentados aqui. Além dos dois insetos referidos, os Diptera foram muito pouco estudados e só se pode fazer considerações em relação a sua digestão final de proteínas. *Glossina morsitans* possui uma grande quantidade de uma aminopeptidase solúvel de peso molecular superior a 100.000 e que não é encontrada no espaço endoperitrófico (GOODING & ROLSETH, 1976). É razoável supor que esta aminopeptidase ocorra, além das células intestinais, também no espaço ectoperitrófico e não penetre no espaço endoperitrófico como ocorre em *R. americana* (cf. TERRA et al., 1979) e *T. pubescens* (ESPINOZA-FUENTES et al., 1984). Em relação às carboxipeptidases parece ocorrer diferenças reais entre *G. morsitans* e *R. americana*. Enquanto em *G. morsitans*, as carboxipeptidases A e B, com pesos moleculares respectivamente de 30.200 e 22.000, são encontradas no espaço endoperitrófico, as carboxipeptidases de *R. americana* não o são (TERRA et al., 1979).

Os resultados disponíveis para os Lepidoptera, até a realização dessa tese, eram fragmentários e aparentemente contraditórios. Assim, a digestão era considerada como iniciando-se no espaço endoperitrófico, pela ação da amilase e tripsina, enquanto que a digestão final era admitida ocorrer no interior das células intestinais, uma vez que não havia sido encontrado nenhuma hidrolase de dímeros ou de oligômeros no material regurgitado pelas larvas (cf. DADD, 1970; HOUSE, 1974b). Por outro lado, haviam dados suficientes para apoiar a hipótese de que os oligômeros seriam completamente hidrolisados até monômeros antes de ocorrer a absorção, tanto em mamíferos (BARNARD, 1973), quanto em insetos (TREHERNE, 1967). Além disso, não existia nenhum estudo que tentasse averiguar em Lepidoptera, a existência de uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas, similar à descrita para *R. americana*.

### 1.5. Objetivos desta tese

Os cecos gástricos desempenham um importante papel na organização do processo digestivo de muitos insetos, como revisto anteriormente. Por outro lado, existem numerosos insetos que carecem de cecos gástricos e para os quais inexistem dados detalhados sobre a sua fisiologia digestiva. Em vista disso, propusemo-nos a estudar a organização do processo digestivo de *Erinnyis ello* (Lepidoptera) que, além de não apresentar cecos gástricos, é de grande tamanho, o que facilita a sua dissecação. Além disso, *E. ello* é uma das principais pragas da mandioca, cuja cultura tornou-se economicamente mais importante do que já era, em consequência de estudos de viabilidade que a apontam como fonte alternativa para a produção de álcool. Deve-se ressaltar o fato de que, ao iniciarmos este estudo, o trabalho com *T. molitor* não havia sido iniciado e que, aliás, aquele trabalho foi muito inspirado pelos avanços dos estudos em *E. ello*.

Afim de estudar a organização do processo digestivo e iniciar a investigação dos mecanismos de secreção das enzimas digestivas nas larvas de *E. ello*, os seguintes enfoques foram escolhidos:

- a) Estudo ao nível histológico e ultraestrutural do ventrículo, que é principal sítio onde ocorre a digestão em *E. ello*.
- b) Estudo da distribuição das hidrolases mais ativas em diferentes regiões do tubo digestivo de *E. ello*.
- c) Estudo da distribuição das hidrolases mais ativas em frações subcelulares de células de diferentes regiões do tubo digestivo de *E. ello*.

Além disso, procuramos realizar um estudo físico e cinético preliminar das enzimas de *E. ello* envolvidas na digestão. A ce-

lobiase (EC 3.2.1.21) foi estudada com mais detalhe, porque estudos preliminares mostraram que ela apresentava apenas uma forma molecular.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Glicose oxidase (tipo II), peroxidase (tipo II), catalase de fígado bovina, hemoglobina bovina, albumina sérica bovina, substratos sintéticos e dissacarídeos foram adquiridos da Sigma (EUA). Polylite 8001 foi adquirido da Resana S.A. (Brasil). Os anfolitos vieram da Serva (Alemanha). Todos os demais reagentes empregados foram produtos analíticos obtidos principalmente da B.D.H., E. Merck e J.T. Baker. As soluções foram sempre preparadas com água bidestilada em destilador de vidro.

### 2.2. Animais

*Erinnyis ello* L., 1758 (Lepidoptera, Sphingidae) foi descrito primeiramente por Linnaeus em 1758 com o nome de *Sphinx ello*. Posteriormente ROTHSCCHILD & JORDAN, 1903 transferiram-na para o gênero *Erinnyis*.

*E. ello* é considerado a praga mais importante da mandioca, podendo também atacar outras plantas, mas as Euphorbiaceas parecem ser o seu principal hospedeiro (BELLOTTI & VAN SCHOONHOVEN, 1978). Durante o período larval que dura aproximadamente 13 dias cada larva chega a alcançar em média 7 cm de comprimento (CARVALHO, 1980).

Os ovos de *Erinnyis ello* (Lepidoptera Sphingidae) foram coletados em folhas de mandioca dos campos experimentais da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Eles foram mantidos no laboratório em placas de Petri sob condições naturais de fotoperíodo a 25°C. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com folhas frescas de *Euphorbia pulcherrima* (até 5 larvas em cada

placa de Petri). No segundo estadio, as larvas foram transferidas para caixas de plástico (30 x 25 x 12 cm) (com até 15 larvas em cada caixa), cobertas com plástico transparente e perfurado, onde elas foram alimentadas diariamente com folhas frescas de *E. pulcherrima*, por todo o estágio alimentar. Larvas do quinto (último) estadio de ambos os sexos foram usadas nas determinações.

### 2.3. Digestibilidade e utilização do alimento pelas larvas

O consumo de alimentos é usualmente descrito por três parâmetros: o índice de consumo, o coeficiente de digestibilidade e a eficiência da conversão do alimento em tecido (cf HOUSE, 1974a, b; CHAPMAN, 1982). O índice de consumo é calculado dividindo o peso fresco do alimento ingerido pelo produto do peso fresco (média) do inseto durante o período de alimentação pela duração do período de alimentação (em dias). O coeficiente de digestibilidade é obtido pela divisão do peso seco do alimento absorvido (peso seco do alimento ingerido menos o peso seco das fezes) pelo peso seco do alimento ingerido após multiplicar por 100. A eficiência de conversão do alimento é calculada a partir do ganho em peso seco do animal, dividido pelo alimento absorvido, e multiplicado por 100. O peso seco do alimento ingerido foi calculado a partir da área das folhas comidas pela larva utilizando uma curva padrão que relacionava área foliar e seu peso seco correspondente. O ganho de peso seco das larvas em alimentação foi determinado a partir do seu ganho em peso fresco e do conteúdo de água determinado em larvas controle.

### 2.4. Tempo de tráfego do bolo alimentar

O tempo gasto para o alimento atravessar o intestino de *E. ello* foi determinado medindo-se o tempo decorrido a partir da

transferência das larvas de folhas para flores de *E. pulcherrima* até o aparecimento de fezes avermelhadas. Tempo idêntico foi obtido quando substituiu-se flores por folhas de *E. pulcherrima* e esperou-se o aparecimento de fezes esverdeadas.

## 2.5. Preparação de amostras do ventrículo, seções do ventrículo, folhas e fezes

As larvas foram imobilizadas colocando-as sob gelo por 30 min. e, após este tempo, elas foram lavadas com água destilada, secas em papel de filtro e dissecadas em NaCl 125 mM. A dissecação é feita cortando a cabeça e o segmento anal da larva e abrindo-a pela parte ventral com auxílio de uma tesoura entomológica. Após a remoção do intestino, este era cortado na parte posterior do proventrículo e na abertura dos tubos de Malpighi. A membrana peritrófica com seu conteúdo foi removida depois que o epitélio do ventrículo foi cortado longitudinalmente. As glândulas salivares, intestino anterior, intestino posterior, ventrículo inteiro e epitélio do ventrículo, após serem cuidadosamente lavados com solução salina, foram homogeneizados em água bidestilada a frio, usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (glândulas salivares) ou um homogeneizador tipo Omni-mixer (Sorvall) a 5.000 rpm por 2 períodos de 15 s (de mais tecidos). Todas as preparações acima foram então passadas através de uma malha de nylon de 100  $\mu$ m de poro. As membranas peritróficas com seu conteúdo foram homogeneizadas de forma semelhante às preparações do ventrículo, sem a lavagem prévia com solução salina, e centrifugadas a 10.000 xg por 10 min. a 4°C. Essa centrifugação é necessária para remover os fragmentos de folhas não digeridos presentes nos homogeneizados. As folhas de *E. pulcherrima* foram homogeneizadas em almofariz com água bidestilada e centrifugadas a 10.000 xg por 10 min. a 4°C. As fezes foram tratadas de forma seme

lhante às preparações de membranas peritróficas.

Amostras de homogeneizados do ventrículo total e do epitélio do ventrículo foram centrifugadas a 100.000 x g, 60 min., 4°C. Os sobrenadantes foram usados como fonte das enzimas solúveis e o sedimento como fonte das enzimas ligadas a membrana.

As preparações podiam ser armazenadas a -20°C por um período de pelo menos um ano sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

## 2.6. Obtenção do material regurgitado e fluido ectoperitrófico

Larvas lavadas e enxugadas como descrito no item 2.5. foram forçadas a regurgitar em um tubo de centrífuga sob a ação de choques elétricos de pequena intensidade. O material regurgitado cuja cor, viscosidade e conteúdo de folhas variava entre diferentes animais, foi centrifugado (10.000 x g, 10 min., 4°C) antes do uso. Cada larva produz em torno de 80 µl de material regurgitado. Para coletar o fluido ectoperitrófico, a dissecação das larvas foi realizada como descrito no item 2.5. O epitélio do ventrículo, após a remoção da membrana peritrófica com seu conteúdo, foi suspenso sobre um tubo de centrífuga e a sua superfície luminal foi submetida a um jato de solução salina (NaCl 125 mM). A seguir esse lavado foi centrifugado (600 x g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante resultante usado como fluido ectoperitrófico.

As preparações podiam ser armazenadas a -20°C por um período de pelo menos um ano sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

## 2.7. pH dos conteúdos do intestino

As larvas foram dissecadas em NaCl 125 mM e o intestino foi transferido para uma lâmina de vidro. Após o intestino ter sido seco externamente com um papel de filtro, o intestino anterior, o ventrículo e o intestino posterior foram cortados como descrito no item 2.5. Os valores de pH do conteúdo do intestino anterior e posterior foram determinados com um eletrodo de vidro para superfícies (Ingold, São Paulo, Brasil). A membrana peritrófica com seu conteúdo foi removida do ventrículo e dividida em 3 partes correspondentes, grosseiramente, as três regiões macroscopicamente visíveis no epitélio do ventrículo das lagartas da família Sphingidae (cf. CIOFFI, 1979). Os valores de pH tanto no conteúdo da membrana peritrófica quanto na película de fluido ectoperitrófico sobre as três regiões do epitélio ventricular foram medidas com um eletrodo de vidro para superfícies.

## 2.8. Microscopia óptica e eletrônica

As larvas foram dissecadas em NaCl 125 mM a frio, que é isotônico em relação à hemolinfa de *E. ello* (cf. TERRA et al., 1982), ou em sua própria hemolinfa. Após a remoção do intestino, a membrana peritrófica com seu conteúdo foi desprezada e o ventrículo remanescente dividido nas três partes referidas no item 2.7. Para os estudos com o microscópio óptico, as seções do epitélio do ventrículo foram fixadas em solução de Bouin e incluídas em parafina. Os cortes de 7  $\mu$ m obtidos a seguir foram corados com hematoxilina e eosina. Para microscopia eletrônica, as seções do epitélio do ventrículo foram fixadas em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4 (SABATINI et al., 1963) por 2 h a 4°C. Após lavagem com sacarose 0,2M em tampão cacodilato, as seções do epitélio do ventrículo

foram pós-fixadas por 1 h a 4°C em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato. Posteriormente, as preparações eram lavadas em NaCl 0,1M e contrastadas por 16 a 18 h em acetato de uranila 1%. Após desidratação em concentrações crescentes de etanol a temperatura ambiente, o material foi embebido em resina de poliéster Polylite 8001 (Resana S/A, Brasil; COIRO et al., 1972). Os cortes ultrafinos foram feitos usando um ultramicrótomo Porter-Blum MT II, contrastados com citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e examinados em um microscópio eletrônico Siemens Elmiskop IA operado a 60 KV.

O mesmo procedimento foi utilizado para a microscopia eletrônica das frações subcelulares.

#### 2.9. Preparação de microvilosidades por precipitação diferencial com cálcio

As células do epitélio do ventrículo foram homogeneizadas em Tris 2mM, Manitol 50 mM pH 7,1, usando um homogeneizador Omni-mixer (Sorvall) a 5.000 rpm por dois períodos de 15 s. O homogeneizado após ser filtrado em malha de nylon de 100 µm de poro foi fracionado segundo o procedimento de FERREIRA & TERRA (1980), que é semelhante ao método de SCHIMITZ et al. (1973). Este método é baseado na agregação induzida por cálcio de mitocôndrias, membranas basolaterais e parte do retículo endoplasmático que passam a se sedimentar a baixa aceleração (3.300 x g, 10 min.) (Fração P<sub>1</sub>). O sobrenadante resultante é centrifugado a maior aceleração (20.000 x g, 15 min.) para sedimentar as membranas de microvilosidades (Fração P<sub>2</sub>), deixando os lisossomos, a maioria do retículo endoplasmático e as proteínas solúveis no sobrenadante final (Fração S).

As microvilosidades purificadas e as frações subcelulares podiam ser armazenadas a -20°C por pelo menos um mês sem mudança na

atividade das enzimas ensaiadas.

#### 2.10. Preparação de membranas de microvilosidades das células do epitélio ventricular das larvas de *E. ello*

Uma preparação de microvilosidades, obtida como descrito no item 2.9., foi suspensa com o auxílio de um homogeneizador tipo Dounce, em uma solução de Tris 0,8M pH 7,0. A preparação permaneceu no gelo por 1 h, sendo agitada periodicamente. Ao final desse período, 0,5 ml da suspensão foi aplicado no topo de um gradiente descontínuo de glicerol composto de cinco camadas. Esse gradiente foi formado colocando-se em um tubo de centrífuga 2,2 ml das seguintes soluções de glicerol preparadas em MgSO<sub>4</sub> 45 mM: 60%, 45%, 42%, 40% e 37% de glicerol (p/v). O gradiente com a amostra de microvilosidades purificadas foi centrifugado a 63.000 x g por 15 min. a 4°C e a centrífuga foi parada sem auxílio de breque.

Iluminando-se por baixo do tubo da centrífuga e olhando-se contra um fundo escuro (efeito Tyndall) foi possível ver que a maioria do material acumula-se nas interfases, algum material encontrava-se distribuído por todo o gradiente e também observou-se algum material no fundo do tubo. As regiões do gradiente correspondentes às interfases, a suspensão remanescente (fases combinadas) e o material no fundo do tubo foram recolhidas, diluídas aproximadamente cinco vezes com água bidestilada e sedimentadas por centrifugação a 100.000 x g por 2 h a 4°C. Os sedimentos foram suspensos, antes do ensaio das enzimas, no mesmo meio utilizado na preparação das microvilosidades, usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem.

As frações podiam ser armazenadas, por pelo menos uma semana a -20°C, sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

### 2.11. Preparação de microvilosidades por sonicação do epitélio ventricular anterior e posterior da larva de *E. ello*

O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por CIOFFI & WOLFERSBERGER (1983) para obtenção de microvilosidades de células colunares. Pedacos do epitélio ventricular anterior e posterior foram colocados em tubo de ultracentrífuga de 10 ml contendo 4 ml da solução de manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM pH 7,1. A sonicação foi realizada por 5 s. usando um sonicador Branson B-2 na menor intensidade possível, com uma sonda semi-micro. Após a sonicação, o material foi centrifugado por 15 min, 5.000 x g, 4°C. O sedimento foi denominado S<sub>1</sub> e o sobrenadante foi centrifugado por 15 min, 5.000 x g, 4°C. O sedimento resultante foi denominado S<sub>2</sub> e o sobrenadante foi então centrifugado a 12.000 x g, 30 min, 4°C para sedimentar as microvilosidades das células colunares (S<sub>3</sub>), enquanto que todo o material posto em solução durante a sonicação permanecia no sobrenadante final (S<sub>4</sub>).

As microvilosidades purificadas e as frações subcelulares podiam ser armazenadas a -20°C por pelo menos um mês sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

### 2.12. Centrifugação diferencial de homogeneizados das regiões anterior e posterior e do epitélio do ventrículo total da larva *E. ello*

As larvas foram dissecadas como descrito no item 2.8. As células de todo epitélio ventricular e das regiões anterior e posterior do epitélio do ventrículo foram homogeneizadas usando um homogeneizador do tipo Dounce (10 movimentos de pistão) ou um homogeneizador tipo Omni-mixer (Sorvall) a 5.000 rpm por dois períodos de 15 s. usando um volume suficiente dos meios: KCl 125 mM, pH 7,0; KCl 115

mM, EDTA 5 mM, pH 7,0 e manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM, pH 7,1 para resultar em cerca de 12 mg de proteína/ml. O homogeneizado, após ser filtrado em malha de nylon de 100  $\mu$ m de poro, foi ajustado para conter aproximadamente 5 mg de proteína/ml e centrifugado a 4°C. As seguintes frações foram coletadas: P<sub>1</sub>, sedimento 600 x g, 10 min; P<sub>2</sub>, sedimento 3.300 x g, 10 min; P<sub>3</sub>, sedimento 25.000 x g, 10 min; P<sub>4</sub>, sedimento 100.000 x g, 1 h; S, sobrenadante final. Após a centrifugação diferencial, as frações foram coletadas, homogeneizadas (Potter-Elvehjem, meio de homogeneização) e, após vários ciclos de congelamento e descongelamento, foram centrifugadas a 100.000 x g por 1 h. Os sobrenadantes e os sedimentos correspondentes a cada fração foram ensaiados para várias enzimas.

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de figuras construídas segundo DE DUVE et al.(1955). As atividades enzimáticas obtidas nas várias frações subcelulares foram somadas e a porcentagem de atividade presente em cada fração, foi calculada em relação à soma. O mesmo foi feito para a massa de proteína. As figuras foram construídas plotando-se a porcentagem de proteína (abscissa) versus a atividade específica relativa (% de atividade/% de proteína) (ordenada). Cada fração é representada por um paralelogramo cuja área é proporcional à atividade recuperada em cada fração e a altura corresponde à purificação obtida.

### 2.13. Preparação de microvilosidades de células ventriculares e sua solubilização por Triton X-100

A fração P<sub>3</sub> obtida por centrifugação diferencial (item 2.12.) foi lavada três vezes por centrifugação (25.000 x g, 30 min., 4°C); duas vezes no meio original de homogeneização (manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM, pH 7,1) e uma vez em KCl 125 mM pH 7,0. O sedimento da última lavagem (KCl 125 mM pH 7,0), que cor

responde majoritariamente a membranas plasmáticas de microvilosidades, foi usado como fonte de enzimas de membrana. Essa preparação era a seguir tratada com Triton X-100 por 20 h a 4°C, a uma razão de 24 mg de Triton X-100/mg de proteína de membrana. Após o tratamento as preparações foram centrifugadas a 25.000 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante era utilizado como fonte das enzimas solubilizadas após adicionar igual volume de Triton X-100 5%. Nenhum sedimento foi visível após posterior centrifugação a 100.000 x g por 1 h a 4°C.

As preparações podiam ser armazenadas a -20°C por pelo menos um mês sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

#### 2.14. Solubilização de enzimas de membrana por papaína

Membranas plasmáticas de microvilosidades das células ventriculares das larvas de *E. ello* foram preparadas como descrito no item 2.13 e o sedimento homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem.

Para ativar a papaína, 2,8 mg da enzima foram incubadas a 37°C por 5 min, em tampão fosfato de potássio 62 mM pH 7,0 na presença de cisteína 50 mM. A suspensão de membranas preparadas como descrito acima era incubada com papaína ativada a 30°C, numa razão de 1 mg de papaína/10 mg de proteína de membrana. Aliquotas eram retiradas após diferentes períodos de tempo a 30°C, diluídas duas vezes com água gelada e centrifugadas a 100.000 x g por 1 h a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte das enzimas solubilizadas.

As preparações podiam ser armazenadas a -20°C por pelo menos um mês sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

## 2.15. Solubilização de enzimas de membranas por pH alcalino

Lotes de ventrículo da larva de *E. ello* foram homogeneizados em água usando um homogeneizador tipo Omni-mixer (Sorvall) a 5.000 rpm por dois períodos de 15 s e a seguir foram centrifugados (100.000 x g, 60 min, 4°C). Os sedimentos resultantes foram lavados uma vez por ressuspensão em água com um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem seguido por centrifugação da suspensão a 100.000 x g por 60 min a 4°C. Os sedimentos lavados foram suspensos em tampão glicina - NaOH 20 mM pH 10, com auxílio de um homogeneizador tipo Potter - Elvehjem, e mantidos a 30°C. Após 60 min, as preparações foram centrifugadas (100.000 x g, 60 min, 4°C) e os sobrenadantes, após extensa diálise contra água, foram utilizados como fontes de enzimas solubilizadas.

As preparações podiam ser armazenadas a -20°C por pelo menos um mês sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas.

## 2.16. Eletroforese e determinação de atividades enzimáticas em géis de poliacrilamida

As amostras de diferentes preparações (fração solúvel das células ventriculares, membranas solubilizadas por diferentes métodos e enzimas purificadas) foram aplicadas em géis de poliacrilamida preparados segundo HEDRICK & SMITH (1968) em tubos de 5 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento. A separação eletroforética foi obtida com uma corrente de 2,5 mA por coluna a 4°C. Na eletroforese de enzimas de membrana solubilizadas por Triton X-100 este era adicionado nos géis de poliacrilamida para uma concentração final de 0,1%.

Os géis eram fracionados em um fracionador de géis de po-

liacrilamida (Autogeldivider Savant Instruments, USA) com o tampão apropriado para cada enzima, na presença ou ausência de Triton X-100 0,1%. Frações de 9 gotas (ou 18 gotas se o gel continha Triton X-100) (correspondentes a aproximadamente 2 mm do gel) foram coletadas. As frações permaneciam por 3 a 20 h a 4°C, antes de serem usadas para os vários ensaios. A recuperação da atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e carboxipeptidase aplicada aos géis foi de aproximadamente 20%. Para as demais enzimas ensaiadas, a recuperação ficou entre 70 e 110%.

#### 2.17. Determinação do peso molecular em géis de poliacrilamida

Amostras da fração solúvel das células ventriculares e do ventrículo inteiro de larvas de *E. ello* foram submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida de várias concentrações diferentes (6; 7; 8; 8,5; 9%) segundo o método de HEDRICK & SMITH (1968). Os géis foram fracionados com o tampão de ensaio de cada enzima em um fracionador de géis de poliacrilamida como descrito anteriormente (item 2.16). Cada fração (aproximadamente 0,4 ml) foi ensaiada como descrito no item 2.20. O valor da razão de migração ( $R_m$ ) de determinada enzima é obtida dividindo-se o número da fração apresentando atividade máxima pelo número total de frações de cada gel. O logaritmo dos valores de  $R_m$  correspondentes a cada um dos géis são colocados em gráficos em função da concentração dos géis. O valor da tangente de gráficos obtidos como descrito acima guarda uma relação linear com o peso molecular da proteína em questão (HEDRICK & SMITH, 1968). Esta relação foi estabelecida construindo-se um gráfico padrão com os seguintes marcadores de peso molecular: mioglobina,  $M_r$  17.800; albumina de ovo,  $M_r$  43.000; hemoglobina,  $M_r$  64.500; catalase,  $M_r$  232.000 e ferritina,  $M_r$  450.000.

## 2.18. Determinação do peso molecular por centrifugação em gradiente de densidade

Amostras da fração solúvel do ventrículo inteiro e das células ventriculares de larvas de *E. ello* contendo 1,5 mg de hemoglobina bovina e 20 µl de catalase de fígado bovina, foram aplicados no topo de gradientes contínuos de 4,6 ml de glicerol. Os gradientes foram formados com glicerol de 5 a 30% (p/v) e foram preparados nos seguintes tampões: citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5; fosfato 50 mM, pH 6,2 e glicina/NaOH 50 mM, pH 10. Os gradientes foram centrifugados a 96.000 xg por 15 h a 4°C e alíquotas (0,2 ml) foram coletadas a partir do fundo de cada gradiente com o auxílio de uma bomba peristáltica. O peso molecular das enzimas ensaiadas nessas frações foi calculado segundo MARTIN & AMES (1961), usando como referência as sedimentações da hemoglobina ( $M_r$  64.500) e catalase ( $M_r$  232.000) adicionadas à amostra. A posição da hemoglobina nos gradientes foi verificada determinando-se a absorbância das frações a 545 nm e a posição da catalase, a partir de ensaios da enzima segundo MARTIN & AMES (1961). A recuperação da atividade das hidrolases aplicadas ao gradiente ficaram entre 70 e 100%.

## 2.19. Eletrofocalização e determinação de atividades enzimáticas em géis

Os géis de poliacrilamida 7,5% utilizados continham anfólito pH 3-10 a 1% e também Triton X-100 0,1%, no caso de eletrofocalização de enzimas solubilizadas nesse detergente. Para que a aplicação fosse feita do lado alcalino, sem que a enzima entrasse em contato com a solução presente no banho (NaOH), deixava-se um espaço de 1 cm na parte superior do tubo onde colocava-se 0,15 ml de uma mistura de glicerol 8,8% e anfólito pH 3-10 0,7% em água. Após uma

pré-focalização de 30 min, aplicava-se a preparação de enzima contendo glicerol 11,4%. Seguiu-se uma eletrofocalização a 4°C por 2 a 3 horas com uma voltagem de 31 V/cm. Quando a preparação de enzimas era polimerizada junto com o gel, não se fazia a pré-focalização. Após a focalização, os géis foram fracionados como descrito no item 2.16.

O gradiente de pH ao longo dos géis era determinado fracionando-se um cilindro de gel (preparado de forma idêntica aos demais) com água bidestilada no lugar do tampão. O pH das frações era medido com um eletrodo de vidro, após permanecer por 3 h a temperatura ambiente. A recuperação das atividades enzimáticas aplicadas nos géis ficaram entre 70 e 100%.

## 2.20. Determinação de atividades enzimáticas e de proteínas

Os ensaios foram realizados como descrito na Tabela 1.

Em cada determinação, a mistura de reação foi incubada por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (branco de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade calculada foi expressa, na maioria das vezes, em n moles de substrato hidrolisado por minuto (n Unidades, nU).

Os substratos derivados de nitrofenol foram ensaiados nos pHs indicados em um volume de reação de 0,1 ml e a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão carbonato 0,25 M bicarbonato 0,25 M SDS 1%, com exceção da fosfatase alcalina, cuja reação foi interrompida com NaOH 40 mM (EGUCHI & IWAMOTO, 1975). Em experimentos controles verificou-se que SDS 1% desnaturava todas as enzimas ensaiadas, com exceção da fosfatase alcalina. A atividade de aril  $\beta$ -galactosidase, usando como substrato fenil  $\beta$ -D-galactosídeo, foi determinada medindo-se a formação de fenol, com o reagente de LOWRY

Tabela 1 - Condições padrões e métodos de determinação da atividade de enzimas

| Enzimas                          | EC       | Substrato        | Concentração | pH        | Determinação realizada          |
|----------------------------------|----------|------------------|--------------|-----------|---------------------------------|
| $\beta$ -N-acetilglicosaminidase | 3.2.1.30 | pNPNAG           | 2,5 mM       | 4,5       | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| Amilase                          | 3.2.1.1  | amido            | 0,5%         | 9,8       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| Aminoceptidase                   | 3.4.11.- | LPNA             | 1 mM         | 8,0       | p-nitroanilida <sup>3</sup>     |
| Carboxipeptidase-A               | 3.4.17.1 | ZGlyPhe          | 15 mM        | 9,0       | Phe ou grupo amino <sup>7</sup> |
| Celobiase                        | 3.2.1.21 | celbiose         | 7 mM         | 6,5       | glicose <sup>1</sup>            |
| "                                | 3.2.1.21 | pNP $\beta$ GLi  | 4 mM         | 6,5       | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| "                                | 3.2.1.21 | oNP $\beta$ GLi  | 4 mM         | 6,5       | o-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| "                                | 3.2.1.21 | P $\beta$ GLi    | 4 mM         | 6,5       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| "                                | 3.2.1.21 | salicina         | 4 mM         | 6,5       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| "                                | 3.2.1.21 | pAP $\beta$ GLi  | 4 mM         | 6,5       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| "                                | 3.2.1.21 | pNPT $\beta$ GLi | 4 mM         | 6,5       | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| Celulase                         | 3.2.1.4  | CMC              | 1%           | 5,0 e 8,0 | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| Fosfatase acida                  | 3.1.3.2  | NPP              | 4 mM         | 5,0       | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| Fosfatase alcalina               | 3.1.3.1  | NPP              | 4 mM         | 10,4      | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| $\beta$ -frutosidase             | 3.2.1.26 | sacarose         | 7 mM         | 6,0       | glicose <sup>1</sup>            |
| "                                | 3.2.1.26 | sacarose         | 7 mM         | 6,0       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| "                                | 3.2.1.26 | rafinose         | 7 mM         | 6,0       | grupos redutores <sup>4</sup>   |
| $\alpha$ -galactosidase          | 3.2.1.22 | melibicse        | 7 mM         | 6,0       | glicose <sup>1</sup>            |
| "                                | 3.2.1.22 | pNP $\alpha$ Gal | 4 mM         | 6,0       | p-nitrofenol <sup>2</sup>       |
| G-6-fosfatase                    | 3.1.3.9  | G-6-P            | 0,5 mM       | 7,2       | fosfato inorgânico <sup>9</sup> |

../.

| Enzimas                 | EC       | Substrato          | Concentração | pH  | Determinação realizada        |
|-------------------------|----------|--------------------|--------------|-----|-------------------------------|
| G-6-P desidrogenase     | 1.1.1.49 | G-6-P              | 1,5 mM       | 7,4 | formazan <sup>8</sup>         |
| Lactase                 | 3.2.1.23 | lactose            | 7 mM         | 6,5 | glicose <sup>1</sup>          |
| "                       | 3.2.1.23 | pNPβGal            | 4 mM         | 6,5 | p-nitrofenol <sup>2</sup>     |
| "                       | 3.2.1.23 | oNPβGal            | 4 mM         | 6,5 | o-nitrofenol <sup>2</sup>     |
| "                       | 3.2.1.23 | PβGal              | 4 mM         | 6,5 | fenol <sup>5</sup>            |
| "                       | 3.2.1.23 | pAPβGal            | 4 mM         | 6,5 | grupos redutores <sup>4</sup> |
| Lactato desidrogenase   | 1.1.1.27 | lactato de sódio   | 50 mM        | 7,4 | formazan <sup>8</sup>         |
| Maltase                 | 3.2.1.20 | maltose            | 7 mM         | 6,0 | glicose <sup>1</sup>          |
| "                       | 3.2.1.20 | maltose            | 7 mM         | 6,0 | glicose <sup>6</sup>          |
| "                       | 3.2.1.20 | pNPαGli            | 4 mM         | 6,0 | p-nitrofenol <sup>2</sup>     |
| Succinato desidrogenase | 1.3.99.1 | succinato de sódio | 20 mM        | 7,5 | formazan <sup>8</sup>         |
| Trealase                | 3.2.1.28 | trealose           | 7 mM         | 6,0 | glicose <sup>1</sup>          |
| "                       | 3.2.1.28 | trealose           | 7 mM         | 6,0 | grupos redutores <sup>4</sup> |
| Tripsina                | 3.4.21.4 | BAPA               | 0,87 mM      | 9,0 | p-nitroanilida <sup>3</sup>   |

\* Os ensaios foram realizados a 30°C, nos pHs indicados. Os tampões utilizados (50 mM) foram: acetato (5,0), citrato-fosfato (6,0), fosfato (6,5; 8,0), Tris/HCl (7,4; 7,5), borato/NaOH (9,0, carboxipeptidase) e glicina/NaOH (9,0; 9,8; 10,4). O meio de reação com NPP a pH 10,4 continha, além do tampão, MgSO<sub>4</sub> 1 mM e o meio com amido continha NaCl 10 mM.

<sup>1</sup> - Segundo DAHLQVIST (1968). <sup>2</sup> - Ver item 2.20. <sup>3</sup> - Segundo ERLANGER et al. (1961). <sup>4</sup> - Segundo NOELTING et al. (1948). <sup>5</sup> - Segundo LOWRY et al. (1951) e ver item 2.20. <sup>6</sup> - Segundo DUBOWSKI (1962). <sup>7</sup> - Segundo NICHOLSON & KIM (1975) e segundo ROSEN (1957). <sup>8</sup> - Ver item 2.20. <sup>9</sup> - Segundo BAGINSKI et al. (1967).

et al. (1951), na ausência de sulfato de cobre.

A atividade de succinato desidrogenase foi determinada baseando-se em ACKRELL et al. (1978), em um volume de reação de 1 ml contendo tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, succinato de sódio 20 mM, Triton X-100 1,4% (v/v), KCN 1 mM, INT 0,2 mM e PMS 0,64 mM. A maioria das preparações de succinato desidrogenase contém uma mistura de enzimas na forma ativa e inativa. A forma inativa contém quantidades estequiométricas de oxalacetato (ACKRELL et al. (1978). A ativação da enzima foi obtida pela incubação com a mistura de reação, menos o reagente colorido (INT e PMS), por 10 min a 30°C. A reação era iniciada pela adição de INT mais PMS, interrompida pela adição de 0,2 ml de HCl 0,5N e a absorbância foi lida a 500 nm.

A atividade de lactato desidrogenase foi determinada baseando-se no método de BERGMEYER & BERNT (1974), em um volume de reação de 1 ml, contendo tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,4, lactato de sódio 50 mM, NAD 1,5 mM, Triton X-100 1,4% (v/v), PMS 0,32 mM e INT 0,2 mM. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de HCl 0,5 N e a absorbância foi lida a 500 nm.

A atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase em conjunto com a atividade de 6-fosfogluconato desidrogenase foi determinada segundo o procedimento de GLOCK & MCLEAN (1953), exceto que INT foi usado como acceptor de elétrons. O meio de reação (1 ml) continha tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 3,6 mM, glicose-6-fosfato 1,5 mM, NADP 0,12 mM, Triton X-100 1,4% (v/v), PMS 0,32 mM e INT 0,2 mM. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de HCl 0,5N e a absorbância foi lida a 500 nm.

A atividade de glicose-6-fosfatase foi determinada através da medida do fosfato inorgânico liberado no meio de incubação de acordo com o método de BAGINSKI et al. (1967). O meio de reação (0,2

ml) continha tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,2, EDTA 4 mM, NaF 2 mM e glicose-6-fosfato 0,5 mM. EDTA e NaF foram incluídos no meio de incubação devido ao fato de que eles são, respectivamente, inibidores da fosfatase alcalina e fosfatase ácida de mamífero (EVANS, 1978). A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de ácido ascórbico 2% (p/v) em TCA 10% (p/v).

As folhas de *E. pulcherrima*, e como consequência o conteúdo da membrana peritrófica e as fezes de *E. ello*, contém um inibidor do reagente glicoseoxidase/peroxidase, que é usado rotineiramente no ensaio de dissacaridases (cf DAHLQVIST, 1968). Por causa disto, a glicose produzida pela hidrólise da trealose, maltose e sacarose nessas preparações foi determinada como descrito na Tabela 1.

Quando  $\delta$ -gliconalactona estava presente, as velocidades iniciais foram calculadas a partir de incubações realizadas por 20 min a 30°C em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. Nessas condições, 35% da concentração inicial de  $\delta$ -gliconolactona sofre hidrólise espontânea, embora não altere o pH do meio de incubação. A ausência de lactonase EC (3.1.1.17) em nossas preparações foi assegurada pela medida de  $\delta$ -gliconolactona remanescente (HESTRIN, 1949) em diferentes tempos, na presença e ausência das nossas preparações.

Os sedimentos obtidos por centrifugação das diferentes preparações eram suspensos por reomogeneização em homogeneizadores tipo Potter-Elvehjem. Quando essa providência não é tomada antes de se realizar os ensaios enzimáticos, a recuperação das enzimas particuladas fica bastante diminuída. Nos meios de reação usados para ensaiar enzimas previamente solubilizadas por Triton X-100, a concentração desse detergente foi sempre mantida acima de 0,05%. Experimentos controles mostraram que a atividade das enzimas é constante em todas as concentrações de Triton X-100 utilizadas nos ensaios.

As proteínas foram determinadas de acordo com LOWRY et al. (1951), usando a albumina de soro bovino como padrão. As preparações de conteúdo da membrana peritrófica, fluido ectoperitrófico, regurgitado, fezes e preparações contendo EDTA, apresentam interferentes. Por isso, as proteínas dessas preparações foram previamente precipitadas pela adição de um volume de  $\text{HClO}_4$  1N gelado. O sedimento obtido após centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 min foi lavado por res-suspensão e centrifugação com  $\text{HClO}_4$  0,3 N e solubilizado em NaOH 0,1 N antes de ter as suas proteínas determinadas pelo método de LOWRY et al. (1951).

#### 2.21. Inibição da hidrólise de celobiose por ONP $\beta$ Gal e inibição da hidrólise de ONP $\beta$ Gal por celobiose

Afim de se determinar a atividade sobre ONP $\beta$ -D-galactosídeo e sobre celobiose, quando os substratos encontravam-se presentes simultaneamente nos meios de incubação, uma alíquota era retirada de cada amostra para determinar o-nitrofenalato, e daí estimar a hidrólise de ONP $\beta$ -D-galactosídeo, e outra alíquota utilizada para medida de glicose. A determinação de glicose nesse experimento era feita adicionando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% ao final da incubação com o reagente de glicose oxidase/peroxidase (DAHLQVIST, 1968). Nestas condições o o-nitrofenol encontra-se protonado e não interfere na leitura da absorbância, necessária para a medida de glicose.

#### 2.22. Identificação da configuração do carbono anomérico da glicose liberada pela celobiase

A glicose oxidase de fungos oxida  $\beta$ -D-glicosídeos preferencialmente (KEILIN & HARTREE, 1952) e, por isso, ela tem sido usada, juntamente com a peroxidase e um corante acceptor de elétrons na

identificação da configuração anomérica da glicose liberada por disacaridases (p. ex. SEMENZA et al., 1969).

Afim de se determinar a configuração anomérica da glicose liberada pela celobiase solúvel de *E. ello*, essa enzima foi incubada por 10 min à temperatura ambiente (23°C) em tampão acetato 20 mM pH 5,6 contendo HgCl<sub>2</sub> 1 mM com <sup>o</sup>NPβ-D-glicosídeo. O tampão acetato foi utilizado no lugar do tampão fosfato porque esse último íon acelera o processo de anomerização (SCHRAY & BENKOVIC, 1978). A adição de HgCl<sub>2</sub> na mistura de reação é para inibir a mutarrotase (EC 5.1.3.33) (BENTLEY & BHATE, 1960) presente em nossas preparações. Nessas condições, aproximadamente 15% da celobiase é inibida pelo HgCl<sub>2</sub>. Ao término dos 10 minutos, inibia-se a celobiase pela adição de δ-gliconolactona (1 mM final) ao meio de incubação e retirava-se deste uma alíquota de 0,1 ml antes e outra após fervura por 5 min. Às alíquotas, adicionava-se 1 ml do reagente de glicose oxidase/oxidase (DAHLQVIST, 1968) e as absorbâncias eram a seguir lidas continuamente a 420 nm. Uma terceira alíquota era retirada do meio de incubação para a determinação da glicose liberada a partir da quantificação do o-nitrofenol liberado.

Os controles foram preparados como as amostras experimentais, substituindo o substrato por uma solução de α-D-glicose recém preparada ou por uma solução de α-D-glicose previamente fervida, ambas soluções em concentrações iguais a das amostras experimentais. Os controles foram incubados por 5 minutos antes da adição de δ-gliconolactona e do reagente de glicose oxidase/oxidase.

### 2.23. Determinação do Km e Ki das hidrolases

As enzimas foram incubadas (nas condições de ensaio como descrito no item 2.20 e Tabela 1) com dez diferentes concentrações

de substrato. Os valores de  $K_m$  foram determinados a partir de plotes de Lineweaver-Burk. Afim de se determinar os valores de  $K_i$ , as enzimas foram incubadas com oito diferentes concentrações de inibidor, para cada uma das quatro concentrações de substrato utilizadas. Os valores do  $K_i$  foram obtidos a partir de replotes da inclinação e intercepto do plote de Lineweaver-Burk contra a concentração do inibidor utilizado (SEGEL, 1975).

O ácido glicônico para ser usado como inibidor foi preparado como se segue. Soluções de  $\delta$ -gliconolactona 20 mM em tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 foram incubadas a 30°C por 4 h. Após esse tempo elas foram diluídas com tampão fosfato 0,2 M pH 6,5 e seus valores de pH ajustados para 6,5.

Na determinação do  $K_i$  para Tris a força iônica foi mantida constante nos diferentes meios de incubação pela adição de quantidades adequadas de NaCl.

#### 2.24. Purificação da amilase e da maltase

A amilase foi parcialmente purificada por precipitação por sulfato de amônio. A fração solúvel das células ventriculares foi adicionado sulfato de amônio suficiente para este ficar numa saturação de 35%. Após 10 min. a frio, a suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi suspenso em água, usando um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e dialisado durante uma noite contra 1.000 volumes de água a 4°C. Esta preparação de amilase contém em torno de 75% da amilase e 40% da proteína presente na preparação original. Esta preparação foi utilizada sempre que se fazia necessária uma amilase parcialmente purificada, exceto para a obtenção de anticorpos. Outra técnica utilizada para a purificação da amilase foi a eletroforese em cilindro de gel de po-

liacrilamida. Amostras da fração solúvel das células do ventrículo foram submetidas a eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida 8,5%. As frações com atividade de amilase obtidas a partir de vários cilindros foram combinadas, centrifugadas (10.000 x g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante dialisado contra 1.000 volumes de água durante a noite a 4°C. A preparação dialisada foi utilizada para obtenção de anticorpos em coelho.

A maltase foi parcialmente purificada por eletroforese como descrito acima para a amilase.

#### 2.25. Preparação de anticorpos contra a amilase solúvel da larva de *E. ello*

Aproximadamente 220 µg de amilase (purificada por eletroforese em cilindros de gel de poliacrilamida) em 7 ml de NaCl 0,1 M foram combinados com 1 ml de adjuvante completo de Freund. A emulsão resultante foi injetada subcutaneamente em vários lugares do corpo de um coelho. Após 30 dias, foram realizadas aplicações semelhantes à descrita acima usando, entretanto, adjuvante incompleto de Freund. Sete dias após a última injeção, retirou-se cerca de 30 ml de sangue do coelho. O sangue foi mantido a 37°C por 1 hora e a 4°C por uma noite. A seguir, o sangue foi centrifugado a 3.000 x g, 10 min., 4°C e ao sobrenadante (soro) foi adicionado uma solução de sulfato de amônio pH 6,8 (saturação final 50%). Após 18 h a temperatura ambiente (23°C) a suspensão resultante foi centrifugada a 5.000 x g, 15 min., 4°C. O sedimento foi ressuspenso em sulfato de amônio 50% pH 6,8 e a preparação foi novamente centrifugada a 5.000 x g, 15 min., 4°C. O último passo foi repetido uma outra vez e o sedimento final foi solubilizado em NaCl 0,1 M e dialisado contra 1.000 volumes de NaCl 0,1 M durante uma noite com uma troca da solução de diálise. Após a diálise, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por

10 min a 4°C e o sobrenadante foi guardado a -20°C até o uso como antissoro.

## 2.26. Imunodifusão e imunoelektroforese

As imunodifusões duplas foram realizadas de acordo com o método de OUCHTERLONY (1968), usando como suporte agarose 1%, contendo NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> 0,1% em tampão glicina/NaOH 0,1 M pH 9,8.

As imunoelektroforeses foram realizadas em lâminas de microscópio, utilizando como suporte agarose 1% em tampão Tris/HCl 30 mM, pH 8,6 contendo acetato de sódio 50 mM. As amostras foram aplicadas em um poço de 3 mm de diâmetro e a eletroforese foi realizada aplicando uma corrente constante de 5 mA/lâmina. O tampão do banho utilizado foi Tris/HCl 50 mM pH 8,6 contendo acetato de sódio 83 mM. Após a corrida eletroforética, o antissoro foi aplicado em uma fenda lateral e a imunodifusão foi realizada à temperatura ambiente (23°C) em uma câmara úmida.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Organização espacial do processo digestivo em larvas de *E. ello*

##### 3.1.1. Consumo de alimento e tempo de tráfego do bolo alimentar

O índice de consumo de folhas de *E. pulcherrima* pelas larvas de *E. ello* é de  $2,1 \pm 0,2$  (média e desvio padrão da média de 3 determinações), o coeficiente de digestibilidade é  $45 \pm 2\%$  (média e desvio padrão da média de 3 determinações), enquanto que a eficiência de conversão do alimento em tecido corporal é de  $25 \pm 1\%$  (média e desvio padrão da média de 3 determinações). De acordo com o baixo coeficiente de digestibilidade, o exame das fezes ao microscópio revelou que elas são compostas de fragmentos de folhas apresentando células com paredes celulares vazias na periferia e células intactas no centro.

A velocidade do alimento através do tubo digestivo de larvas de *E. ello* do quinto estadio é de  $3,2 \pm 0,2$  cm/h (média e desvio padrão da média de 5 determinações). Desse modo, o alimento gasta aproximadamente 150 min para atravessar o tubo digestivo das larvas maduras (cerca de 4 g de peso fresco) de *E. ello*.

##### 3.1.2. pH do conteúdo luminal do tubo digestivo

O conteúdo do ventrículo é mais alcalino dentro da membrana peritrófica do que na camada de fluido localizado na superfície do epitélio ventricular (Tabela 2). Contudo, em ambos os lugares, os valores de pH são maiores na região média do que na região anterior e posterior. O conteúdo do ventrículo parece ser bem tamponado uma vez que seus valores de pH não variam muito entre indivíduos.

O mesmo parece não ocorrer com o conteúdo do papo e do íleo.

Tabela 2 - pH do conteúdo luminal em diferentes regiões do intestino da larva de *E. ello*\*

| Regiões   | Conteúdo do papo | Superfície do epitélio ventricular | Conteúdo da membrana peritrófica | Conteúdo do íleo |
|-----------|------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------|
| Anterior  | -                | 8,1 ± 0,1                          | 9,3 ± 0,1                        | -                |
| Média     | -                | 8,5 ± 0,2                          | 9,8 ± 0,1                        | -                |
| Posterior | -                | 7,8 ± 0,2                          | 9,4 ± 0,1                        | -                |
| Total     | 7,2 ± 0,4        | -                                  | -                                | 6,7 ± 0,4        |

\* As regiões do ventrículo correspondem aproximadamente às três regiões macroscopicamente visíveis no epitélio ventricular da larva de *E. ello*. O conteúdo da membrana peritrófica corresponde ao material contido no interior de cada região do ventrículo. Os números são médias e desvios padrões da média baseados em 4 determinações independentes. Maiores detalhes são dados em Materiais e Métodos.

### 3.1.3. Distribuição das hidrolases entre as regiões do tubo digestivo da larva de *E. ello*

As hidrolases apresentadas na Tabela 3 foram ensaiadas no intestino anterior, ventrículo, intestino posterior, nas glândulas salivares e nas folhas de *Euphorbia pulcherrima*. A celulase foi também ensaiada, embora não tenha sido encontrada em nenhuma das preparações relacionadas. As atividades encontradas no ventrículo correspondem a pelo menos 98% da atividade medida no intestino inteiro de *E. ello* (Tabela 3). As atividades das hidrolases nas glândulas salivares foram insignificantes, correspondendo a menos do que 0,1% da atividade determinada no ventrículo. A atividade determinada em 0,86 g de folhas (equivalente à massa de folhas ingerida por cada

Tabela 3 - Hidrolases presentes nas diferentes regiões do tubo digestivo da larva de *E. ello*\*

| Enzimas            | Substrato hidrolisado | Intestino anterior     | Ventrículo                | Intestino posterior**  |
|--------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Amilase            | amido                 | 40 ± 1 (140 ± 20)      | 29.000 ± 1.000 (400 ± 50) | 190 ± 6 (140 ± 30)     |
| Aminopectidase     | LPNA                  | 2,1 ± 0,4 (4,9 ± 0,2)  | 9.000 ± 1.000 (150 ± 10)  | 11 ± 2 (6 ± 1)         |
| Carboxipeptidase   | ZGlyPhe               | -                      | 900 ± 100 (10 ± 1)        | -                      |
| Celobiase          | pNPβGli               | 0,3 ± 0,01 (1,1 ± 0,1) | 1.300 ± 200 (16 ± 1)      | 1 ± 0,1 (0,5 ± 0,05)   |
| Fosfatase alcalina | NPP                   | -                      | 7.000 ± 1.000 (100 ± 10)  | -                      |
| β-frutosidase      | sacarose              | -                      | 15.000 ± 600 (200 ± 20)   | -                      |
| Maltase            | maltose               | 9 ± 1 (17 ± 1)         | 4.800 ± 600 (47 ± 6)      | 3 ± 0,5 (2 ± 0,5)      |
| Trealase           | trealose              | 25 ± 4 (45 ± 4)        | 1.700 ± 100 (18 ± 2)      | 32 ± 3 (20 ± 2)        |
| Tripsina           | BAPA                  | 0,7 ± 0,1 (1,3 ± 0,2)  | 300 ± 40 (4 ± 0,5)        | 0,5 ± 0,1 (0,3 ± 0,05) |

\* Os resultados são atividades expressas em mUnidades/animal e atividades específicas (entre parênteses) expressas em mUnidades/mg de proteína. As médias e desvios padrões da média foram baseados em determinações realizadas em 5 preparações diferentes contendo 2 animais cada.

\*\*Inclui somente o conteúdo do íleo, uma vez que a bolota fecal localizada no reto é normalmente excretada durante a dissecação.

larva em um período de tempo igual ao tempo em que o bolo alimentar gasta para atravessar o tubo digestivo) corresponde a menos do que 1% da atividade encontrada no ventrículo. Desse modo, a atividade das hidrolases determinadas nas diferentes regiões do tubo digestivo são muito provavelmente originadas do ventrículo da larva de *E. ello*.

Não há nenhum ativador ou inibidor no epitélio ventricular ou no conteúdo da membrana peritrófica, que afete as enzimas digestivas da larva de *E. ello*. Essa conclusão baseia-se no fato de que os ensaios realizados nas partes do ventrículo separadamente, após serem somados, igualam-se aos ensaios realizados em misturas de homogeneizados de epitélio ventricular com conteúdo da membrana peritrófica. Experimentos semelhantes mostraram que o intestino posterior e os tubos de Malpighi não contêm ativadores nem inibidores para a amilase, tripsina e a aminopeptidase.

A fosfatase alcalina do ventrículo é recuperada completamente no epitélio ventricular, quantidades insignificantes são determinadas no conteúdo da membrana peritrófica (Tabela 4). Somente cerca de 70% da atividade de amilase e tripsina presente no homogeneizado do ventrículo inteiro é recuperada quando o epitélio ventricular e o conteúdo da membrana peritrófica são ensaiadas separadamente, sugerindo que 30% dessas atividades são perdidas durante a dissecação.

As atividades de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, aminopeptidase, carboxipeptidase, celobiase,  $\beta$ -frutosidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase, ao contrário das atividades observadas para amilase e tripsina, são encontradas em maior quantidade no epitélio ventricular e em menor quantidade no conteúdo da membrana peritrófica (Tabela 4). Contudo, de forma semelhante à amilase e à tripsina, a soma de suas atividades no epitélio ventricular e no conteúdo da mem

Tabela 4 - Hidrolases presentes no epitélio ventricular e no conteúdo da membrana peritrófica da larva de *E. ello*\*

| Enzimas                          | Conteúdo da membrana peritrófica |      |                    | Epitélio ventricular |                    | Soma   |
|----------------------------------|----------------------------------|------|--------------------|----------------------|--------------------|--------|
| $\beta$ -N-acetilglicosaminidase | 3 $\pm$                          | 0,05 | ( 0,4 $\pm$ 0,05)  | 40 $\pm$             | 5 ( 2 $\pm$ 0,2)   | 43     |
| Amilase                          | 14.000 $\pm$ 1.200               |      | (1.000 $\pm$ 100)  | 6.000 $\pm$ 1.000    | (150 $\pm$ 20)     | 20.000 |
| Aminopectidase                   | 200 $\pm$                        | 10   | ( 20 $\pm$ 2)      | 6.300 $\pm$          | 700 (200 $\pm$ 20) | 6.500  |
| Carboxipeptidase                 | 200 $\pm$                        | 20   | ( 20 $\pm$ 1)      | 500 $\pm$            | 50 ( 20 $\pm$ 1)   | 700    |
| Celobiase                        | 10 $\pm$                         | 1    | ( 1 $\pm$ 0,1)     | 1.000 $\pm$          | 100 ( 30 $\pm$ 2)  | 1.010  |
| Fosfatase alcalina               | 200 $\pm$                        | 30   | ( 10 $\pm$ 0,5)    | 6.000 $\pm$          | 500 (240 $\pm$ 30) | 6.200  |
| $\beta$ -frutosidase             | 400 $\pm$                        | 10   | ( 20 $\pm$ 2)      | 14.000 $\pm$         | 200 (400 $\pm$ 20) | 14.400 |
| $\alpha$ -galactosidase          | 1 $\pm$                          | 0,1  | ( 0,1 $\pm$ 0,001) | 20 $\pm$             | 1 ( 1 $\pm$ 0,01)  | 21     |
| Maltase                          | 40 $\pm$                         | 20   | ( 4 $\pm$ 0,1)     | 3.000 $\pm$          | 200 ( 80 $\pm$ 10) | 3.040  |
| Trealase                         | 50 $\pm$                         | 5    | ( 3 $\pm$ 0,5)     | 1.200 $\pm$          | 200 ( 30 $\pm$ 3)  | 1.250  |
| Tripsina                         | 150 $\pm$                        | 10   | ( 10 $\pm$ 1)      | 70 $\pm$             | 10 ( 2 $\pm$ 0,1)  | 220    |

\* Os resultados são atividades expressas em mUnidades/animal e atividades específicas (entre parênteses) expressas em mUnidades/mg de proteína. O conteúdo da membrana peritrófica refere-se realmente a homogeneizados da membrana peritrófica com seu conteúdo, como descrito em Materiais e Métodos, podendo assim incluir enzimas adsorvidas em sua superfície externa e presas entre as suas lamelas constituintes. As médias e desvios padrões da média foram baseados em determinações realizadas em 5 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

brana peritrófica correspondem a aproximadamente 70% daquela encontrada no ventrículo inteiro, com exceção da  $\beta$ -frutossidase que é recuperada completamente no epitélio ventricular. Uma possível explicação para a diferença de atividade encontrada entre o ventrículo inteiro e a soma de atividades no conteúdo da membrana peritrófica e epitélio ventricular, determinadas separadamente (comparar a Tabela 3 com a Tabela 4), seria a perda das enzimas localizadas no espaço ectoperitrófico durante a dissecação.

A  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, amilase, celobiase,  $\beta$ -frutossidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e a trealase ocorrem em maior quantidade na fração solúvel das células do epitélio ventricular, enquanto a aminopeptidase, carboxipeptidase e a tripsina ocorrem em maior quantidade na fração de membrana. Esses resultados foram obtidos através da determinação da atividade das enzimas no sobrenadante e no sedimento da centrifugação  $100.000 \times g$ , 60 min.,  $4^\circ C$  de homogeneizados do epitélio ventricular em meio hipotônico (água).

A solução isotônica (NaCl 125 mM) utilizada para lavar o epitélio ventricular possui uma composição enzimática diferente das células e do conteúdo da membrana peritrófica (Tabela 5). Dessa forma, é possível que ela represente um outro compartimento do ventrículo: o fluido ectoperitrófico. A atividade específica de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, amilase, carboxipeptidase e tripsina é maior no fluido ectoperitrófico do que no epitélio ventricular (Tabela 5), mostrando que elas são secretadas para o espaço ectoperitrófico enquanto a atividade específica de aminopeptidase, celobiase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase é menor no fluido ectoperitrófico do que no epitélio ventricular (Tabela 5), o que torna impossível dizer se elas são realmente secretadas para o espaço ectoperitrófico ou se a baixa atividade específica encontrada é devido a descamação e/ou rompimento celular durante a dissecação.

Tabela 5 - Hidrolases presentes no conteúdo da membrana peritrófica, epitélio ventricular e fluido ectoperitrófico\*

| Enzimas                          | Conteúdo da membrana peritrófica | Epitélio ventricular | Fluido ectoperitrófico |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| $\beta$ -N-acetilglicosaminidase | 0,4 $\pm$ 0,06                   | 2 $\pm$ 0,3          | 3 $\pm$ 0,6            |
| Amilase                          | 1.000 $\pm$ 100                  | 150 $\pm$ 20         | 1.000 $\pm$ 60         |
| Aminopectidase                   | 20 $\pm$ 3                       | 200 $\pm$ 20         | 40 $\pm$ 6             |
| Carboxipeptidase A               | 20 $\pm$ 1                       | 20 $\pm$ 2           | 50 $\pm$ 6             |
| Celobiase                        | 1 $\pm$ 0,2                      | 30 $\pm$ 3           | 10 $\pm$ 2             |
| $\alpha$ -galactosidase          | 0,1 $\pm$ 0,001                  | 1 $\pm$ 0,002        | 0,4 $\pm$ 0,02         |
| Maltase                          | 4 $\pm$ 2                        | 80 $\pm$ 20          | 30 $\pm$ 4             |
| Trealase                         | 3 $\pm$ 0,6                      | 30 $\pm$ 4           | 20 $\pm$ 1             |
| Tripsina                         | 10 $\pm$ 2                       | 2 $\pm$ 0,2          | 10 $\pm$ 1             |

\* O fluido ectoperitrófico foi coletado através da lavagem da superfície luminal do epitélio ventricular. Os resultados são atividades específicas expressas em mUnidades/mg de proteína. As médias e desvios padrões da média são baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada. Maiores detalhes em Materiais e Métodos.

A amilase e a tripsina são encontradas em grande quantidade, a aminopectidase e celobiase em menor quantidade, e a maltase e a trealase estão ausentes do material regurgitado do ventrículo (Tabela 6).

Membranas peritróficas com seu conteúdo foram divididas ao meio (separando uma região anterior e uma região posterior) e homogeneizadas como descrito em Materiais e Métodos. Os homogeneizados das duas regiões foram ensaiados e 60  $\pm$  1% da atividade da amilase e 61  $\pm$  3% da atividade da tripsina foram encontradas na região anterior (média e desvio padrão da média de 3 determinações). Assim, as hidrolases que sem dúvida penetram no espaço endoperitrófico (amila

se e tripsina) ocorrem principalmente na região anterior do lúmen da membrana peritrófica.

Os resultados até o presente mostraram que as enzimas envolvidas em digestão inicial (amilase e tripsina) são principalmente secretadas para o lúmen e são encontradas no espaço endoperitrófico. As enzimas responsáveis pela digestão intermediária e final ( $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e carboxipeptidase) estão localizadas nas células do ventrículo e são secretadas para o lúmen mas não penetram no espaço endoperitrófico enquanto aminopeptidase, celobiase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase são encontradas majoritariamente nas células do ventrículo.

Tabela 6 - Hidrolases presentes nas fezes e no material regurgitado da larva de *E. ello*\*

| Enzimas        | Fezes                       | Regurgitado                     |
|----------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Amilase        | 400 $\pm$ 60 (200 $\pm$ 30) | 6.000 $\pm$ 2.000 (50 $\pm$ 20) |
| Aminopeptidase | 20 $\pm$ 6 (10 $\pm$ 3)     | 200 $\pm$ 60 (2 $\pm$ 0,6)      |
| Celobiase      | ausente                     | 3 $\pm$ 2 (0,03 $\pm$ 0,02)     |
| Maltase        | ausente                     | ausente                         |
| Trealase       | ausente                     | ausente                         |
| Tripsina       | 4 $\pm$ 1 (2 $\pm$ 0,6)     | 150 $\pm$ 100 (1 $\pm$ 0,06)    |

\* Os resultados são atividades expressas em mUnidades/grama de fezes ou mUnidades/ml de material regurgitado, e atividades específicas (entre parênteses) expressas em mUnidades/mg de proteína. As médias e desvios padrões da média são baseados em ensaios realizados em 3 preparações diferentes. Ausente corresponde a atividades menores do que 3 mUnidades/g de fezes ou 1 m Unidade/ml de regurgitado. O material regurgitado, obtido passando uma fraca corrente elétrica através da larva, varia amplamente em aparência entre os diferentes animais. Maiores detalhes em Materiais e Métodos.

### 3.1.4. Excreção das enzimas digestivas

A estabilidade das enzimas digestivas em condições semelhantes àquelas vigentes no interior do ventrículo da larva de *E. ello* é mostrada na Tabela 7. A amilase, tripsina e a aminopeptidase são estáveis também em condições semelhantes àquelas do conteúdo do íleo da larva de *E. ello* (pH 6,7, 23°C), por pelo menos 150 min. Levando estes dados em consideração, a excreção das enzimas digestivas pela larva de *E. ello* foi calculada a partir das diferentes atividades determinadas tanto nas fezes, quanto nos homogeneizados de intestino posterior (Tabela 8).

Tabela 7 - Estabilidade das enzimas digestivas da larva de *E. ello* em condições semelhantes às encontradas em seu tubo digestivo\*

| Enzimas        | Atividade remanescente (%) | Enzimas  | Atividade remanescente (%) |
|----------------|----------------------------|----------|----------------------------|
| Amilase        | 110 ± 10                   | Maltase  | 30 ± 5                     |
| Aminopeptidase | 70 ± 5                     | Trealase | 100 ± 2                    |
| Celobiase      | 60 ± 10                    | Tripsina | 90 ± 5                     |

\* As atividades remanescentes foram calculadas ensaiando-se as hidrolases em amostras de conteúdo da membrana peritrófica (diluídas duas vezes) mantidas a temperatura ambiente (23°C), pH 9,5, no tempo zero e após um período de tempo igual àquele que o bolo alimentar leva para atravessar o tubo digestivo de *E. ello* (150 min.). Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 4 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

Tabela 8 - Atividade das hidrolases excretadas pela larva de *E. ello* após um período de tempo igual ao tempo de tráfego do bolo alimentar através do tubo digestivo\*

| Enzimas        | % do ventrículo inteiro        |  |
|----------------|--------------------------------|--|
|                | Calculado a partir das fezes** | Calculado a partir de homogeneizados de intestino posterior*** |
| Amilase        | 1 ± 0,1                        | 7 ± 0,4  |
| Aminopeptidase | 0,2 ± 0,04                     | 2 ± 0,2  |
| Celobiase      | 0                              | 1 ± 0,1  |
| Maltase        | 0                              | 2 ± 0,4  |
| Trealase       | 0                              | 20 ± 2   |
| Tripsina       | 1 ± 0,1                        | 2 ± 0,4  |

\* Os resultados são médias e desvios padrões da média baseadas em 5 determinações.

\*\* Calculados a partir dos dados das Tabelas 3, 6, 7 e texto, levando em consideração que a larva madura de *E. ello* (cerca de 4 g de peso fresco) excreta  $0,5 \pm 0,05$  g de fezes (peso fresco de 4 determinações) em um período de tempo idêntico ao tempo gasto para o alimento atravessar o tubo digestivo.

\*\*\* Calculado a partir dos dados das Tabelas 3, 7 e texto, assumindo que todas as atividades encontradas nos homogeneizados de intestino posterior são devidas ao seu conteúdo (ver nota na Tabela 3) e que o íleo esvazia 10 vezes durante um período de tempo idêntico ao tempo de tráfego do alimento pelo intestino (150 min.). Esta última hipótese é baseada na observação de que o íleo contém material visualmente equivalente a uma bolota fecal e que cada larva excreta 10 dessas bolotas em 150 min.

### 3.1.5. Injeção de corante na hemolinfa e no tubo digestivo de *E. ello*

300 ml de solução aquosa de amarante 0,1 M foi introduzida no esôfago das larvas de *E. ello* e após 75 min. as larvas foram

dissecadas. Uma inspeção do lado luminal do ventrículo revelou que os dois terços anteriores do ventrículo (correspondentes às regiões anterior e média) estavam mais corados do que o terço posterior do ventrículo (correspondente à região posterior). Uma injeção de 100 ml da solução de amarante 0,1 M na hemolinfa, seguido da observação (após 15 h) do lado hemolinfático do ventrículo mostrou que o terço posterior do ventrículo estava mais corado do que os seus dois terços anteriores.

### 3.1.6. Microscopia óptica e eletrônica

#### 3.1.6.1. Histologia do ventrículo

A morfologia geral do ventrículo da larva de *E. ello* é semelhante àquela de *Manduca sexta* (cf. CIOFFI, 1979). O epitélio do ventrículo da larva de *E. ello*, formado por uma única camada de célula, apresenta três regiões visíveis a olho nu: uma região anterior, uma região média e uma região posterior. As regiões anterior e posterior são mais espessas que a região média devido a diferenças no grau de dobramento do epitélio. Três espécies de células podem ser reconhecidas no epitélio do ventrículo: células colunares, células caliciformes e células endócrinas. Uma mudança na morfologia das células colunares e das células caliciformes é observada ao longo do ventrículo.

#### 3.1.6.2. Ultraestrutura das células da região anterior e média do ventrículo

##### Células colunares:

A membrana plasmática apical das células colunares é modificada em microvilosidades cilíndricas, apresentando um topo dilata

do, de onde observam-se vesículas aparentemente destacando-se (Figura 3.1). As microvilosidades são cobertas por um proeminente glicocálix (Figura 3.4) e apresentam vesículas brotando a partir de sua região média. As membranas plasmáticas laterais entre células colunares adjacentes são irregulares, algumas vezes modificadas em interdigitações ao longo do complexo juncional, o qual consiste principalmente de junções septadas. As mitocôndrias estão associadas à membrana plasmática basal, que é invaginada com poucas aberturas para o espaço subjacente (Figura 3.2). O retículo endoplasmático rugoso é encontrado em grande quantidade na base da célula, mas é escasso no ápice. Alguns elementos de Golgi (Figura 3.5) ocorrem próximo ao núcleo, que é localizado no centro da célula, enquanto que os ribossomos livres predominam no citoplasma apical.

Embora grande parte das células colunares da região média estejam de acordo com a descrição acima, muitas dessas células apresentam uma morfologia intermediária entre as células colunares da região anterior e da região posterior que será comentada mais adiante.

#### Células endócrinas:

As células endócrinas ocorrem em pequeno número na base das células colunares e apresentam a morfologia comumente encontrada nos Lepidoptera (cf. ENDO & NISHIITSUTSUTI-UWO, 1981).

#### Células caliciformes:

As células caliciformes apresentam uma grande cavidade basal formada pela invaginação de sua membrana plasmática apical. Esta cavidade abre-se para o lúmen do intestino através de um prolongamento estreito que termina em uma estrutura semelhante a uma válvula.

A membrana plasmática apical invaginada apresenta numerosas microvilosidades modificadas que exibem mitocôndrias alongadas em seu inte-

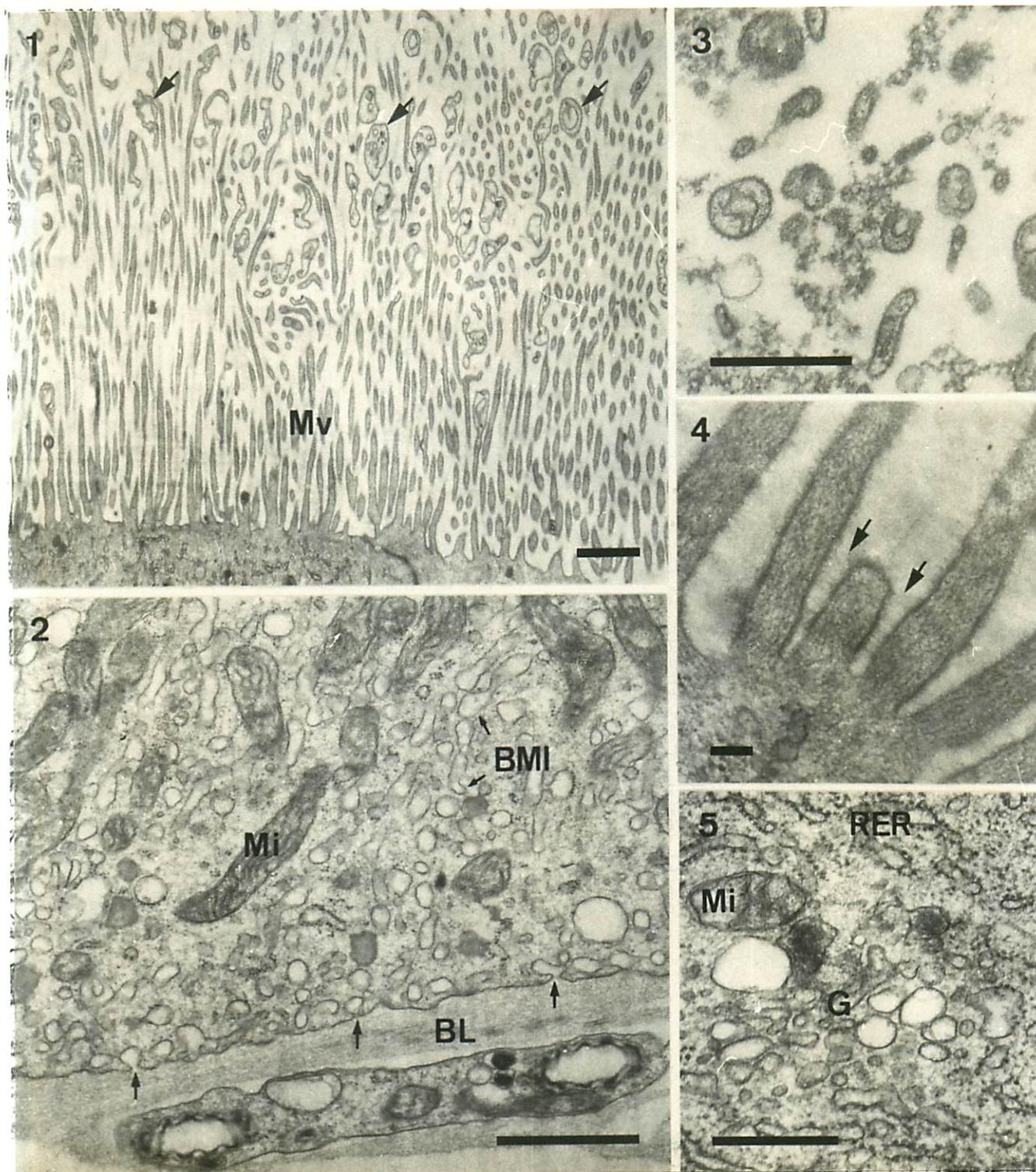


Figura 3 - Células colunares da região anterior do ventrículo das larvas de *E. ello* e fração particulada do fluido ectopentrófico. As breviações como na Figura 31.

(3.1) Aspecto das microvilosidades mostrando as vesículas destacantes (setas). Barra 1  $\mu$ m x 11.000. (3.2) Aspecto da base celular apresentando as invaginações da membrana basal com poucas aberturas (setas) para o espaço subjacente. Barra 1  $\mu$ m x 25.000. (3.3) Fração particulada do fluido ectoperitrófico do ventrículo da larva de *E. ello*. Barra 0,5  $\mu$ m x 48.000. (3.4) Detalhe das microvilosidades mostrando o glicocálix (setas). Barra 0,1  $\mu$ m x 70.000. (3.5) Complexo de Golgi. Barra 0,5  $\mu$ m x 44.000.

rior. (Figura 4.7). No lado citoplasmático da membrana dessas microvilosidades, podem-se notar numerosos botões (Figura 4.6). Muitos ribossomos livres estão espalhados por todo o citoplasma. O retículo endoplasmático (tanto o liso quanto o rugoso) não é bem desenvolvido. A membrana plasmática basal apresenta invaginações com poucas aberturas para o espaço subjacente e é associada a mitocôndrias (Figura 4.7).

### 3.1.6.3. Ultraestrutura das células da região posterior do ventrículo

#### Células colunares:

As células colunares são caracterizadas por um núcleo central, pela presença de microvilosidades cilíndricas dispostas em arranjo regular na face apical da célula (Figura 5.8), e por uma membrana plasmática basal bastante invaginada (Figura 5.10). As microvilosidades são cobertas por um proeminente glicocálix (Figura 6.11) e apresentam ao longo de seu comprimento um grande número de vesículas com membrana dupla em processo de brotamento (Figuras 5.8 e 5.9). A membrana plasmática basal apresenta invaginações dispostas em um arranjo paralelo que se estendem até pelo menos a metade da altura da célula. Essas invaginações associadas com numerosas mitocôndrias) apresentam grande número de aberturas regularmente espaçadas e dirigidas para o espaço subjacente. As referidas invaginações são mais abundantes no citoplasma adjacente às células caliciformes (Figuras 5.10, 7.13 e 7.15). No citoplasma basal observam-se numerosos elementos de Golgi (Figura 6.12) e um retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido. Vesículas são visíveis desde a vizinhança do Golgi até o citoplasma apical (Figuras 6.11 e 6.12).

#### Células endócrinas:

Células endócrinas semelhantes àquelas encontradas na re-

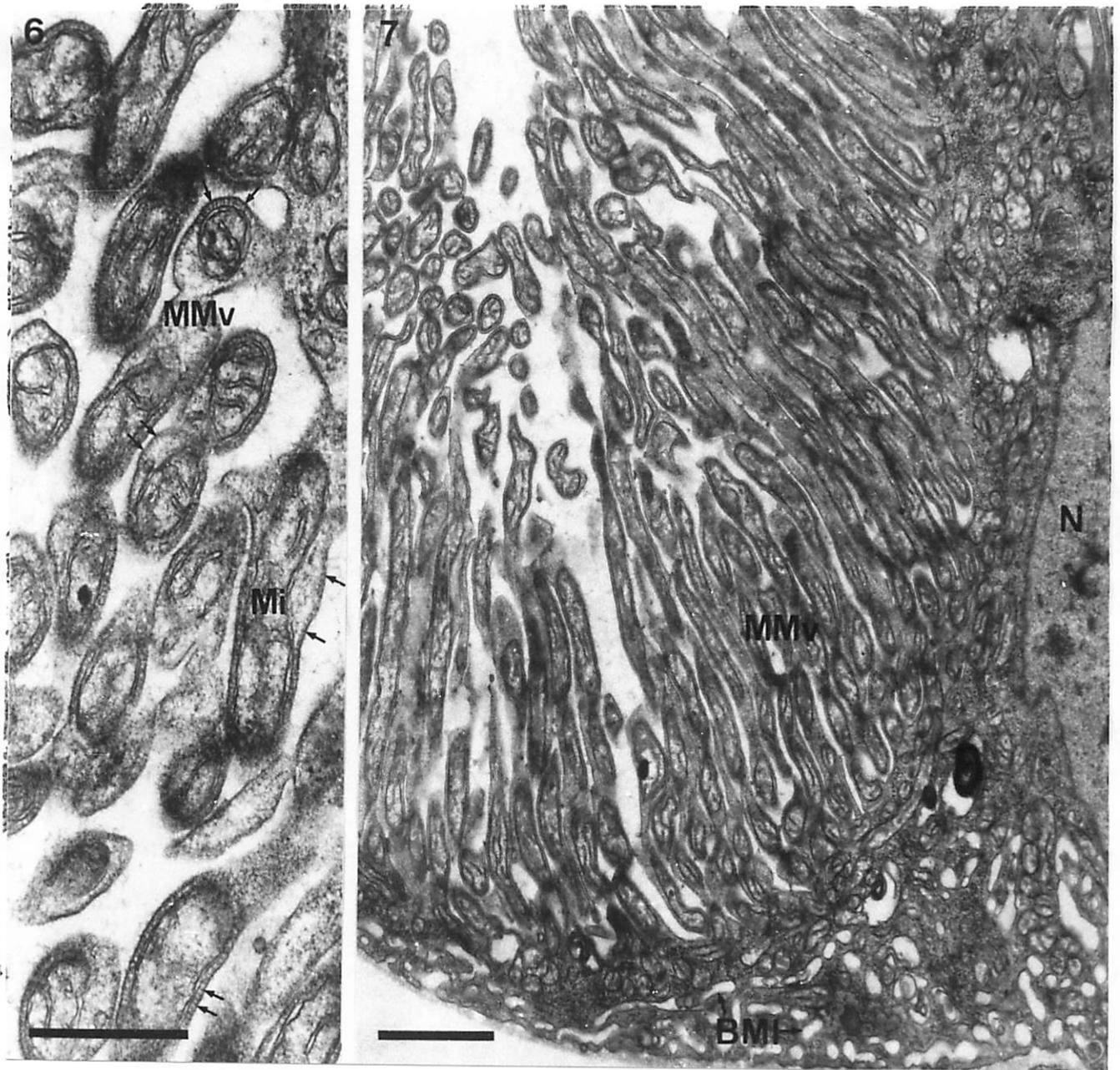


Figura 4 - Células caliciformes da região anterior do ventrículo da larva de *E. ello*. Abreviações como na Figura 31.

(4.6) Detalhe das microvilosidades modificadas com mitocôndrias em seu interior. Observar as partículas ao longo do lado citoplasmático da membrana (setas). Barra 0,5  $\mu\text{m}$  x 50.000. (4.7) Aspecto geral da célula caliciforme. Barra 1  $\mu\text{m}$  x 19.000.

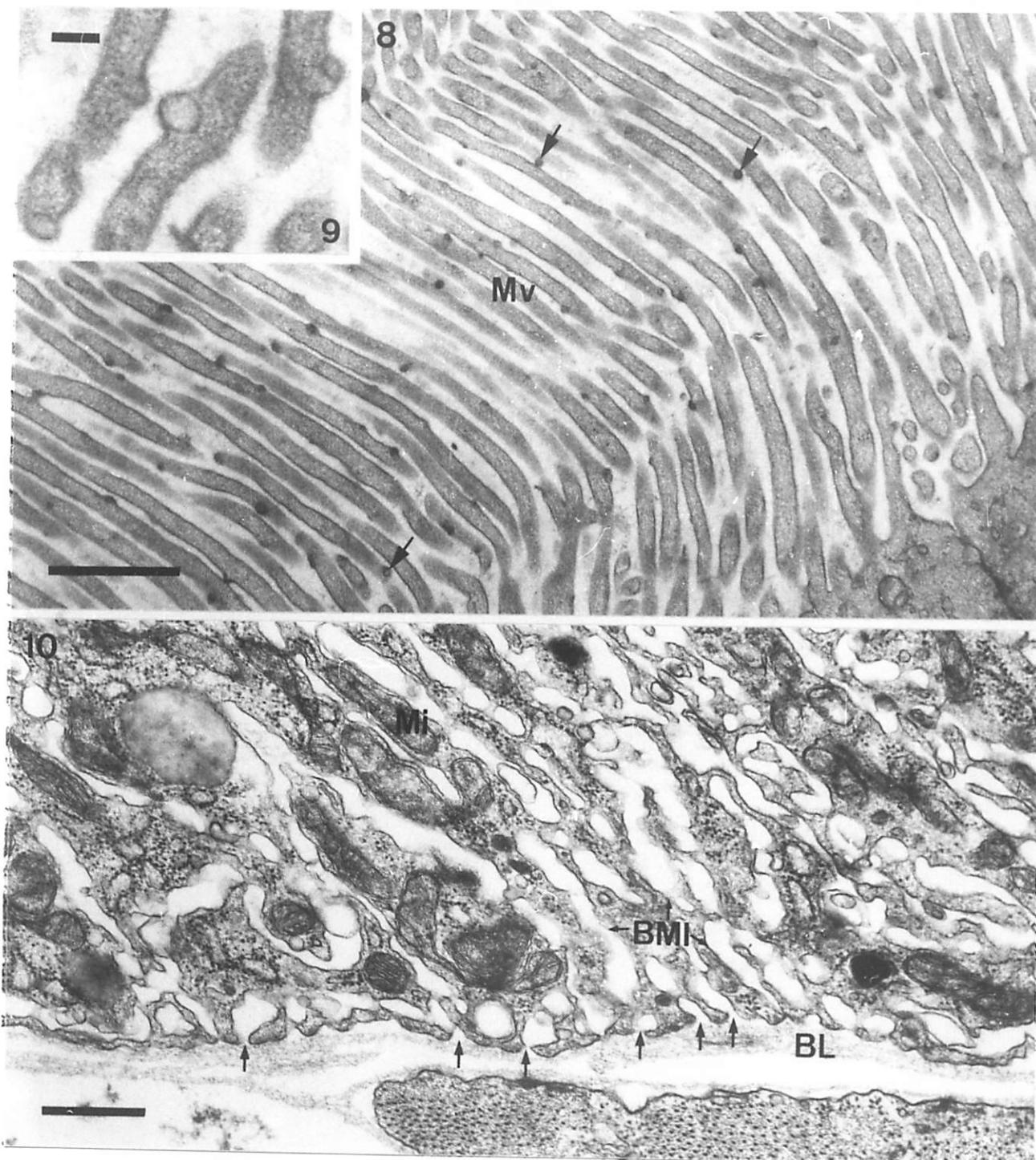


Figura 5 - Células colunares da região posterior do ventrículo da larva de *E. ello*. Abreviações como na Figura 31.

(5.8) Aspecto das microvilosidades mostrando as vesículas brotantes (setas). Barra  $1\ \mu\text{m}$  x 22.000. (5.9) Detalhe de uma vesícula brotante. Barra  $0,1\ \mu\text{m}$  x 80.000. (5.10) Aspecto da membrana plasmática basal apresentando invaginações bastante desenvolvidas e com muitas aberturas para o espaço subjacente. Barra  $0,5\ \mu\text{m}$  x 35.000.

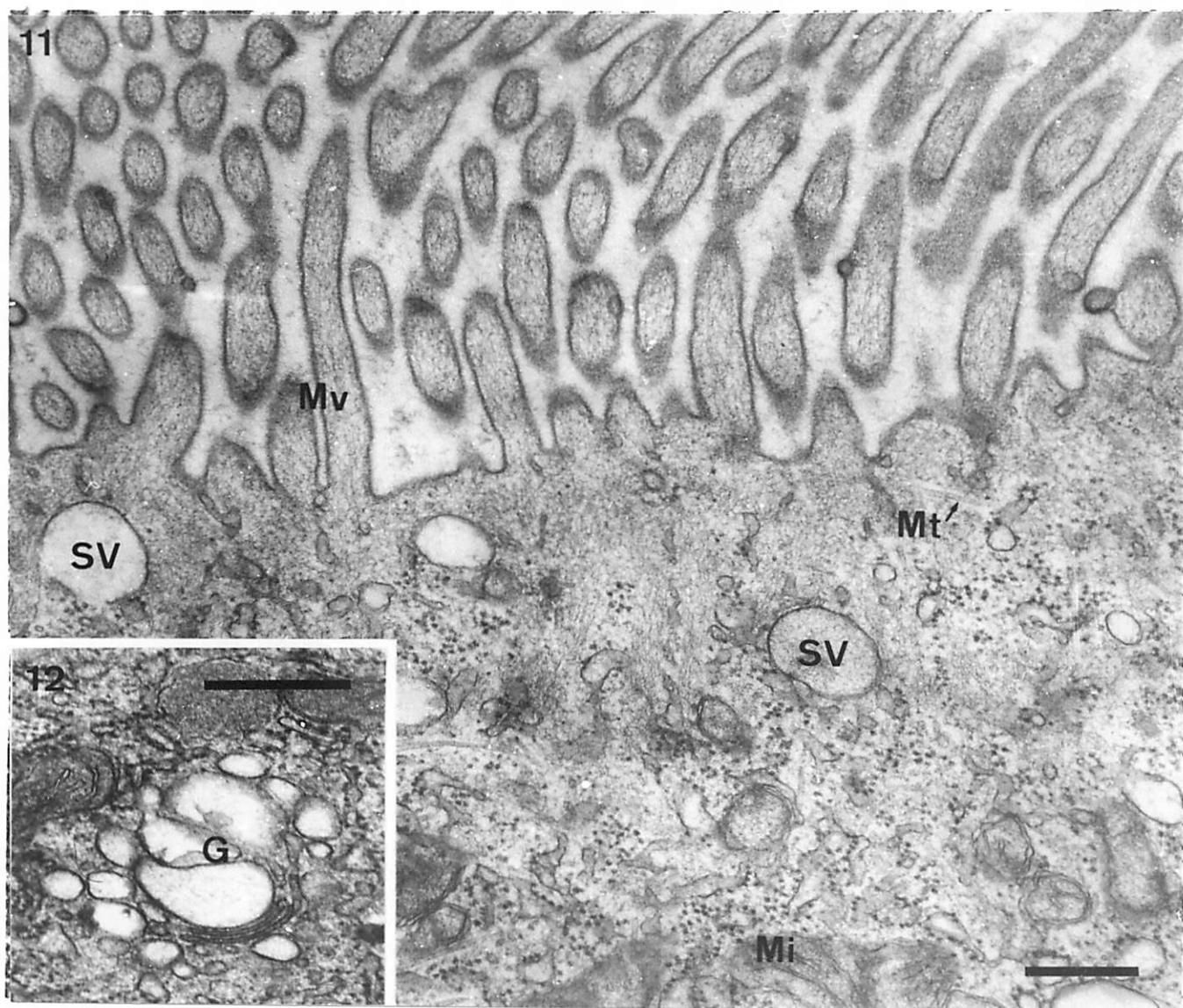


Figura 6 - Célula colunar da região posterior do ventrículo da larva de *E. ello*. Abreviações como na Figura 31.

(6.11) Aspecto do citoplasma apresentando vesículas de secreção. Barra 1  $\mu$ m x 17.000. (6.12) Complexo de Golgi com grandes vesículas associadas. Barra 0,5  $\mu$ m x 45.000.

gião anterior são observadas na região posterior do ventrículo.

### Células caliciformes:

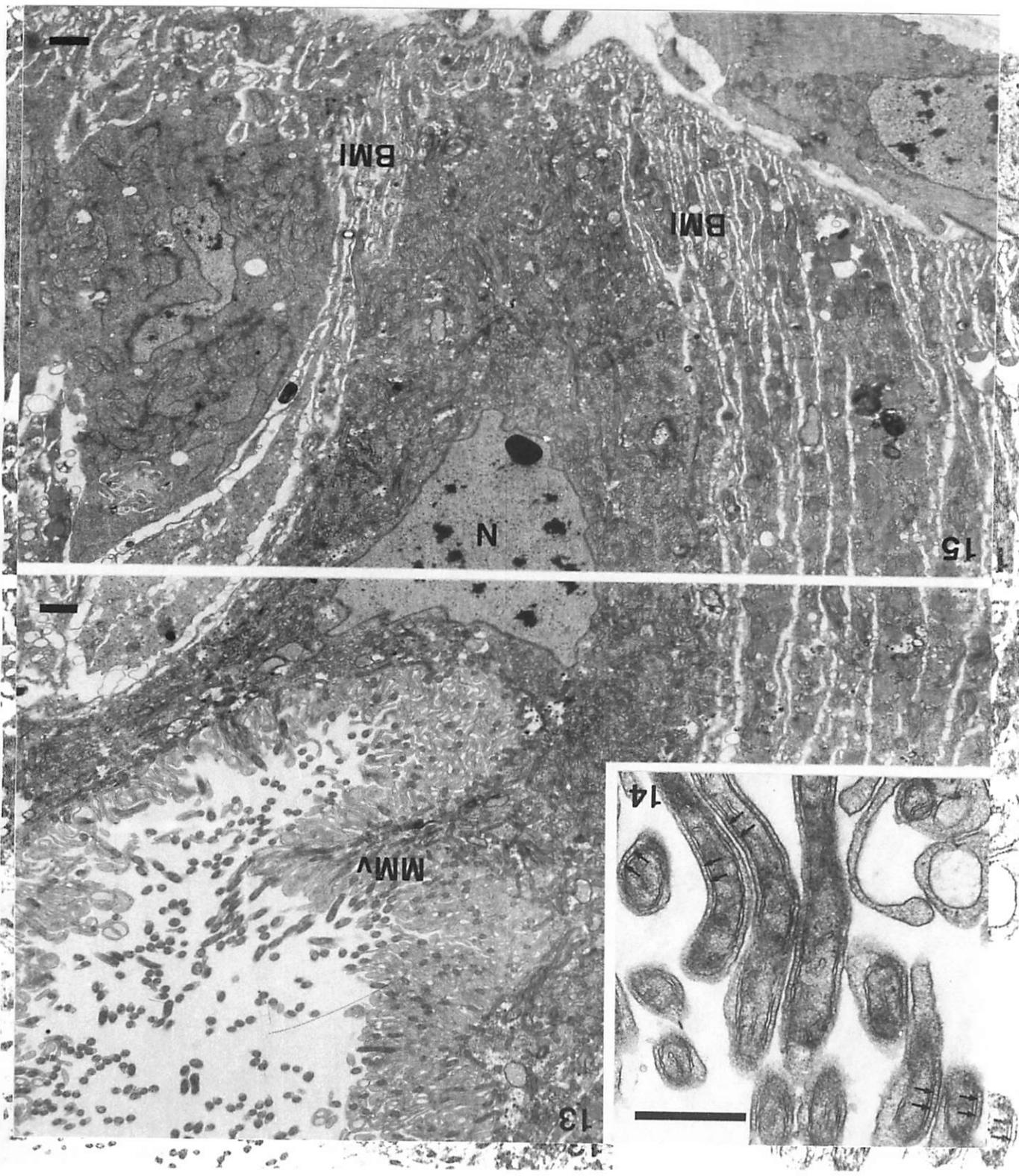
As células caliciformes apresentam uma grande cavidade, formada pela invaginação da membrana plasmática apical, na parte superior da célula. Esta cavidade abre-se através de uma válvula, diretamente para o lúmen do intestino e sua membrana apresenta numerosas microvilosidades modificadas que podem ou não conter mitocôndrias (Figuras 7.13 e 7.14). Quando as mitocôndrias estão presentes, elas ocorrem principalmente na parte apical das microvilosidades. O lado citoplasmático das membranas das microvilosidades que contém mitocôndrias é revestido por botões (Figura 7.14). A parte basal da célula é formada por um pedúnculo de citoplasma, que contém o núcleo, um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e muitos ribossomos livres. A membrana plasmática basal apresenta canais estreitos com mais aberturas para o espaço subjacente do que as encontradas nas células caliciformes da região anterior. As mitocôndrias estão associadas com essas invaginações, embora elas sejam mais abundantes na base das microvilosidades modificadas.

### 3.1.7. Centrifugação diferencial de homogeneizados de células do ventrículo de *E. ello*

#### 3.1.7.1. Marcadores enzimáticos de frações subcelulares

Ventrículos de larvas de *E. ello* foram homogeneizados usando-se um homogeneizador do tipo Dounce (10 movimentos de pistão) ou do tipo Omni-mixer (Sorvall) a 5.000 rpm por 2 períodos de 15 s. nos seguintes meios: (a) KCl 125 mM, pH 7,0; (b) EDTA 5 mM em KCl 115 mM, pH 7,0; (c) manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM, pH 7,1. As atividades enzimáticas distribuem-se entre as dife-

Figura 7 - Célula caliciforme da região posterior do ventrículo da larva de *E. elle*. Abreviações como na Figura 31. (7.13) Aspecto da região apical da célula caliciforme e das células columnares vizinhas. Barra 1  $\mu\text{m} \times 7.000$ . (7.14) Detalhe das microvilosidades modificadas. Observar as partículas (setas) do lado citoplasmático da membrana das microvilosidades modificadas que contêm mitocôndrias. Barra 0,5  $\mu\text{m} \times 40.000$ . (7.15) Aspecto da região basal da célula caliciforme e das células columnares vizinhas. Barra 1  $\mu\text{m} \times 7.000$ .



rentes frações subcelulares de forma similar em todas as condições de homogeneização utilizadas. Entretanto, a recuperação das enzimas foi maior, e os resultados mais reproduzíveis, quando os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador tipo Dounce em manitol-EDTA-tampão Tris. Devido a isso essas condições foram escolhidas como rotina.

A fosfatase alcalina ocorre principalmente nas frações particuladas, sendo que pequenas quantidades foram encontradas na fração solúvel das células ventriculares das larvas de *E. ello* (Figura 8). Estes resultados sugerem que a fosfatase alcalina do ventrículo das larvas de *E. ello* é ligada à membrana plasmática, como descrito para outros insetos (FERREIRA & TERRA, 1980; HANOZET et al., 1980). A fosfatase alcalina de *E. ello* ensaiada com p-nitrofenil fosfato ( $K_m$  1,7 mM) é inibida pelos inibidores competitivos lineares simples glicose-6-fosfato ( $K_i$  1,2 mM) e  $\beta$ -glicerolfosfato ( $K_i$  1,3 mM).

A glicose-6-fosfatase é usualmente usada como um marcador de retículo endoplasmático de células de mamífero, embora frequentemente sua atividade reflita fosfatases gerais e não específicas (EVANS, 1978). No ventrículo das larvas de *E. ello*, a distribuição intracelular da atividade de glicose-6-fosfatase (ensaiada em Tris/HCl pH 7,2) é idêntica àquela da fosfatase alcalina mostrada na Figura 8. A atividade sobre glicose-6-fosfato (concentração final, 5 mM) é completamente inibida por  $\beta$ -glicerolfosfato 63 mM da mesma forma que a fosfatase alcalina, ver acima, em tampão MOPS/HCl 15 mM, pH 6,2. Os resultados sugerem que o ventrículo de *E. ello* não contém uma glicose-6-fosfatase. A atividade de glicose-6-fosfatase observada parece ser devido à atividade de fosfatase alcalina.

A lactato desidrogenase (marcador de citossol, EVANS, 1978) e a succinato desidrogenase (marcador de mitocôndria, EVANS, 1978)

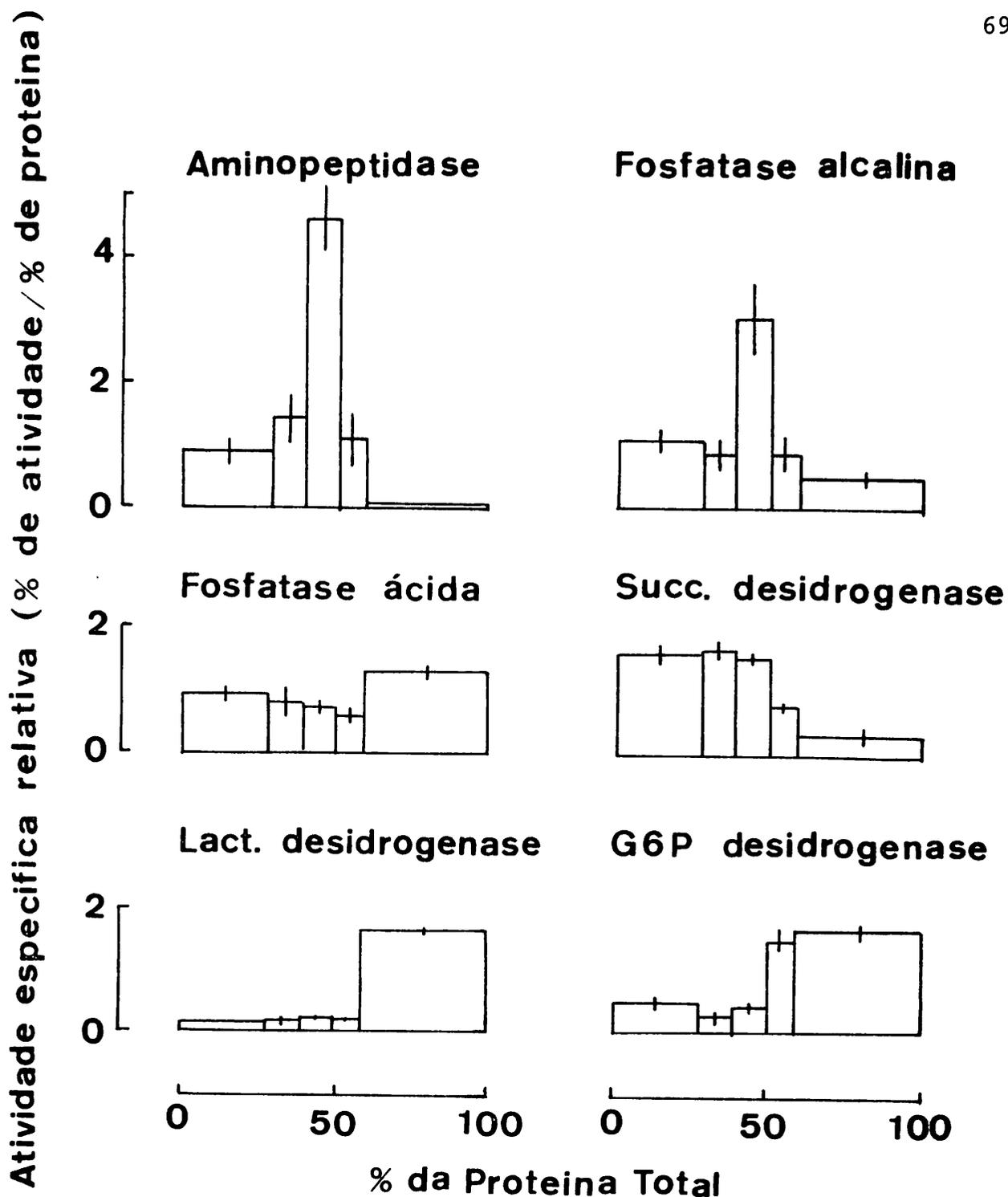


Figura 8 - Distribuição dos marcadores enzimáticos nas frações subcelulares do ventrículo da larva de *E. ello*.

Meio de homogeneização: Manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM, pH 7,1.

A atividade de G-6-P desidrogenase apresentada é a soma da atividade da G-6-P e 6-fosfogluconato desidrogenase. Os dados são apresentados de acordo com DE DUVE et al. (1955) (ver item 2.12) e são médias e desvios padrões da média baseado em determinações realizadas em 3 preparações independentes obtidas a partir de 2 larvas cada. As frações estão apresentadas da esquerda para a direita na ordem em que elas foram obtidas (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> e S respectivamente). A recuperação da atividade das hidrolases nas frações subcelulares foram de 80 a 110% da atividade do homogeneizado inicial. Detalhes em Materiais e Métodos e no texto.

foram determinadas com sucesso em *E. ello* (Figura 8). A glicose-6-fosfato desidrogenase (marcador de citossol, STRYER, 1981) foi também ensaiada. Entretanto, como pode ser observado na Figura 8, a glicose-6-fosfato desidrogenase apresenta uma atividade significativa na fração  $P_4$ , o que sugere a existência de uma enzima microssômica minoritária, além da enzima solúvel majoritária.

A fosfatase ácida é um marcador de lisossomos em alguns tecidos (p. ex. fígado de mamífero, EVANS, 1978). Contudo, a fosfatase ácida (usando p-nitrofenil fosfato como substrato) no ventrículo de *E. ello* é encontrada principalmente no citossol (Figura 8), como previamente descrito para o intestino médio de *R. americana* (FERREIRA & TERRA, 1980). As fosfatases ácidas de mamíferos são inibidas por fluoreto em extensões variadas dependendo do órgão estudado (LOJDA et al., 1979). A fosfatase ácida do citossol das células ventriculares de *E. ello* é inibida por fluoreto, que neste caso comporta-se como um inibidor não competitivo linear, com  $K_i$  de 0,8 mM e  $\alpha$  de 13.

### 3.1.8. Atividades enzimáticas nas diferentes regiões do ventrículo da larva de *E. ello*

Succinato desidrogenase e amilase são encontrados em maior quantidade na região anterior, enquanto que celobiase, maltase, trealase e tripsina ocorrem principalmente na região posterior do ventrículo da larva de *E. ello*. A região anterior do ventrículo apresenta mais mitocôndrias do que a região posterior (ver itens 3.1.6.2 e 3.1.6.3), o que concorda com a sua maior atividade de succinato desidrogenase. Aminopeptidase e lactato desidrogenase são encontradas com atividades (e atividades específicas) semelhantes nas duas regiões do ventrículo (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividades enzimáticas nas diferentes regiões do ventrículo de *E. ello*\*

| Enzimas                 | Ventrículo anterior |                | Ventrículo posterior |                |
|-------------------------|---------------------|----------------|----------------------|----------------|
|                         | mU/animal           | mU/mg proteína | mU/animal            | mU/mg proteína |
| Amilase                 | 2.400 ± 300         | 280 ± 30       | 660 ± 80             | 70 ± 4         |
| Aminopectidase          | 3.400 ± 200         | 400 ± 30       | 3.800 ± 600          | 410 ± 40       |
| Celbiase                | 240 ± 20            | 29 ± 3         | 500 ± 100            | 50 ± 10        |
| Lactato desidrogenase   | 9 ± 1               | 1,1 ± 0,1      | 9,9 ± 0,6            | 1,07 ± 0,03    |
| Maltase                 | 370 ± 40            | 43 ± 4         | 950 ± 100            | 102 ± 6        |
| Succinato desidrogenase | 210 ± 30            | 24 ± 3         | 71 ± 10              | 7,6 ± 0,6      |
| Trealase                | 290 ± 30            | 34 ± 3         | 450 ± 70             | 49 ± 7         |
| Tripsina                | 14 ± 3              | 1,7 ± 0,3      | 28 ± 6               | 2,9 ± 0,5      |

\* O ventrículo anterior é o primeiro terço, enquanto o ventrículo posterior é o último terço do ventrículo inteiro. Médias e desvios padrões da média foram baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 3 larvas cada.

### 3.1.9. Centrifugação diferencial de homogeneizados das células do ventrículo anterior e posterior de *E. ello*

Os marcadores enzimáticos utilizados neste estudo foram: lactato desidrogenase e succinato desidrogenase. Glicose-6-fosfato desidrogenase e fosfatase ácida foram abandonados porque os resultados anteriores (item 3.1.7.1) mostraram que essas enzimas ocorrem em mais do que um compartimento celular. Os ensaios de fosfatase alcalina foram também abandonados depois que ficou demonstrado que a aminopectidase (enzima mais ativa que fosfatase alcalina) possui a mesma distribuição intracelular que a fosfatase alcalina (ver Figura 8).

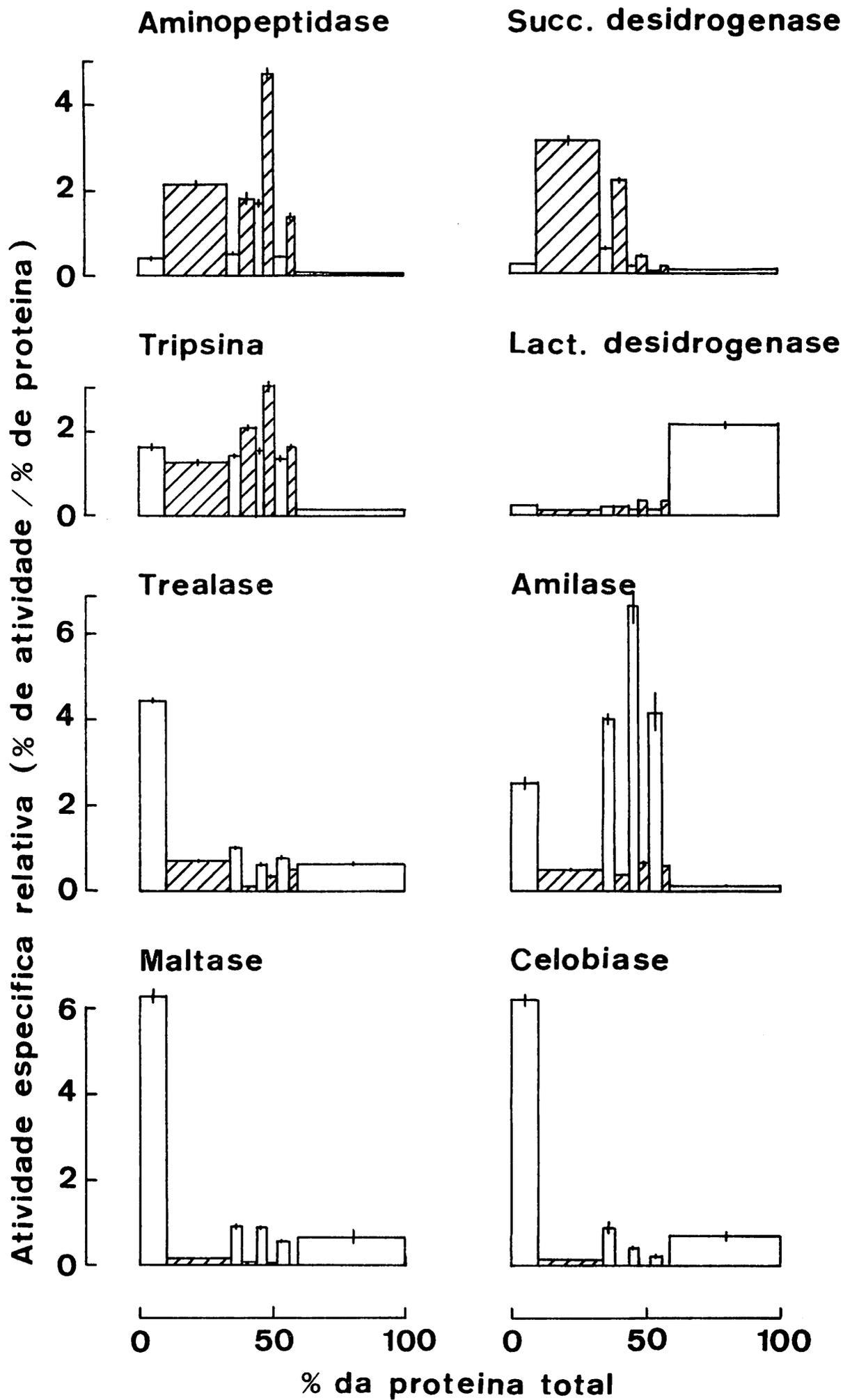
A distribuição intracelular das enzimas nas células do ventrículo anterior é mostrada na Figura 9 e as micrografias eletrônicas das frações aparecem nas Figuras 11C a 11F. A fração  $P_1$  é caracterizada principalmente por grandes vesículas apresentando microvilosidades (derivadas das células colunares), núcleos celulares, grandes fragmentos de células caliciformes e uma grande quantidade de mitocôndrias (Figura 11C). A fração  $P_2$  apresenta mitocôndrias, microvilosidades de células colunares e algumas vesículas de secreção (Figura 11D). A fração  $P_3$  mostra perfis de membranas que parecem derivar das microvilosidades das células colunares (Figura 11E), enquanto na fração  $P_4$  observam-se microssomos típicos, juntamente com algumas pequenas vesículas semelhantes àquelas que brotam ao longo das microvilosidades das células colunares (Figura 11F).

A aminopeptidase é encontrada em grandes quantidades nas frações  $P_1$  e  $P_3$  (onde ela está enriquecida mais do que 4 vezes), o que sugere que esta enzima esteja ligada às membranas das microvilosidades das células colunares. A amilase e a tripsina ocorrem apenas nas frações particuladas e apresentam atividades específicas maiores em  $P_3$ : a amilase como enzima solúvel e a tripsina como enzima ligada a membrana (Figura 9). As dissacaridases celobiase, maltase e trealase são enzimas solúveis encontráveis principalmente em  $P_1$  e no sobrenadante final (Figura 9).

A distribuição intracelular das enzimas nas células do ventrículo posterior é semelhante à obtida nas células da região anterior, exceto para amilase, tripsina e succinato desidrogenase (Figura 10). A última enzima está enriquecida na fração  $P_2$ , em vez da fração  $P_1$ , de acordo com o fato de que as mitocôndrias são menores nas células caliciformes posteriores do que nas células caliciformes anteriores (Figura 10 e comparar Figuras 4.6 e 4.7 com Figuras 7.13 e 7.14). A amilase e tripsina são encontradas principalmente

Figura 9 - Distribuição das hidrolases nas frações subcelulares das células da região anterior do ventrículo da larva de *E. ello*.

Meio de homogeneização: Manitol 215 mM, EDTA 5 mM em tampão Tris/HCl 5 mM, pH 7,1. Os marcadores enzimáticos das frações subcelulares foram: aminopeptidase, membrana plasmática; succinato desidrogenase, mitocôndrias; lactato desidrogenase, citossol. Os dados são apresentados de acordo com DE DUVE et al. (1955) (ver ítem 2.12) e são médias e desvios padrões da média obtidos de determinações realizadas em 3 preparações independentes obtidas a partir de 3 larvas cada. Após a centrifugação diferencial (ver ítem 2.12), as frações foram rehomogeneizadas, submetidas a congelamentos e descongelamentos sucessivos e centrifugadas a 100.000 x g, 60 min., 4°C. O sobrenadante e o sedimento das frações estão apresentados da esquerda para a direita na ordem em que eles foram obtidos (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> e S respectivamente). As áreas claras correspondem aos sobrenadantes e as áreas hachuradas, aos sedimentos de cada fração. A recuperação da atividade das hidrolases nas frações subcelulares foram de 80 a 110% da atividade presente no homogeneizado inicial. Detalhes em Materiais e Métodos e no texto.



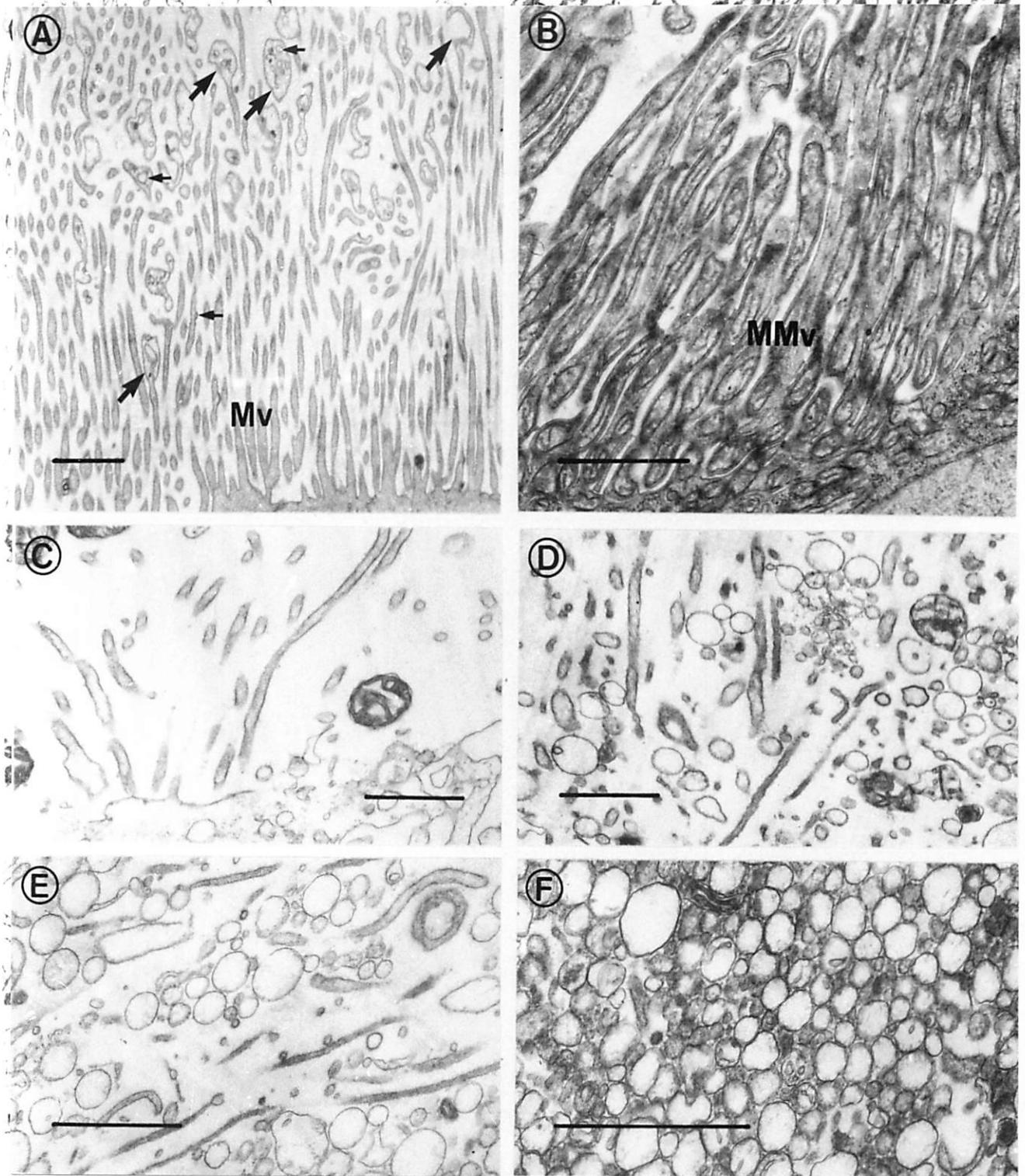


Figura 11 - (A) Célula colunar da região anterior do ventrículo de *E. ello*. Notar as vesículas destacantes (setas grandes) e vesículas brotantes (setas pequenas) nas microvilosidades (Mv); (B) Célula caliciforme da região anterior do ventrículo de *E. ello* apresentando microvilosidades modificadas (MMv); (C) a (F) Frações obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizados de ventrículos anteriores como detalhado na Figura 9. (C) Fração P<sub>1</sub>. (D) Fração P<sub>2</sub>. (E) Fração P<sub>3</sub>. (F) Fração P<sub>4</sub>. x 12.000 (A); x 22.000 (B); x 17.500 (C); x 17.000 (D); x 22.500 (E); x 33.000 (F). Barra 1  $\mu$ m.

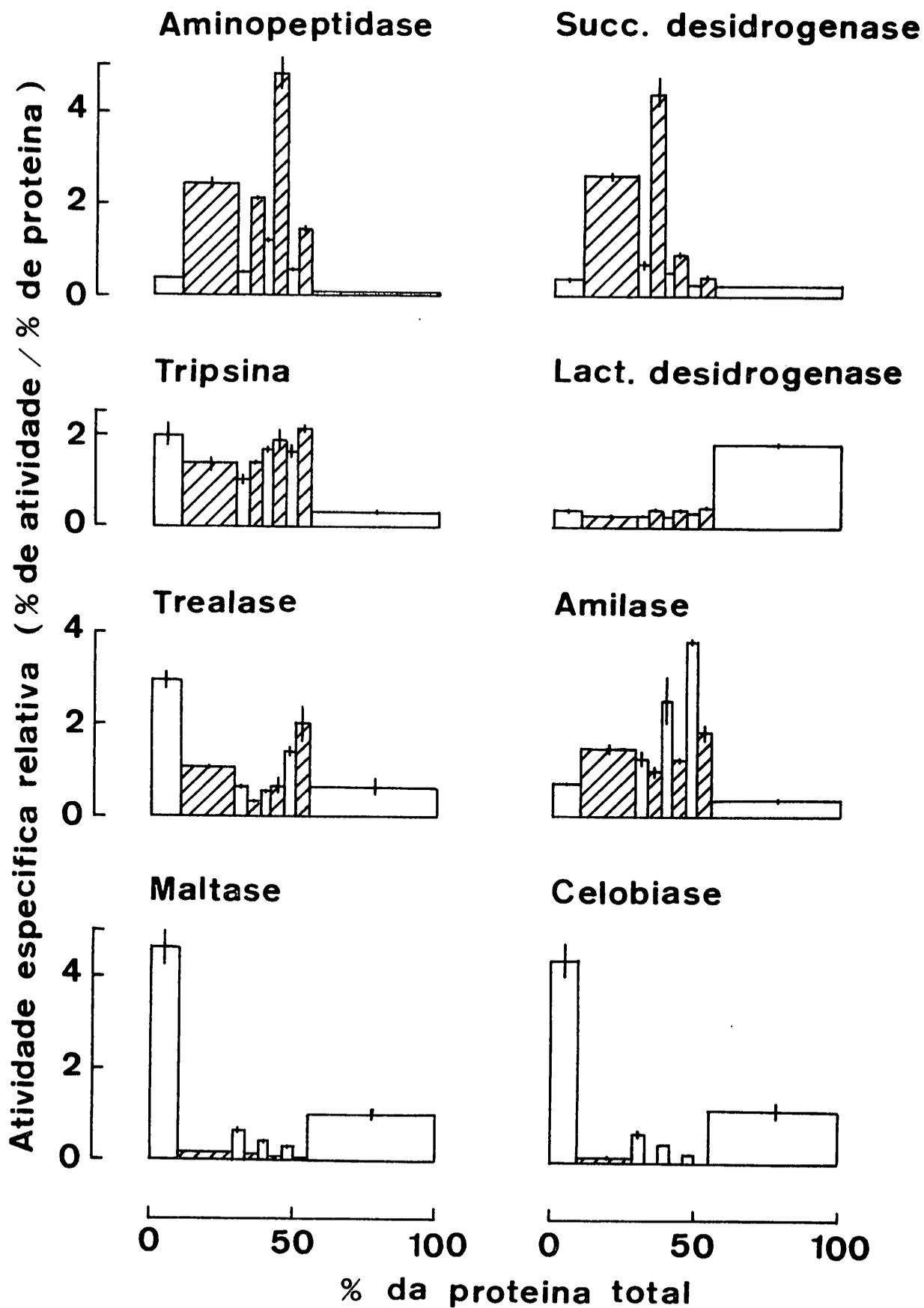


Figura 10 - Distribuição das hidrolases nas frações subcelulares das células da região posterior do ventrículo das larvas de *E. ello*. Outros detalhes como na legenda da Figura 9.

em P<sub>4</sub>. O aspecto das frações das células do ventrículo posterior (Figuras 12A - 12D) é semelhante ao aspecto das frações das células do ventrículo anterior, exceto que a fração P<sub>2</sub> é mais rica em vesículas de secreção (Figura 12B), a fração P<sub>3</sub> apresenta microvilosidades mais reconhecíveis de células colunares (Figura 12C) e a fração P<sub>4</sub> é mais rica em vesículas semelhantes àquelas que brotam ao longo das microvilosidades das células colunares (Figura 12D).

Os resultados para tripsina foram iguais quer a sua atividade fosse determinada com BAPA ou com albumina como substrato. A atividade de amilase foi determinada medindo-se o aparecimento de grupos redutores (ver Ítem 2.20) e, de acordo com um experimento controle, não há o aparecimento de glicose no meio de incubação. Essa observação descarta a possibilidade de haver uma  $\gamma$ -amilase ligada a membrana. Esses resultados sustentam a hipótese de que pelo menos parte da amilase e da tripsina são realmente ligadas a membrana e não devem ser artefatos. Outros dados que levam à mesma conclusão foram obtidos estudando a fração P<sub>3</sub> da centrifugação diferencial de homogeneizados de ventrículo. Nessa fração, a atividade específica da amilase, e da tripsina permanece constante após várias lavagens em meio com baixa força iônica (primeira e segunda lavagens, Tabela 10). Por outro lado, a lavagem em um meio com alta força iônica (terceira lavagem, Tabela 10) diminui a atividade específica da amilase, enquanto que a atividade específica da tripsina permanece aproximadamente constante (Tabela 10). Contudo, mesmo após a terceira lavagem, a atividade específica da amilase permanece alta, se comparada com a atividade específica da celobiase. A lavagem da fração P<sub>3</sub> da centrifugação diferencial com borato de sódio 0,8 M pH 6,0, manose 0,5 M, galactose 0,5 M ou glicose 0,5 M em água não leva a uma solubilização significativa de amilase e tripsina.

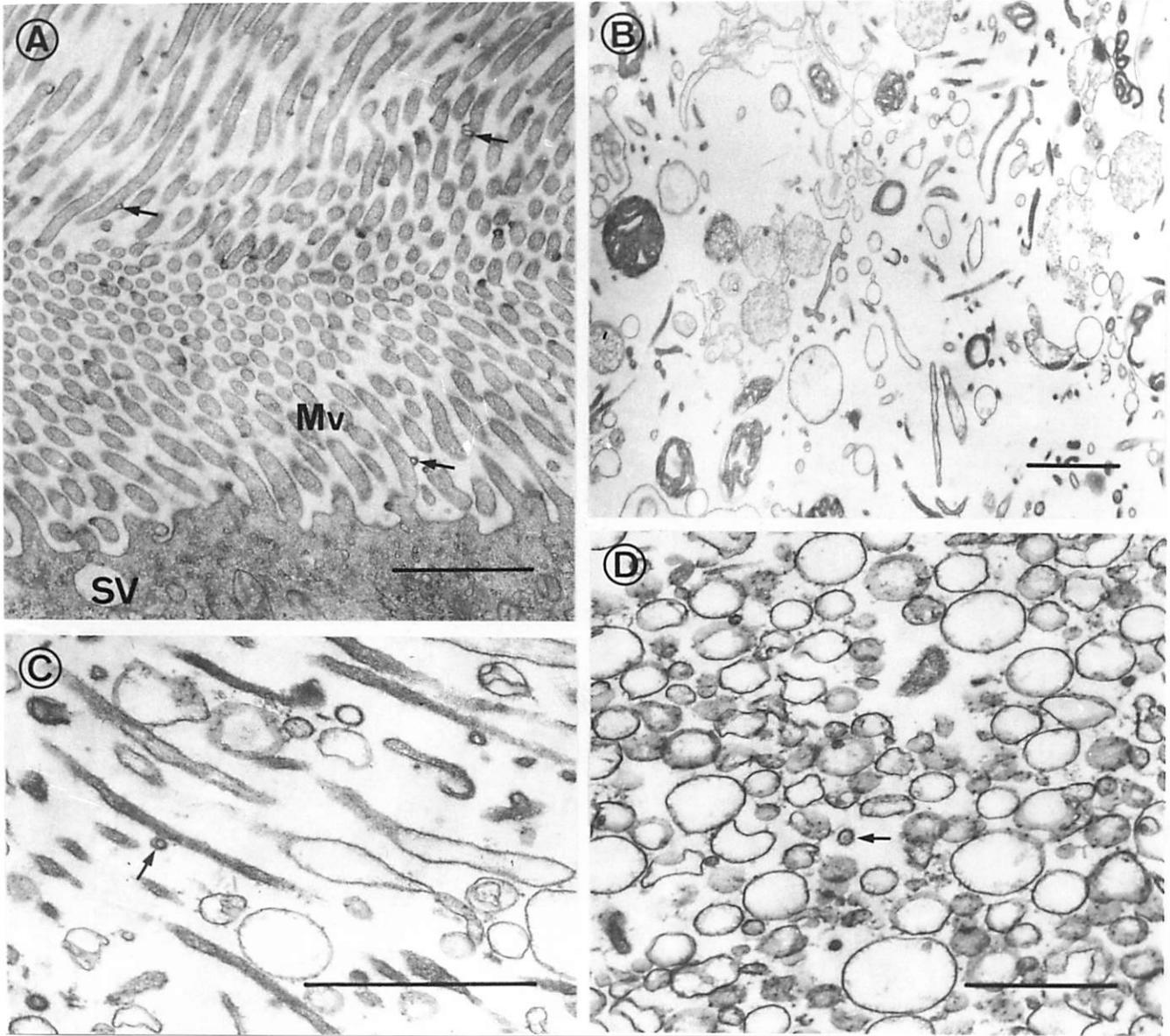


Figura 12 - (A) Célula colunar da região posterior do ventrículo de *E. ello*. (B) Fração P<sub>2</sub>, (C) Fração P<sub>3</sub>, (D) Fração P<sub>4</sub> obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizados de ventrículos posteriores como detalhado na Figura 9. Notar as vesículas brotantes (setas) e as vesículas secretoras (SV). x 21.000 (A); x 14.000 (B); x 35.000 (C); x 23.000 (D). Barra 1 μm.

Tabela 10 - Atividades específicas das hidrolases na fração de membrana das células do ventrículo após lavagens em diferentes condições\*

| Enzimas        | Antes da lavagem | Após primeira lavagem | Após segunda lavagem | Após terceira lavagem | Atividade nas membranas lavadas (% homogeneizado)** |
|----------------|------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---|
| Amilase        | 270 ± 3          | 290 ± 8               | 210 ± 7              | 90 ± 1                | 20 ± 0,2  |
| Aminopectidase | 620 ± 60         | 740 ± 70              | 750 ± 80             | 820 ± 90              | 100 ± 10  |
| Celobiase      | 14 ± 0,2         | 10 ± 0,1              | 9 ± 0,01             | 3 ± 0,1               | 4 ± 0,2   |
| Tripsina       | 2,6 ± 0,1        | 2,6 ± 0,1             | 2,4 ± 0,05           | 2,1 ± 0,02            | 31 ± 0,3  |

\* Os resultados são atividades específicas em mUnidades/mg proteína. As médias e os desvios padrões da média foram baseados em determinações realizadas em duas preparações obtidas a partir de 4 larvas cada. A primeira e segunda lavagens foram realizadas dispersando o sedimento (Fração P<sub>3</sub>, preparada como descrito no item 2.12) com um homogeneizador Potter-Elvehjem em tampão Tris/HCl 5 mM pH 7,1, EDTA 5 mM e manitol 215 mM, seguido por centrifugação da suspensão a 25.000 x g por 30 min. a 4°C. A terceira lavagem foi realizada dispersando o sedimento em KCl 125 mM, pH 7,0 e centrifugando a suspensão a 25.000 x g por 30 min a 4°C.

\*\* As atividades totais nas membranas lavadas (média e desvios padrões da média, 2 determinações) foram calculadas a partir das atividades determinadas nas preparações de membranas lavadas, levando-se em consideração as recuperações reais das diferentes preparações estimadas pelas recuperações (30 ± 3%) da aminopectidase, que é encontrada somente na membrana das microvilosidades (ver texto).

### 3.1.10. Preparação de microvilosidades por precipitação diferencial com cálcio

Homogeneizados de células ventriculares anteriores e pos-

teriores foram tratadas com cálcio (item 2.9). A centrifugação a baixa rotação desses homogeneizados resulta na sedimentação de mitocôndrias, estruturas membranosas com partículas (provavelmente derivadas das microvilosidades modificados das células caliciformes) e de outras estruturas não identificadas (Figura 13b). A centrifugação dos sobrenadantes resultantes a uma rotação maior sedimenta principalmente vesículas que não apresentam partículas em suas membranas (Figura 13c). Essas vesículas são provavelmente derivadas das microvilosidades das células colunares.

A aminopeptidase, fosfatase alcalina e amilase são as únicas enzimas que estão enriquecidas na fração de microvilosidades, tanto do ventrículo anterior quanto do ventrículo posterior. A atividade específica da tripsina no homogeneizado inicial e na fração de microvilosidades permanece constante (Tabelas 11 e 12). Esses resultados sugerem fortemente que pelo menos parte da amilase (e com menos certeza também da tripsina) estão presentes nas membranas das microvilosidades das células colunares.

Afim de confirmar as observações anteriores (item 3.1.9), e as sugestões acima, de que pelo menos parte da amilase e da tripsina estariam ligadas a membrana plasmática, o seguinte experimento foi realizado. Microvilosidades purificadas de ventrículo inteiro, como descrito acima, foram tratadas com tampão Tris/HCl 0,8 M pH 7,0 antes de serem ultracentrifugadas em um gradiente descontínuo de glicerol. O tratamento de preparações de microvilosidades com soluções hiperosmóticas de Tris usualmente libera as membranas das microvilosidades de sua porção filamentosa central (EICHHOLZ & CRANE, 1965; OVERTON et al., 1965; SCHIMITZ et al., 1973). A atividade específica da amilase e da tripsina ao longo do gradiente é maior nas fases combinadas, acompanhando as atividades de fosfatase alcalina e aminopeptidase (Tabela 13).

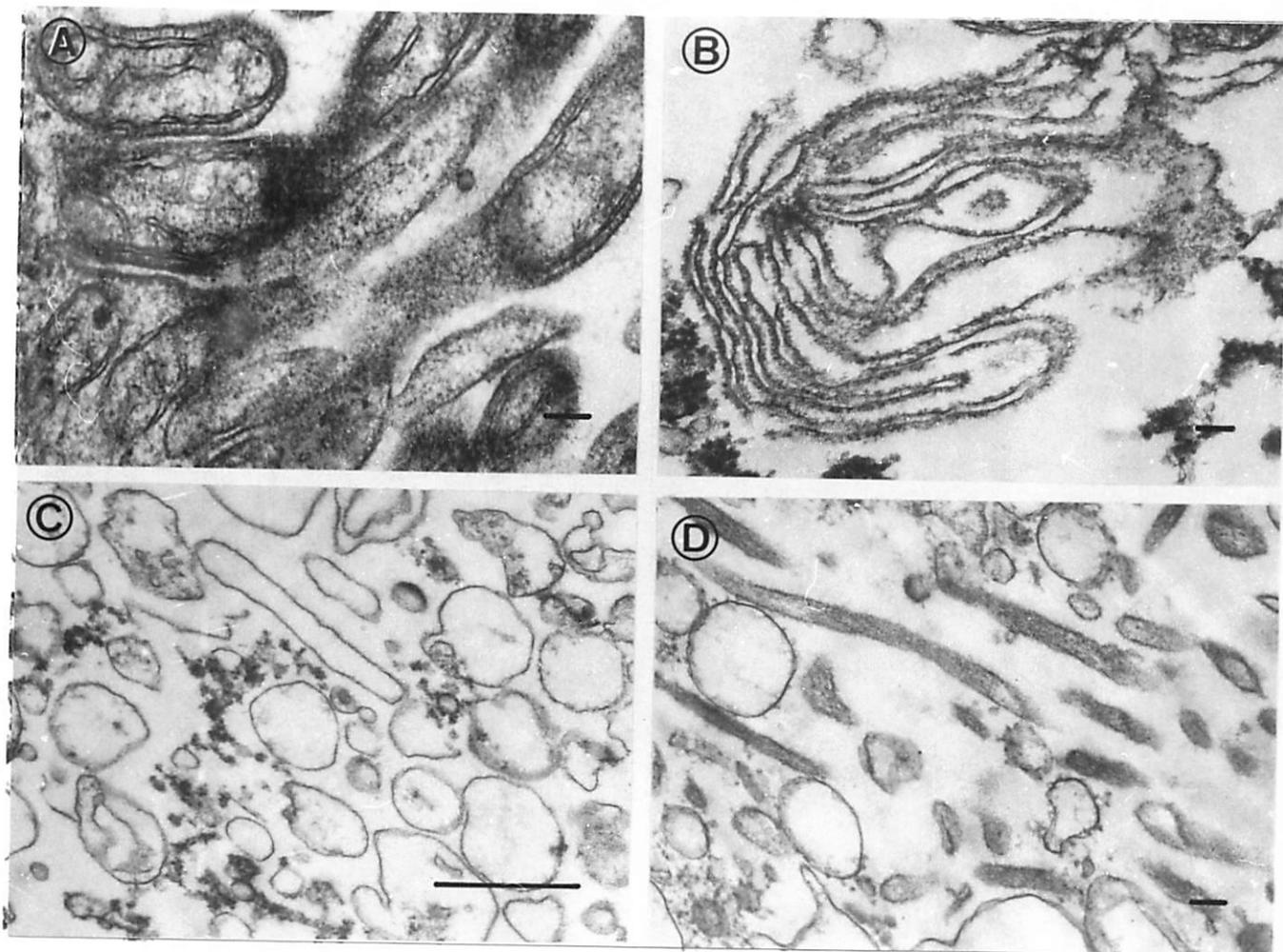


Figura 13 - (A) Detalhe das microvilosidades modificadas das células caliciformes. Notar as partículas ao longo do lado citoplasmático da membrana. (B) e (C) Frações obtidas por precipitação diferencial com cálcio a partir de homogeneizados de ventrículos anteriores. (B) Material agregado por cálcio. Notar as membranas com partículas. (C) Material sedimentado a partir do sobrenadante correspondente do material agregado por cálcio. (D) Microvilosidades preparadas por sonicação a partir das células colunares do ventrículo anterior. x 60.000 (A); x 53.000 (B); x 20.000 (C); x 48.000 (D). Barra 0,1  $\mu$ m (A, B e D); 1  $\mu$ m (C).

Tabela 11 - Enzimas presentes em homogeneizados e em microvilosidades das células do epitélio ventricular anterior, obtidas por precipitação diferencial por cálcio\*

| Enzima                  | Homogeneizado |       |               | Microvilosidade |        |               |
|-------------------------|---------------|-------|---------------|-----------------|--------|---------------|
| Amilase                 | 200           | ± 10  | (2.600 ± 250) | 360             | ± 40   | ( 900 ± 100)  |
| Aminopectidase          | 300           | ± 50  | (5.000 ± 200) | 1.600           | ± 200  | (4.000 ± 100) |
| Celobiase               | 20            | ± 1   | ( 300 ± 30)   | 5               | ± 1    | ( 13 ± 1)     |
| Fosfatase alcalina      | 160           | ± 10  | (2.000 ± 300) | 900             | ± 200  | (2.200 ± 300) |
| Lactato desidrogenase   | 4             | ± 0,5 | ( 40 ± 5)     | 1,2             | ± 0,3  | ( 4 ± 0,5)    |
| Maltase                 | 40            | ± 8   | ( 600 ± 100)  | 10              | ± 1    | ( 25 ± 4)     |
| Succinato desidrogenase | 10            | ± 0,4 | ( 130 ± 10)   | 5               | ± 0,4  | ( 14 ± 1)     |
| Trealase                | 14            | ± 0,2 | ( 200 ± 20)   | 7               | ± 1    | ( 16 ± 2)     |
| Tripsina                | 1,3           | ± 0,1 | ( 20 ± 3)     | 1,2             | ± 0,04 | ( 3 ± 0,4)    |

\* Os resultados são atividades específicas expressas em mUnidades/mg proteína e atividades (entre parênteses) expressas em mUnidades/animal. A atividade enzimática das microvilosidades foram calculadas a partir da atividade determinada nas preparações de microvilosidades purificadas, levando em consideração a recuperação das diferentes preparações, estimadas pela recuperação (34 ± 5%) de fosfatase alcalina, a qual é encontrada somente na membrana das microvilosidades das células do epitélio ventricular de vários insetos. (ver texto). Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

Tabela 12 - Enzimas presentes em homogeneizados e em microvilosidades das células do epitélio ventricular posterior, obtidas por precipitação diferencial por cálcio\*

| Enzima                  | Homogeneizado |               | Microvilosidade |               |
|-------------------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|
| Amilase                 | 50 ± 3        | ( 700 ± 60)   | 120 ± 20        | ( 300 ± 30)   |
| Aminopectidase          | 400 ± 30      | (5.200 ± 500) | 1.900 ± 200     | (5.000 ± 500) |
| Celobiase               | 40 ± 3        | ( 500 ± 40)   | 10 ± 2          | ( 30 ± 2)     |
| Fosfatase alcalina      | 260 ± 10      | (3.200 ± 250) | 1.200 ± 160     | (3.200 ± 250) |
| Lactato desidrogenase   | 4 ± 0,3       | ( 40 ± 6)     | 1 ± 0,1         | ( 5 ± 1)      |
| Maltase                 | 80 ± 2        | (1.000 ± 60)  | 20 ± 2          | ( 60 ± 4)     |
| Succinato desidrogenase | 3 ± 1         | ( 30 ± 8)     | 1 ± 0,1         | ( 7 ± 2)      |
| Trealase                | 15 ± 1        | ( 200 ± 20)   | 20 ± 1          | ( 60 ± 5)     |
| Tripsina                | 3 ± 0,3       | ( 40 ± 6)     | 3 ± 0,1         | ( 9 ± 1)      |

\* Detalhes como na legenda da Tabela 11, considerando a recuperação de fosfatase alcalina igual a 26 ± 4%.

Tabela 13 - Ultracentrifugação de microvilosidades purificadas após tratamento com Tris 0,8 M pH 7,0 em gradiente descontínuo de glicerol\*

| Enzimas                 | Microvilosidade purificada | Interfase 37 - 40% | Interfase 40 - 42% | Interfase 42 - 45% | Interfase 45 - 60% | Fases combinadas | Sedimento  |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------|
| Amilase                 | 500 ± 3                    | 180 ± 10           | 110 ± 10           | 160 ± 20           | 180 ± 20           | 190 ± 20         | 190 ± 30   |
| Aminopectidase          | 1950 ± 100                 | 2100 ± 250         | 720 ± 10           | 1300 ± 20          | 1400 ± 100         | 3400 ± 500       | 1600 ± 100 |
| Fosfatase alcalina      | 970 ± 40                   | 660 ± 130          | 880 ± 170          | 1000 ± 70          | 1000 ± 120         | 1100 ± 180       | 560 ± 60   |
| Succinato desidrogenase | 7 ± 0,3                    | 11 ± 0,3           | 12 ± 0,3           | 31 ± 0,1           | 25 ± 0,1           | 9 ± 0,1          | 8 ± 0,1    |
| Tripsina                | 2 ± 0,1                    | 2,8 ± 0,2          | 1,9 ± 0,2          | 2,5 ± 0,03         | 3 ± 0,3            | 3 ± 0,2          | 2,8 ± 0,3  |

\* Os resultados são atividades específicas expressas em mUnidades/mg proteína. Uma amostra de microvilosidades purificadas foi suspensa em tampão Tris/HCl 0,8 M pH 7,0. Após 60 min. a 4°C, 0,5 ml da suspensão foi aplicada no topo do gradiente descontínuo (5 camadas) de glicerol. O gradiente foi centrifugado a 62.000 x g por 15 min. a 4°C. As zonas do gradiente correspondentes às interfases, à solução remanescente (fases combinadas) e o sedimento no fundo do tubo foram coletados. As médias e os desvios padrões da média foram baseados em duas determinações realizadas em uma preparação obtida a partir de 8 larvas. Maiores detalhes em Materiais e Métodos.

### 3.1.11. Preparação de microvilosidades por sonicação

A sonicação das células do ventrículo anterior resulta no vazamento da maioria do citossol (julgado pela atividade de lactato desidrogenase), enquanto que a maioria das mitocôndrias (inferido pela atividade de succinato desidrogenase) permanece nas células (Tabelas 14 e 15). A aminopeptidase é enriquecida em torno de 4 vezes na fração  $S_3$ , que apresenta perfis de membranas semelhantes àsquelas das microvilosidades das células colunares (Figura 13D). Este resultado é uma evidência a mais que a aminopeptidase é ligada à membrana das microvilosidades das células colunares. Quantidades significativas de celobiase são recuperadas apenas no tecido remanescente após a sonicação ( $S_1$ ) e no material vazado das células ( $S_4$ ) (Tabela 14). Estes resultados concordam com aqueles obtidos por centrifugação diferencial, onde a celobiase foi encontrada associada a grandes estruturas ( $P_1$ ) e no citossol (S) (Figuras 9 e 10). A amilase e a tripsina apresentam maior atividade específica na fração  $S_3$  (Tabelas 14 e 15). A diluição de uma amostra da fração  $S_3$  com água, seguido de vários ciclos de congelamento e descongelamento e ultracentrifugação ( $100.000 \times g$ , 60 min.,  $4^\circ C$ ), torna a maioria da amilase recuperável no sobrenadante ( $95 \pm 1\%$  com uma atividade específica de  $2.500 \pm 200$  mU/mg de proteína, 3 determinações) e a tripsina, no sedimento ( $78 \pm 4\%$  com uma atividade específica de  $5 \pm 1$  mU/mg de proteína, 3 determinações). Esses resultados assemelham-se àquelas obtidos por centrifugação diferencial (Figuras 9 e 10).

Os resultados da sonicação das células do ventrículo posterior (Tabela 15) são semelhantes àquelas obtidos com as células do ventrículo anterior (Tabela 14). As principais diferenças são as recuperações maiores de amilase e tripsina, no tecido remanescente após a sonicação, e a partição da amilase e da tripsina entre as frações solúveis e de membrana correspondentes à fração  $S_3$ . As re-

Tabela 14 - Atividades enzimáticas nas frações obtidas por sonicação das células do ventrículo anterior\*

| Enzimas                 | Fração S <sub>1</sub> |                    | Fração S <sub>2</sub> |                    | Fração S <sub>3</sub> |                    | Fração S <sub>4</sub> |                    |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                         | mU/mg                 | Atividade (% scna) |
| Amilase                 | 440 ± 70              | 77 ± 5             | 960 ± 80              | 4 ± 1              | 1400 ± 200            | 11,8 ± 0,4         | 107 ± 8               | 8 ± 2              |
| Aminopectidase          | 580 ± 50              | 79 ± 2             | 1800 ± 200            | 5,5 ± 0,8          | 2100 ± 200            | 11,0 ± 0,6         | 67 ± 2                | 3,4 ± 0,5          |
| Celobiase               | 23 ± 4                | 63 ± 6             | 11 ± 2                | 0,7 ± 0,2          | 8 ± 2                 | 0,9 ± 0,1          | 34 ± 3                | 35 ± 5             |
| Lactato desidrogenase   | 0,4 ± 0,1             | 19 ± 7             | 0,6 ± 0,2             | 0,9 ± 0,6          | 0,18 ± 0,07           | 0,5 ± 0,4          | 7 ± 3                 | 80 ± 8             |
| Succinato desidrogenase | 30 ± 1                | 98,7 ± 0,4         | 3,0 ± 0,6             | 0,24 ± 0,07        | 2,7 ± 0,5             | 0,22 ± 0,06        | 0,7 ± 0,2             | 0,8 ± 0,3          |
| Tripsina                | 2,15 ± 0,04           | 72 ± 5             | 4,7 ± 0,3             | 3,6 ± 0,5          | 4,1 ± 0,4             | 5,8 ± 0,5          | 1,5 ± 0,2             | 18 ± 4             |

\* A fração S<sub>1</sub> corresponde ao tecido remanescente após sonicação; S<sub>2</sub>, aos fragmentos de tecido de tamanho intermediário; S<sub>3</sub>, às microvilosidades das células colunares; S<sub>4</sub>, ao material vazado das células. Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

Tabela 15 - Atividades enzimáticas nas frações obtidas por sonicação das células do ventrículo posterior\*

| Enzimas                 | Fração S <sub>1</sub> |                    | Fração S <sub>2</sub> |                    | Fração S <sub>3</sub> |                    | Fração S <sub>4</sub> |                    |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                         | mU/mg                 | Atividade (% scna) |
| Amilase                 | 40 ± 7                | 45 ± 7             | 180 ± 50              | 6 ± 1              | 170 ± 40              | 11,5 ± 0,2         | 70 ± 20               | 38 ± 6             |
| Aminopectidase          | 800 ± 100             | 75 ± 2             | 2000 ± 300            | 6,1 ± 0,5          | 2400 ± 300            | 15 ± 2             | 100 ± 20              | 4,3 ± 0,4          |
| Celobiase               | 26 ± 2                | 47 ± 3             | 15 ± 0,7              | 0,84 ± 0,03        | 12,4 ± 0,6            | 1,5 ± 0,2          | 59,8 ± 0,6            | 51 ± 3             |
| Lactato desidrogenase   | 0,51 ± 0,07           | 16 ± 7             | 0,5 ± 0,2             | 0,8 ± 0,7          | 0,19 ± 0,02           | 0,16 ± 0,04        | 8 ± 3                 | 82 ± 8             |
| Succinato desidrogenase | 9 ± 3                 | 94,7 ± 0,6         | 2,6 ± 0,9             | 0,9 ± 0,4          | 1,06 ± 0,09           | 0,85 ± 0,04        | 0,7 ± 0,2             | 3,5 ± 0,3          |
| Tripsina                | 1,8 ± 0,2             | 59 ± 2             | 4,3 ± 0,8             | 4,2 ± 0,4          | 4,4 ± 0,9             | 9 ± 2              | 1,9 ± 0,5             | 28 ± 4             |

\* Detalhes como na legenda da Tabela 14.

cuperações observadas na fração de membranas foram: amilase,  $29 \pm 9\%$  (atividade específica  $60 \pm 10$  mU/mg de proteína, 3 determinações); tripsina,  $70 \pm 9\%$  (atividade específica  $3,4 \pm 0,3$  mU/mg de proteína, 3 determinações).

### 3.1.12. Atividades de hidrolases e ultraestrutura das vesículas presentes no fluido ectoperitrófico

A fração particulada do fluido ectoperitrófico apresenta vesículas que se assemelham àquelas que parecem destacar-se das microvilosidades das células colunares anteriores (compare Figura 3.1 com Figura 3.3). Uma amostra dessa fração foi suspensa em água e submetida a vários ciclos de congelamento e descongelamento, antes de ser centrifugada a  $100.000 \times g$  por 60 min. a  $4^\circ\text{C}$ . As enzimas foram recuperadas majoritariamente no sedimento, sugerindo que as vesículas do fluido ectoperitrófico não apresentam enzimas em seu interior. A amilase e a tripsina apresentam atividades específicas maiores na membrana das vesículas do que na membrana das microvilosidades das células colunares, enquanto que o oposto é verdadeiro para fosfatase alcalina e aminopeptidase (Tabela 16). Esses dados sugerem que as vesículas são produzidas a partir de uma região específica da membrana das microvilosidades das células colunares (para explicar as diferenças encontradas nas atividades específicas). Essa consideração está de acordo com a Figura 3.1.

Tabela 16 - Atividades específicas (mUnidades/mg proteína) das hidrolases presentes no fluido ectoperitrófico e nas microvilosidades das células do ventrículo da larva de *E. ello*\*\*

| Enzimas            | Fluido ectoperitrófico |             | Microvilosidades** |
|--------------------|------------------------|-------------|--------------------|
|                    | Solúvel                | Particulado |                    |
| Amilase            | 1.800 ± 100            | 3.500 ± 500 | 360 ± 40           |
| Aminopectidase     | 7 ± 1                  | 170 ± 20    | 1.600 ± 200        |
| Fosfatase alcalina | 6 ± 0,1                | 70 ± 10     | 900 ± 200          |
| Tripsina           | 20 ± 7                 | 60 ± 20     | 1,2 ± 0,04         |

\* A superfície luminal do epitélio do ventrículo foi lavada com solução salina. A solução salina usada foi centrifugada (600 x g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante usado como o fluido ectoperitrófico. A fração solúvel e particulada do fluido ectoperitrófico corresponde respectivamente ao sobrenadante e sedimento de uma amostra de fluido centrifugada a 100.000 x g por 60 min. a 4°C. Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

\*\* Os dados foram retirados da Tabela 11.

### 3.2. Caracterização das enzimas digestivas da larva de *E. ello*

As principais enzimas digestivas de *E. ello*, como em outros animais, podem ser reunidas em dois grupos principais: as peptídeo hidrolases (EC 3.4.-) e as glicosídeo hidrolases (EC 3.2. -). As peptídeo hidrolases incluem as enzimas que clivam ligações internas em polipeptídeos, como a tripsina (EC 3.4.21.4), e aquelas que clivam o polipeptídeo a partir de sua extremidade amina (aminopeptidases, EC 3.4.11.-), ou a partir de sua extremidade carboxila (carboxipeptidases, EC 3.4.17. -). As glicosídeo hidrolases incluem as enzimas que clivam ligações internas em polissacarídeos como as amilases (EC 3.2.1.1) e as N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.30) e aquelas que clivam oligossacarídeos a partir de sua extremidade não redutora e que podem (ou não) atuar também em dissacarídeos, como as glicosidases (EC 3.2.1. -).

Tanto as peptídeo hidrolases como as glicosídeo hidrolases podem existir na forma solúvel e ligada a membrana em *E. ello*. Iniciaremos o nosso estudo pelas peptídeo hidrolases, mais especificamente pela aminopeptidase.

#### 3.2.1. Propriedades da aminopeptidase ligada a membrana

A aminopeptidase do ventrículo de *E. ello* é solubilizada eficientemente por Triton X-100 (Tabela 17), sem nenhuma perda de atividade, o que apoia a hipótese de que essa enzima é realmente uma proteína integrante de membrana. Papaína e exposição a pH 10 solubilizam a aminopeptidase com menor eficiência (Tabela 17).

Os parâmetros cinéticos e físicos da aminopeptidase estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 17 - Solubilização das hidrolases associadas a membranas por Triton X-100, papaína e pH alcalino\*

| Enzimas          | % de solubilização |          |        |
|------------------|--------------------|----------|--------|
|                  | Triton X-100       | Papaína  | pH 10  |
| Amilase          | 60 ± 2             | 60 ± 1   | 92 ± 2 |
| Aminopectidase   | 90 ± 1             | 45 ± 0,1 | 50 ± 4 |
| Carboxipeptidase | -                  | -        | 50 ± 6 |
| Tripsina         | 40 ± 2             | -        | 79 ± 2 |

\* A fração de microvilosidades das células colunares (P<sub>3</sub>, como descrito no item 2.12) foi lavada como descrito na Tabela 10, antes de ser tratada com Triton X-100 ou papaína (ver Materiais e Métodos para maiores detalhes). Para solubilização em pH alcalino, foi utilizado o sedimento (100.000 x g, 60 min., 4°C) correspondente a um homogeneizado de ventrículo. Para a aminopectidase solubilizada por Triton X-100 e por papaína e em todos os casos de solubilização das demais enzimas, a soma das atividades determinadas na fração solubilizada e na fração não solubilizada alcançaram 90 a 110% das atividades encontradas originalmente nas preparações. A exceção foi a aminopectidase solubilizada por pH 10, onde a referida soma atingiu apenas 62% da atividade original. Essa baixa recuperação possivelmente se deve à inativação de parte da aminopectidase solubilizada. As médias e os desvios padrões da média foram baseados em determinações realizadas em duas preparações obtidas a partir de 4 larvas cada.

Tabela 18 - Propriedades físicas e cinéticas da amilase, aminopeptidase, carboxipeptidase e tripsina do ventrículo da larva de *E. ello*\*

| Enzimas                                  | pH<br>ótimo | Km<br>(mM)    | pI  | Inativação<br>térmica<br>meia vida<br>(min.)** | Peso molecular  |              | Diâmetro das<br>enzimas<br>hidratadas<br>(nm) |
|--|-------------|---------------|-----|--|-----------------|--------------|---|
|  |             |               |     |  | Centrifugação   | Eletroforese |   |
| Amilase (solúvel)                        | 9,8         | 0,12 ± 0,015% | 6,0 | 172 ± 9  | 56000 ± 3000    | 40000 ± 2000 | 6,2 (média)                                   |
| Amilase (membrana)                       | 9,8         | 0,48 ± 0,05%  | -   | 41 ± 1   | -               | -            | -   |
| Amilase (solubilizada pH 10)             | 9,8         | 0,23 ± 0,02%  | 6,1 | 166 ± 15                                       | 62000 ± 3000    | -            | 6,8   |
| Aminopeptidase (membrana)                | 8,0         | 0,36 ± 0,05   | -   | -  | -               | -            | -   |
| Aminopeptidase (solubilizada<br>pH 10)   | -           | -             | -   | -  | 122000 ± 1000   | -            | 8,2   |
| Carboxipeptidase (solúvel)               | 9,0         | 0,18 ± 0,02   | -   | -  | 90000 ± 1000*** | 17000 ± 2000 | 7,6; 3,9 (res<br>pectivamente)                |
| Carboxipeptidase (solubilizada<br>pH 10) | 9,0         | -             | -   | -  | 136000 ± 17000  | -            | 8,5   |
| Tripsina (solúvel)****                   | 9,5         | 0,17 ± 0,02   | 4,6 | 63 ± 2   | 61000 ± 4000    | 48000 ± 3000 | 6,5 (média)                                   |
| Tripsina (membrana)                      | 10          | 0,16 ± 0,01   | -   | 41 ± 3   | -               | -            | -   |

\* Os pHs ótimos e os valores de pI foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de Km (média e desvio padrão da média, n = 10) foram determinados por uma regressão linear ponderada pelo procedimento de WILKINSON (1961) usando um programa escrito em Basic por ORSTREICH & PINTO (1983). Os valores dos pesos moleculares relativos foram calculados a partir dos dados de ultracentrifugação de acordo com MARTIN & AMES (1961) e a partir de dados de eletroforese de acordo com HEDRICK & SMITH (1968). O diâmetro das enzimas hidratadas foram interpolados em um plote do logaritmo do peso molecular contra os raios de Stoke para onze proteínas (Detalhes em TERRA & FERREIRA, 1983). Maiores detalhes em Materiais e Métodos.

\*\* A inativação térmica da amilase foi determinada a 55°C, pH 9,8, enquanto que a inativação térmica da tripsina foi determinada a 45°C, pH 10,5. Os resultados são médias e desvios padrões da média de 2 determinações.

\*\*\* Uma carboxipeptidase menor com peso molecular 16.000 ± 200 foi também encontrada.

\*\*\*\* Todas as determinações foram realizadas com a tripsina solúvel obtida a partir do sobrenadante de uma centrifugação (100.000 x g, 60 min., 4°C) de homogeneizados de ventrículo, com exceção da determinação do Km e Ki, onde o sobrenadante do epitélio ventricular foi utilizado como fonte de enzima.

### 3.2.2. Propriedades da tripsina solúvel e da tripsina associada a membrana

As eletroforeses realizadas em cilindro de gel de poliacrilamida (cinco concentrações diferentes foram usadas) sugerem que há uma única espécie molecular quantitativamente importante de tripsina solúvel, no ventrículo da larva de *E. ello*. Esta tripsina não é afetada por diálise contra água. Outras propriedades da tripsina solúvel estão descritas na Tabela 18. Como o substrato de tripsina utilizado (BAPA) é uma mistura dos isômeros D e L, os valores de  $K_m$  determinados poderiam ser falsos. Contudo, o plote dos dúplos recíprocos de velocidade versus concentração de BAPA são lineares, sugerindo que D-BAPA não é inibidor e, portanto, que os valores de  $K_m$  determinados são reais. Benzamidina é um inibidor competitivo linear interceptante simples da tripsina solúvel, com um  $K_i$   $18 \pm 3 \mu M$  (média e desvio padrão da média, 2 determinações).

Embora a tripsina associada a membrana seja aparentemente solubilizada (aproximadamente 79%) por exposição a pH 10 ela não entra em cilindros de gel de poliacrilamida submetidos a uma diferença de potencial. Devido a esse fato, nenhum outro estudo foi realizado com a tripsina solubilizada. A tripsina ligada a membrana e a tripsina solúvel são semelhantes entre si, tanto em relação aos valores de  $K_m$  (Tabela 18), quanto aos valores de  $K_i$  para benzamidina ( $24 \pm 1 \mu M$ , média e desvio padrão da média, 2 determinações). A diferença encontrada na velocidade de inativação térmica (Tabela 18), entre a tripsina solúvel e a ligada a membranas pode ser devido à rigidez imposta à enzima pela membrana.

### 3.2.3. Propriedades da carboxipeptidase solúvel e da carboxipeptidase associada a membrana

As atividades de carboxipeptidase solúvel do ventrículo de *E. ello* são separadas por eletroforese em cilindro de gel de poli-acrilamida em três picos principais (Figura 14). Os dados de migração eletroforética (Figura 15) sugerem que todas as moléculas de carboxipeptidase tem o mesmo peso molecular (17.000, Tabela 18), mas diferentes valores de pI. Esses dados, juntamente com o peso molecular calculado por ultracentrifugação em gradiente contínuo de glic<sup>l</sup>cerol (90.000, Tabela 18), sugerem que a carboxipeptidase é um hexâmero (com duas subunidades de cada um dos três polipeptídeos diferentes) que dissocia-se em manômeros durante a eletroforese.

Cerca de 50% da carboxipeptidase ligada a membranas é solubilizada por exposição a pH 10 (Tabela 17), sem nenhuma perda de atividade. A enzima solubilizada nessas condições possui um peso molecular de  $136.000 \pm 17.000$ , determinado por ultracentrifugação em gradiente contínuo de glic<sup>l</sup>cerol (Tabela 18).

### 3.2.4. Propriedades da amilase solúvel e da amilase associada a membrana

Após eletroforese, somente um pico de atividade de amilase solúvel é encontrado no ensaio de frações de cilindros de cinco concentrações diferentes de poli-acrilamida. A atividade da amilase solúvel não é afetada por diálise contra água e, em contraste com a

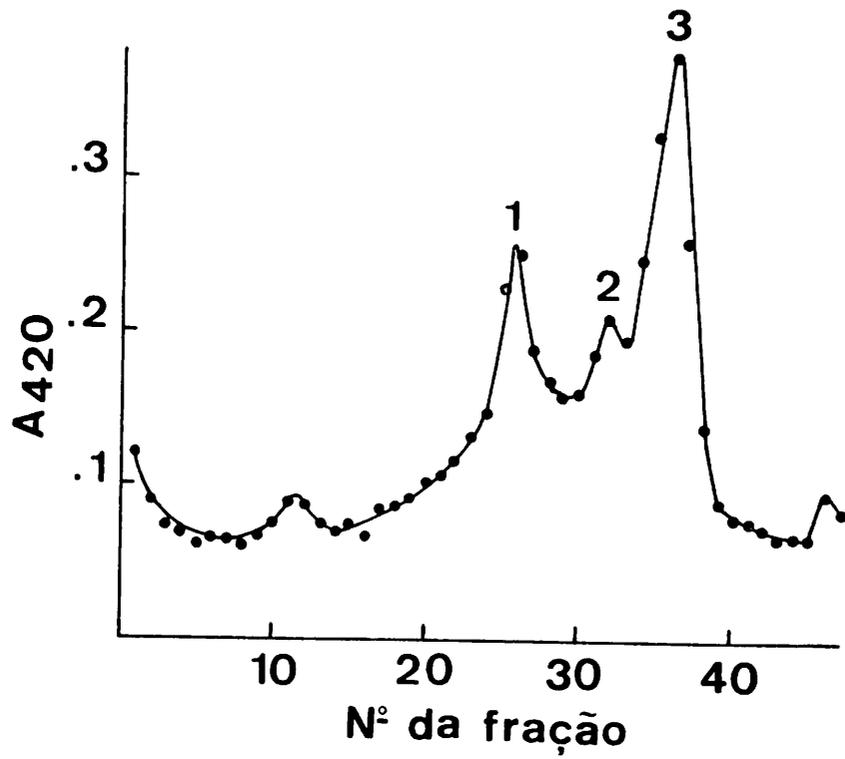


Figura 14 - Separação eletroforética em cilindro de gel de poliacrilamida 6% da carboxipeptidase solúvel do ventrículo da larva de *E. ello*.

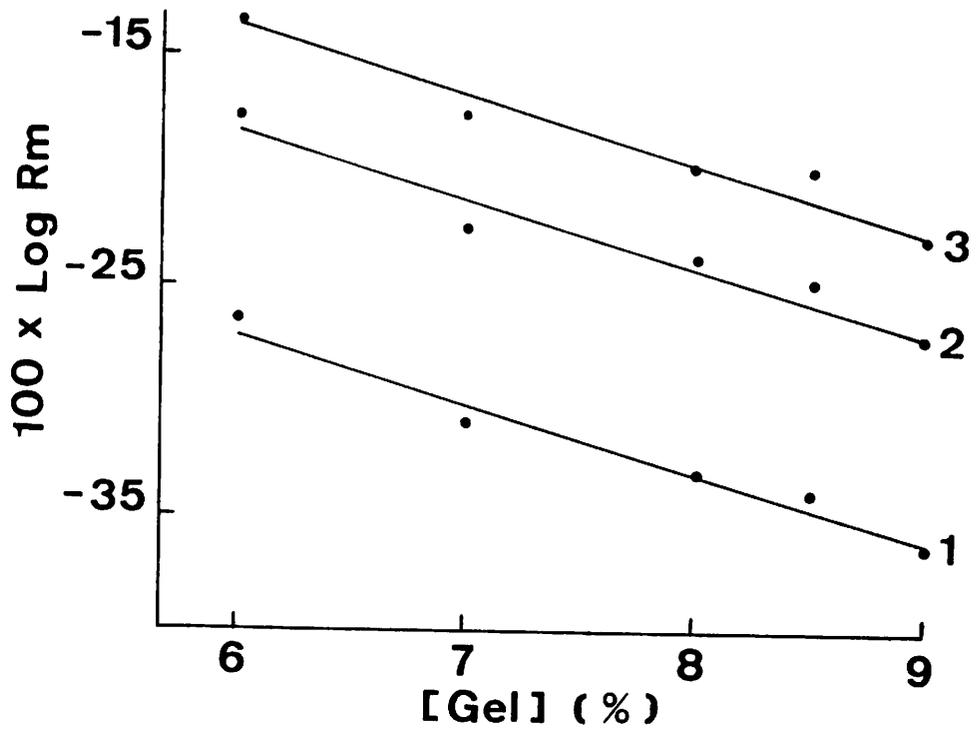


Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações de gel de poliacrilamida na migração eletroforética da carboxipeptidase do ventrículo da larva de *E. ello*. Rm, migração eletroforética da enzima em relação ao marcador de frente.

amilase de outros insetos (revisão em TERRA et al., 1977), a amilase de *E. ello* não é ativada por cloreto.  $\alpha$  e  $\beta$  ciclodextrina (até 2 mM), metil  $\alpha$ -D-glicosídeo (até 0,67 M) e sacarose (até 0,5 M) não são substratos nem inibidores da amilase purificada do ventrículo de *E. ello*. Outras propriedades da amilase ventricular estão descritas na Tabela 18.

A amilase ligada a membrana pode ser solubilizada por papaína (57% do total), Triton X-100 (62% do total) e por exposição a pH 10 (92% do total), sem nenhuma perda de atividade (Tabela 17). Devido ao seu elevado rendimento, o último método de solubilização foi escolhido para todos os experimentos subsequentes.

A amilase solúvel e a amilase ligada a membrana parecem ser muito semelhantes. Esta afirmação é baseada nos resultados que mostram que a amilase solúvel e a amilase solubilizada por pH 10 apresentam os mesmos valores de pI, as mesmas velocidades de sedimentação em gradientes contínuos de glicerol (Tabela 18) e as mesmas migrações eletroforéticas em géis de poliacrilamida (Figura 16). A amilase solubilizada por Triton X-100 (ou por papaína) também apresenta migração eletroforética similar àquela da amilase solúvel (Figura 16). Além disso, o antissoro produzido contra a amilase solúvel purificada mostra somente um arco de precipitação quando testado por imunodifusão dupla tanto contra a amilase purificada, quanto contra a amilase solubilizada. As porções do gel com as linhas de precipitação foram cortadas com lâmina de barbear, homogeneizadas e ensaiadas, evidenciando a existência de atividade de amilase. As linhas de precipitação formadas pelas duas enzimas estão completamente fundidas (Figura 17), indicando uma identidade imunológica completa entre a amilase solúvel e a amilase solubilizada e, portanto, entre a amilase solúvel e a amilase ligada a membranas. As diferenças encontradas nos valores do  $K_m$  e nas velocidades de inativação

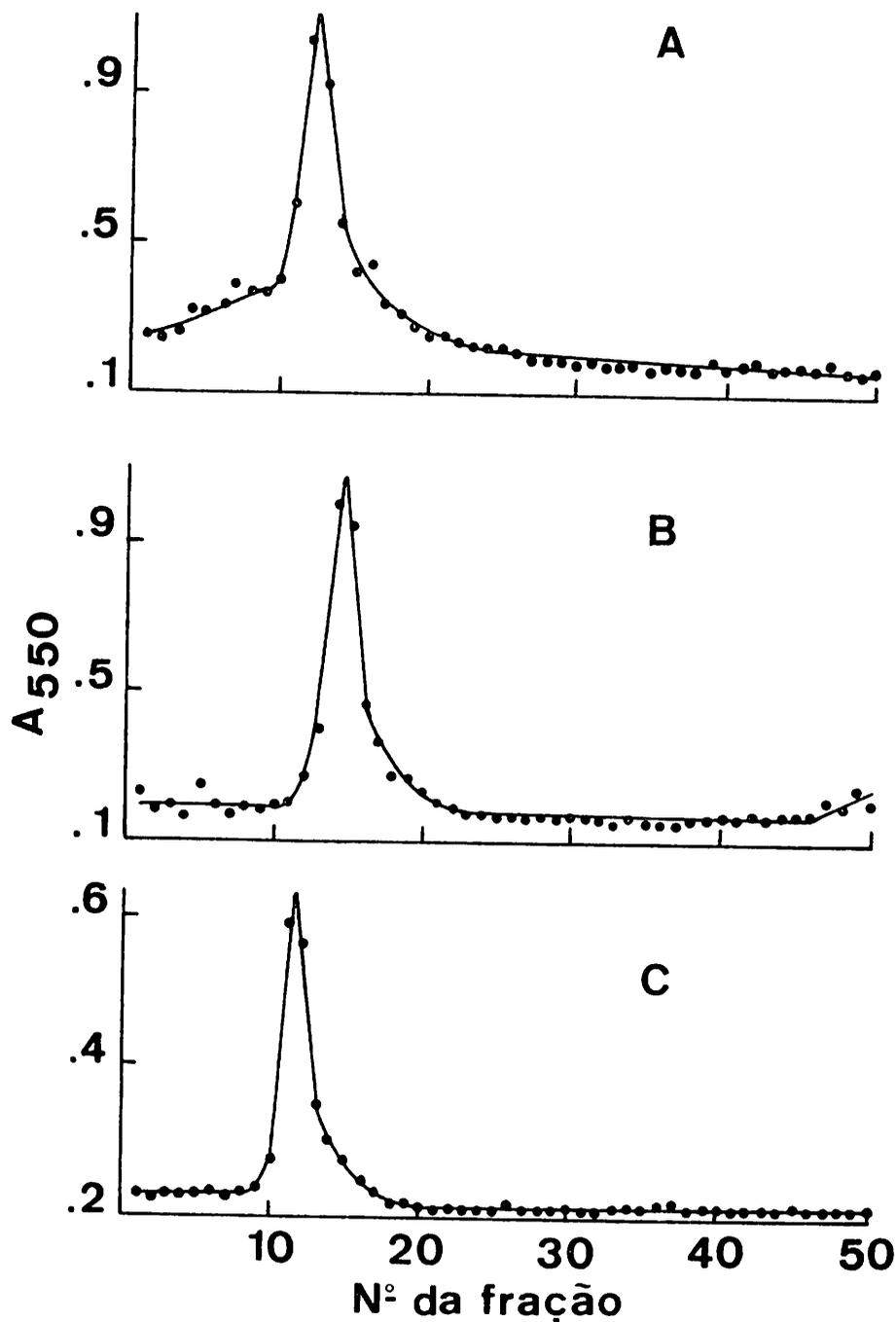


Figura 16 - Atividade de amilase após eletroforese a 4°C em cilindro de gel de poliacrilamida 6%. (A) Amilase solúvel mais amilase liberada da membrana pelo tratamento com papaína. Perfis de atividade de amilase obtidos a partir da eletroforese da forma solúvel e da solubilizada por papaína corrido em géis independentes foram semelhantes ao mostrado em A. (B) Amilase solúvel mais amilase solubilizada por Triton X-100. Perfis de atividade de amilase obtidos a partir da eletroforese da forma solúvel (na presença de Triton X-100) e da solubilizada por Triton X-100 corrido em géis independentes foram semelhantes ao mostrado em B. (C) Amilase solúvel mais amilase solubilizada por pH 10. Perfis de atividade de amilase obtidos a partir da eletroforese da forma solúvel e da solubilizada por pH 10 corrido em géis independentes foram semelhantes ao mostrado em C. A recuperação das atividades aplicada nos géis foi de 85 a 110%. Maiores detalhes em Materiais e Métodos.



térmica entre a amilase solúvel e a amilase ligada a membrana de - crescem após a solubilização da amilase ligada a membranas (Tabela 18). Isso sugere que as diferenças observadas sejam devido a uma rigidez imposta pela membrana à enzima.

### 3.2.5. Propriedades da $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, $\alpha$ -galactosidase e trealase ventriculares de *E. ello*

Existem três  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases ventriculares principais que são resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 18). As velocidades de migração eletroforética das  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases foram determinadas em cilindros de gel de poliacrilamida de diferentes concentrações (Figura 19). O fato de que as retas da Figura 19 são aproximadamente paralelas sugere que todas as moléculas de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases apresentam o mesmo peso molecular (149.000, Tabela 19), enquanto que os diferentes interceptos indicam que as moléculas tem diferentes valores de pI (cf. HEDRICK & SMITH, 1968). Essas conclusões são apoiadas pela descoberta de que somente uma atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (Mr 134.000, Tabela 19) sedimenta-se em gradientes contínuos de glicérol. Outras propriedades da  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase estão mostradas na Tabela 19.

Centrifugações em gradientes de densidade e eletroforeses em cilindros de gel de poliacrilamida (4 concentrações diferentes foram utilizadas) sugerem que há somente uma espécie molecular de  $\alpha$ -galactosidase. Contudo, a comparação entre os pesos moleculares da  $\alpha$ -galactosidase determinados por eletroforese e por centrifugação em gradiente de densidade sugere que essa enzima é um dímero, que se dissocia em monômeros durante a eletroforese. Outras propriedades da  $\alpha$ -galactosidase estão apresentadas na Tabela 19.

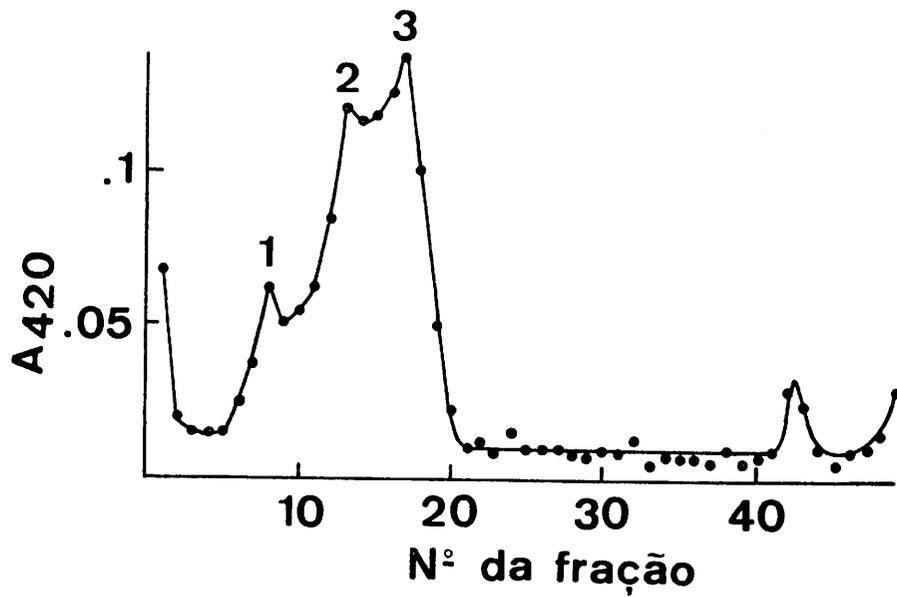


Figura 18 - Separação eletroforética da  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase ventricular em cilindro de gel de poliacrilamida 7%.

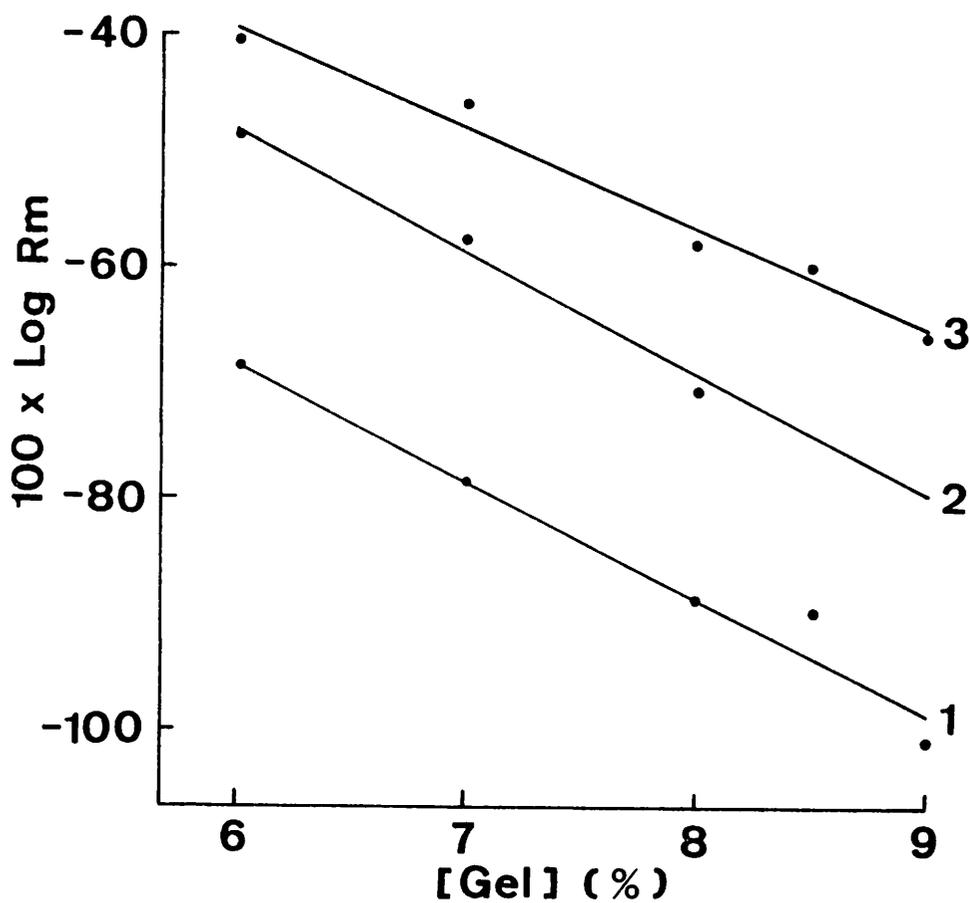


Figura 19 - Efeito de diferentes concentrações de gel de poliacrila mida na migração eletroforética da  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase ventricular. Rm, migração eletroforética da enzima em relação ao marcador de frente.

Tabela 19 - Propriedades físicas e cinéticas das glicosidases principais do ventrículo das larvas de *E. ello*\*

| Enzimas                          | Substrato        | pH<br>Ótimo | Km<br>(mM)        | Ki Tris<br>(mM) | Peso molecular     |                    | Diâmetro das<br>enzimas<br>hidratadas<br>( $\mu$ m) |
|----------------------------------|------------------|-------------|-------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---|
|                                  |                  |             |                   |                 | Gradiente          | Eletroforese       |   |
| $\beta$ -N-acetilglicosaminidase | pNPAG            | 4,5         | 0,027 $\pm$ 0,003 | -               | 134000 $\pm$ 2000  | 149000 $\pm$ 7000  | 8,6 (média)   |
| Celobiase                        | celbiose         | 6,5         | 2 $\pm$ 0,2       | 0,54 $\pm$ 0,09 | 134000 $\pm$ 2000  | 124000 $\pm$ 13000 | 8,4 (média)   |
| $\beta$ -frutosidase             | sacarose         | 6,0         | 30 $\pm$ 4        | -               | 78000 $\pm$ 1000   | 82000 $\pm$ 4000   | 7,3 (média)   |
| $\beta$ -frutosidase             | rafinose         | -           | 32 $\pm$ 6        | -               | -                  | -                  | -   |
| $\alpha$ -galactosidase          | pNP $\alpha$ Gal | 6,0         | 7,4 $\pm$ 0,7     | -               | 81000 $\pm$ 1000   | 39000 $\pm$ 2000   | 7,3; 5,7 (res_pectivamente)                         |
| Maltase                          | maltose          | 5,8         | 1,4 $\pm$ 0,1     | 0,34 $\pm$ 0,03 | 134000 $\pm$ 2000  | 151000 $\pm$ 8000  | 8,6 (média)   |
| Maltase                          | pNP $\alpha$ Gli | -           | 0,63 $\pm$ 0,06   | -               | -                  | 34000 $\pm$ 2000   | 5,4   |
| Trealase                         | trealose         | 5,7**       | 0,69 $\pm$ 0,05   | -               | 106000 $\pm$ 10000 | 100000 $\pm$ 5000  | 7,9 (média)   |

\* Os valores de Ki (média e desvios padrões da média de 2 determinações) foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Tris é um inibidor competitivo linear interceptante simples da maltase e da celobiase. Outros detalhes como na legenda da Tabela 18.

\*\* Além da trealase com pH ótimo 5,7, há uma outra trealase com pH ótimo 3,8.

A atividade de trealase apresenta dois ótimos de pH (Figura 20) e é separada por eletroforese em dois picos de atividade (Figura 21). Embora a maior atividade da trealase seja obtida em pH 3,8 somente as propriedades da trealase em pH 5,7 foram estudadas (Tabela 19). Isso se deve ao fato de que, considerando o pH que prevalece no lúmen ventricular, somente a atividade com ótimo em 5,7 teria importância nos processos digestivos.

### 3.2.6. Propriedades da maltase ventricular da larva de *E. ello*

O ventrículo de *E. ello* apresenta duas maltases (1 e 2) que são separáveis por eletroforese em cilindro de gel de poliacrilamida (Figura 22). As velocidades de migração da maltase 1 e 2 foram determinadas em corridas eletroforéticas realizadas em cilindros de gel de poliacrilamida de diferentes concentrações (Figura 23). O fato das retas da Figura 23 não serem paralelas sugere que a maltase 1 e 2 tem diferentes pesos moleculares (151.000 e 34.000, respectivamente, ver Tabela 19), enquanto que os interceptos diferentes indicam que as moléculas tem diferentes valores de pI (cf. HEDRICK & SMITH, 1968).

A maltase 1 purificada (ver legenda da Figura 22) migra como a maltase 2 purificada (ver legenda da Figura 22) em cilindros de gel de poliacrilamida preparados sem gel de empilhamento (Figura 24). As maltases sedimentam-se como moléculas de peso molecular de 134.000 em gradientes contínuos de glicerol a pH 6,2 (Tabela 19) e como moléculas de peso molecular 90.000 em gradientes contínuos de glicerol a pH 10. Por outro lado, a maltase 2 purificada por eletroforese apresenta um peso molecular de 92.000 se medido em gradiente contínuo de glicerol a pH 5,5. As maltases 1 e 2 purificadas apresentam os mesmos valores de Km para maltose e os mesmos valores de Ki para Tris que aqueles obtidos com a fração solúvel de homoge-

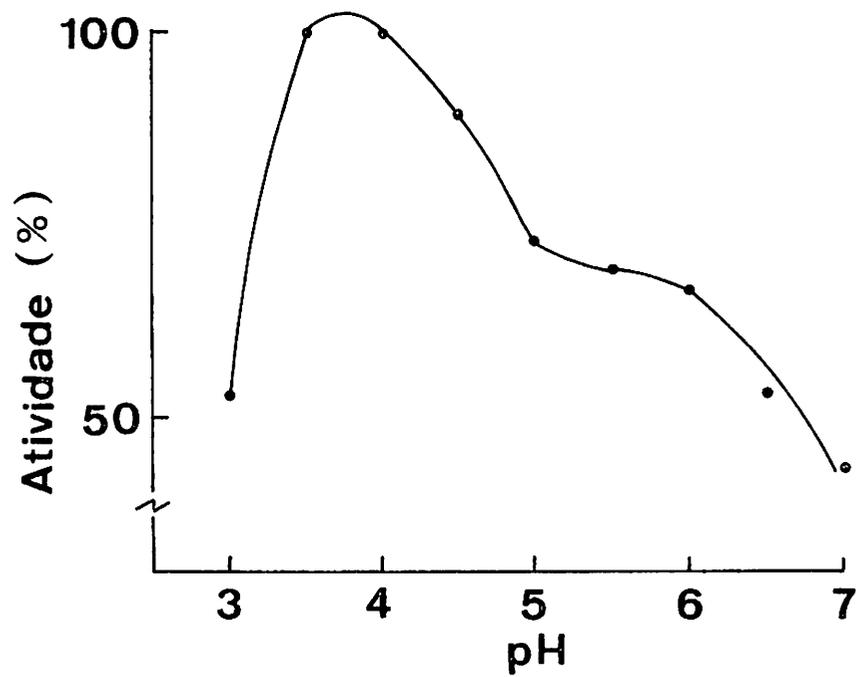


Figura 20 - Efeito do pH na atividade da trealase ventricular.

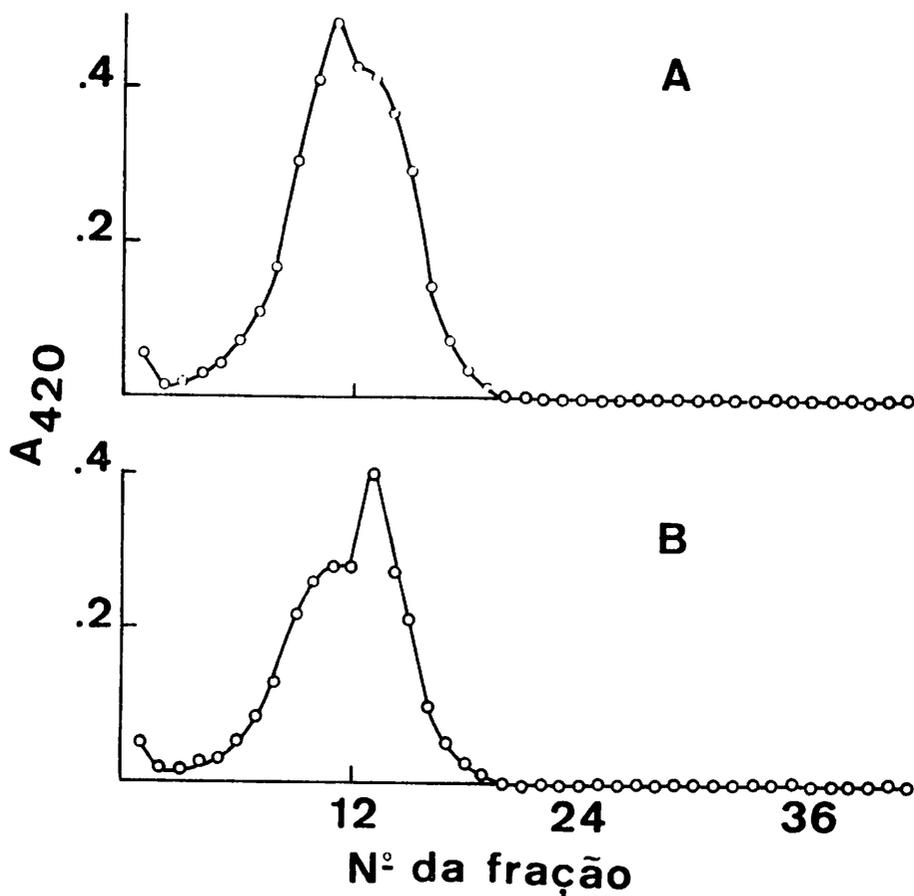


Figura 21 - Separação eletroforética da trealase ventricular em cilindro de gel de poliacrilamida 9%. (A) Ensaio a pH 3,8; (B) ensaio a pH 6,0. Os perfis obtidos a partir de outras preparações são semelhantes aos mostrados acima, que foram obtidos a partir de um mesmo experimento (gel).

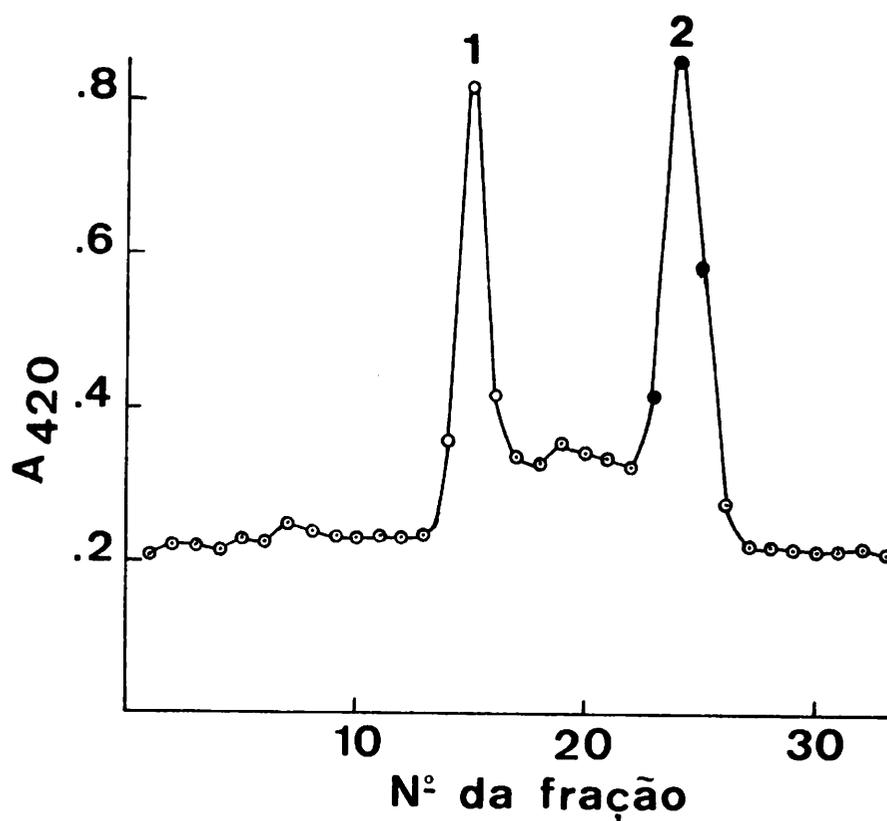


Figura 22 - Separação eletroforética das maltases ventriculares em cilindro de gel de poliacrilamida 8,5%. As frações mais ativas (representadas por círculos vazios (o) ou cheios (●)) correspondentes a cada pico (1 e 2 respectivamente) foram coletadas e guardadas para serem usadas posteriormente.

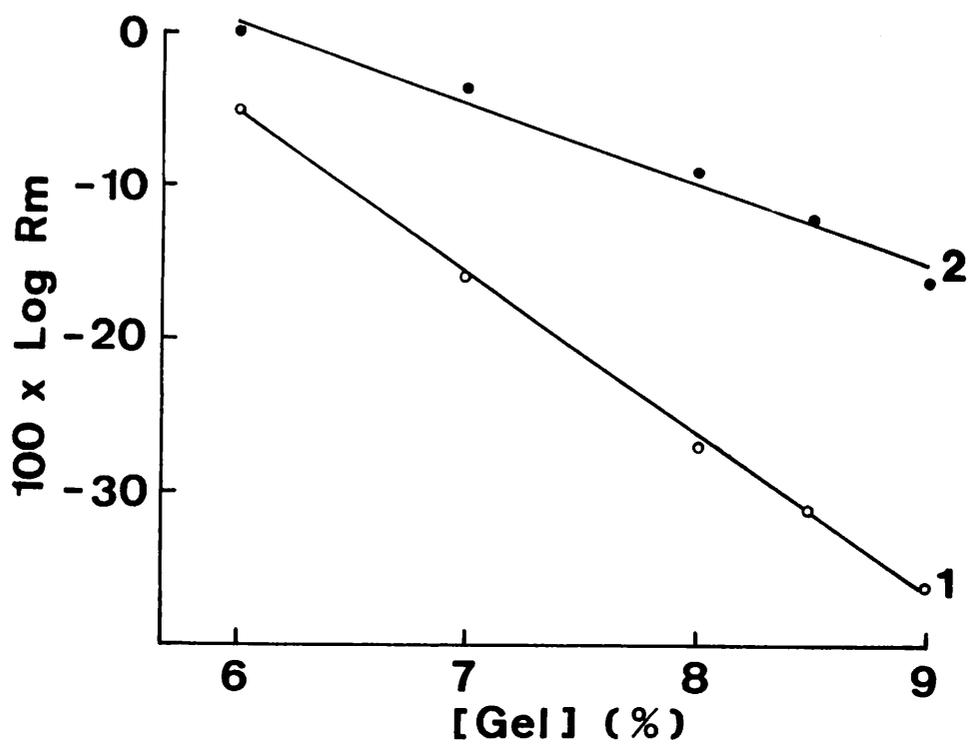


Figura 23 - Efeito de diferentes concentrações de gel de poliacrilamida na migração eletroforética das maltases ventriculares numeradas como na Figura 22.  $R_m$ , migração eletroforética da enzima em relação ao marcador de frente.

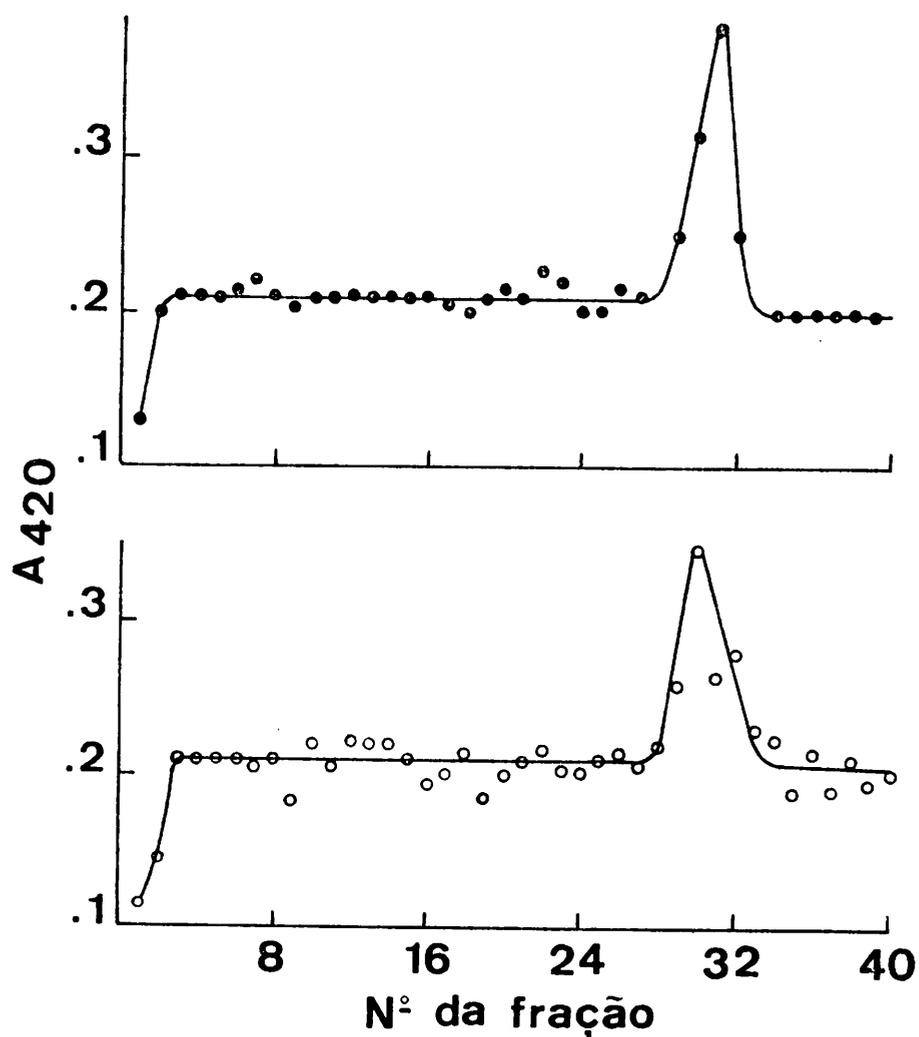


Figura 24 - Separação eletroforética de maltases ventriculares em cilindro de gel de poliacrilamida 8,5% preparado sem o gel de empilhamento. As amostras utilizadas foram frações correspondentes à maltase 1 (o) ou à maltase 2 (●) do experimento descrito na Figura 22.

neizados de ventrículos (Tabela 19). A inativação térmica da malta se da fração solúvel de homogeneizados de ventrículos e das maltas 1 e 2 (ambas purificadas por eletroforese) segue uma cinética de primeira ordem aparente, com meias vidas semelhantes entre si ( $42 \pm 2$ ,  $35 \pm 1$ ,  $38 \pm 1$  min., respectivamente; médias e desvios padrões da média de 2 determinações), por um período de tempo de pelo menos duas meias vidas. Esses dados sugerem que há somente uma maltase em cada preparação e que a maltase nas preparações purificadas são semelhantes entre si.

### 3.2.7. Propriedades da $\beta$ -frutosidase ventricular da larva de *E. ello*

Apenas uma atividade hidrolítica sobre rafinose é evidenciável após eletroforese em géis de poliacrilamida de amostras da fração solúvel de homogeneizados de ventrículos de larvas de *E. ello* (Figura 25b). A atividade de  $\alpha$ -galactosidase apresenta uma migração diferente da atividade hidrolítica sobre rafinose (compare as Figuras 25b com 25a), o que sugere que a atividade hidrolítica sobre rafinose possa ser devido a uma atividade de  $\beta$ -frutosidase (EC 3.2.1.26). A sacarose é hidrolisada principalmente pela  $\beta$ -frutosidase (pico maior na Figura 25c). A maltase hidrolisa quantidades desprezíveis de sacarose (pico menor na Figura 25c). A  $\beta$ -frutosidase sedimenta-se como uma molécula de proteína de  $M_r$  78.000 (Tabela 19). Outras propriedades da  $\beta$ -frutosidase ventricular estão descritas na Tabela 19.

### 3.2.8. Propriedades da celobiase ventricular da larva de *E. ello*

#### 3.2.8.1. Peso molecular e pI da celobiase

Centrifugações em gradiente de densidade (Figura 26a), e-

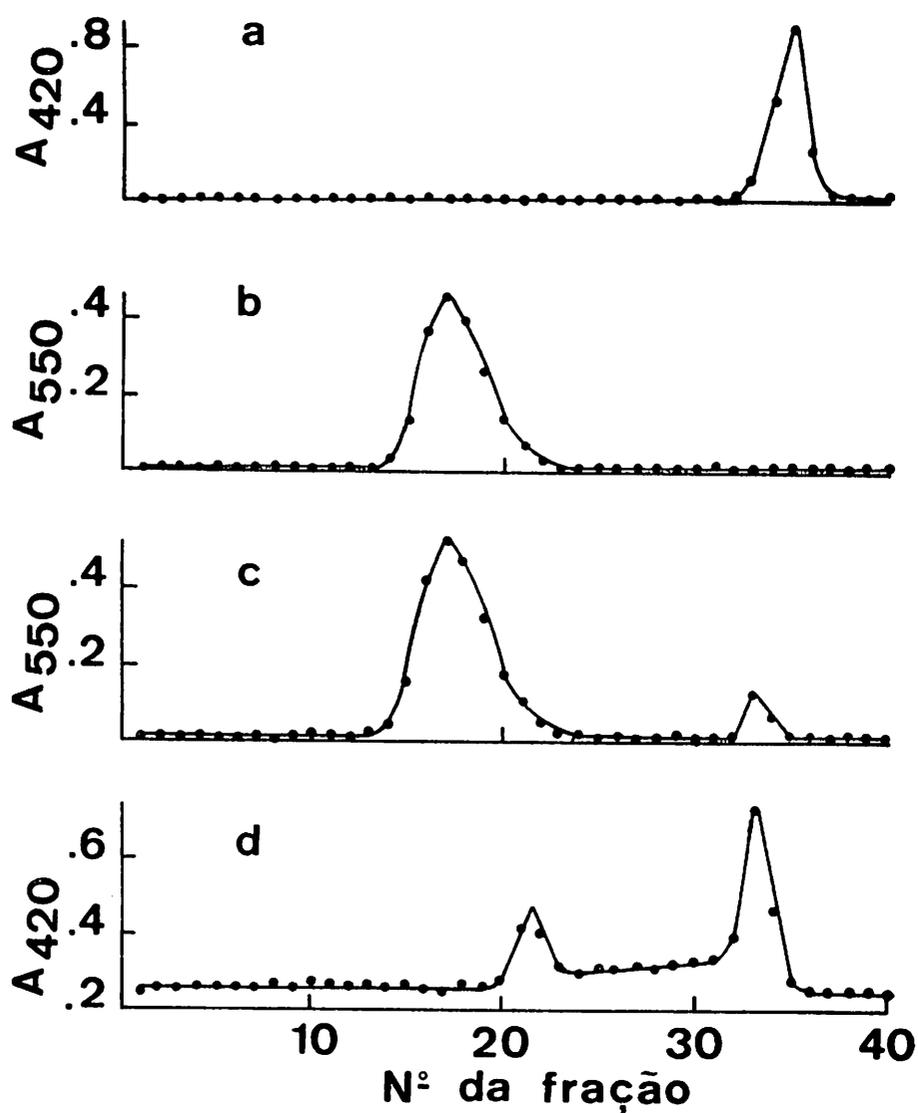


Figura 25 - Separação eletroforética de hidrolases ventriculares em cilindro de gel de poliacrilamida 7,5%. (a) ensaio com melibiose; (b) ensaio com rafinose; (c) ensaio com sacarose; (d) ensaio com maltose. Ensaio com p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo resulta em um perfil idêntico àquele obtido com melibiose. Perfis obtidos com outras preparações são similares aos mostrados, que foram obtidos a partir de um único experimento (gel).

troforese em géis de cinco concentrações diferentes de poliacrilamida (Figura 26b mostra eletroforese em gel de poliacrilamida 8,5%) e focalização isoelétrica (Figura 26c) sugerem que existe apenas uma espécie molecular de celobiase. Perfis coincidentes com os mostrados na Figura 26 foram obtidos utilizando quaisquer dos seguintes substratos: celobiose, lactose, pNP $\beta$ Gal, pNP $\beta$ Gli, pNP $\beta$ Fuc e pNP $\beta$ Xil. Esses resultados sugerem que a celobiase, além de  $\beta$ -glicosídeos, hidrolisa  $\beta$ -galactosídeos,  $\beta$ -fucosídeos e  $\beta$ -xilósídeos. O peso molecular da celobiase calculado a partir de gradientes de densidade (Figura 26a) é  $134.000 \pm 2.000$ , a partir da migração eletroforética em géis de diferentes concentrações de poliacrilamida é  $124.000 \pm 13.000$  e o seu pI é 6,8 (Figura 26c).

#### 3.2.8.2. Efeito da temperatura sobre a celobiase

A energia de ativação da celobiase, determinada em condições de saturação com o substrato, entre 15 e 35°C, é de 13 KCal/mol (Figura 27). A enzima é completamente estável por pelo menos 2 horas em tampão fosfato 50 mM pH 6,5, a temperaturas até 45°C (Figura 27).

#### 3.2.8.3. Especificidade de substrato da celobiase

A celobiase hidrolisa  $\beta$ -glicosídeos,  $\beta$ -galactosídeos,  $\beta$ -fucosídeos e  $\beta$ -xilósídeos (Tabela 20), mas não hidrolisa (aliás é i nibida por)  $\alpha$ -glicosídeos e  $\alpha$ -galactosídeos (Tabela 21).

oNP $\beta$ -D-galactosídeo é inibidor competitivo linear simples da reação da celobiase sobre celobiose e celobiose é inibidor competitivo linear simples da reação da celobiase sobre oNP $\beta$ -D-galactosídeo (Figura 28). Celobiose e oNP $\beta$ -D-galactosídeo são hidrolisados pelo mesmo sítio ativo da celobiase, uma  $v_2$  que os valores de  $K_i$  para oNP $\beta$ -D-galactosídeo ( $5,7 \pm 0,3$  mM) e  $K_i$  pa

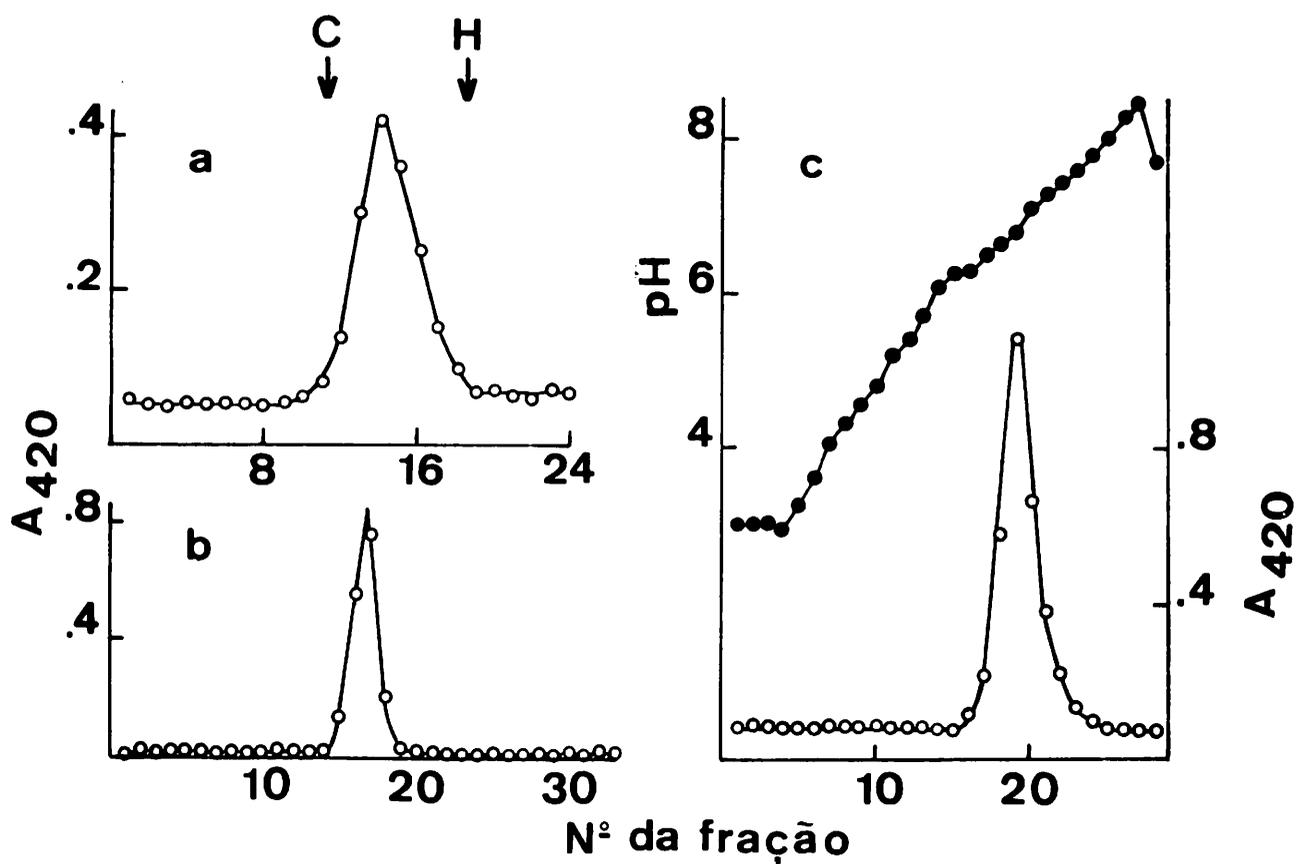


Figura 26 - Propriedades físicas da celobiase ventricular. (a) Perfil de sedimentação da celobiase em gradiente linear de glicerol. Marcadores de peso molecular: C, catalase de fígado bovino ( $M_r$  232.000); H, hemoglobina bovina ( $M_r$  64.500). (b) Separação eletroforética da celobiase em gel de poliacrilamida 8,5%. (c) Focalização isoelétrica da celobiase. Os ensaios foram realizados usando celobiose como substrato. Ensaio utilizando lactose, pNP $\beta$ Gal, pNP $\beta$ Fuc ou pNP $\beta$ Xil como substratos resulta em perfis idênticos aos apresentados. ●, pH; ○ A<sub>420</sub>.

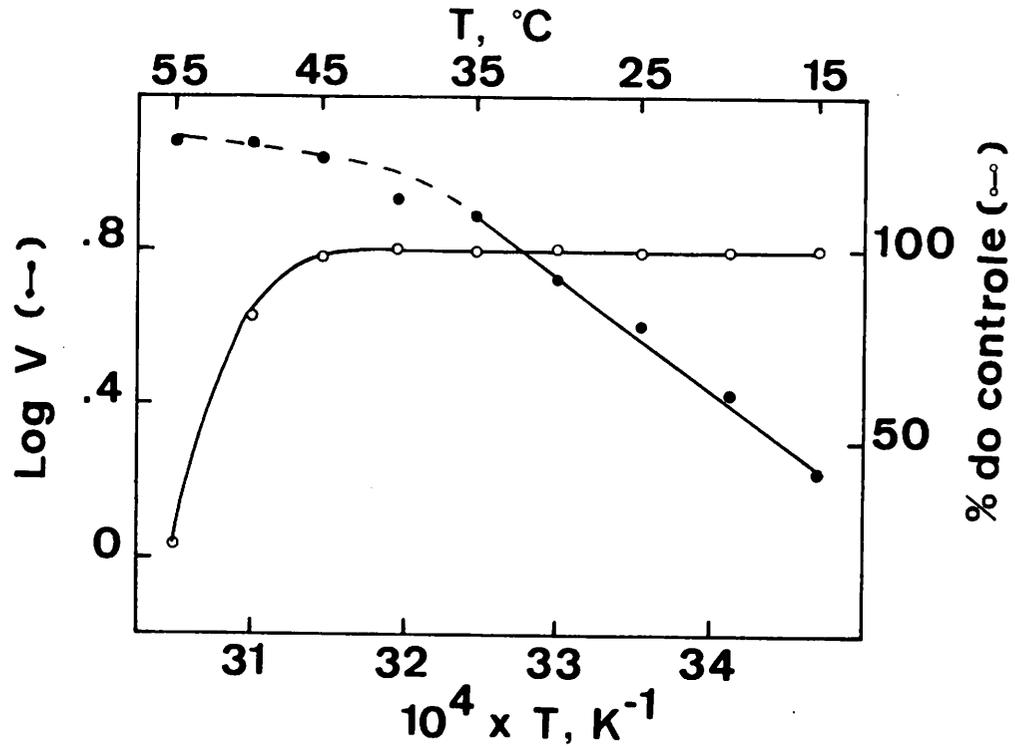


Figura 27 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da celobiase. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se amostras da enzima em tampão fosfato 50 mM pH 6,5 em diferentes temperaturas por 2 horas antes de ensaiá-las. A linha reta do plote de Arrhenius foi ajustada pelos métodos dos quadrados mínimos aos pontos entre 15 e 35°C.

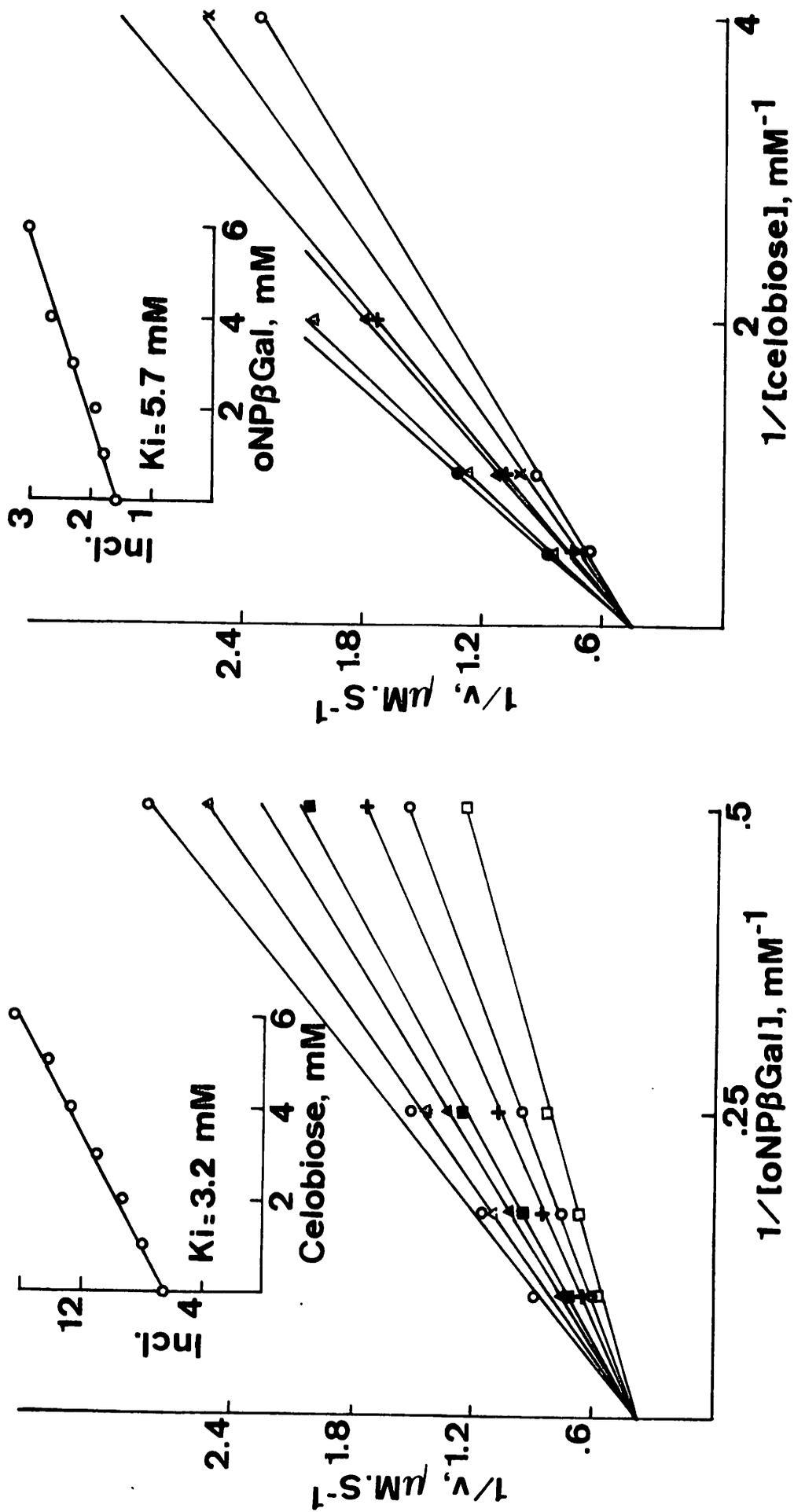


Figura 28 - Competição de substratos da celobiase: inibição da hidrólise de celbiose por ONPβGal e inibição da hidrólise de ONPβGal por celbiose. Plotes de Lineweaver-Burk foram feitos para diferentes concentrações dos substratos-inibidores. Inseridos nos gráficos encontram-se os replotes das inclinações dos plotes de Lineweaver-Burk versus a concentração do substrato atuando como inibidor.

ra celobiose ( $3,2 \pm 0,1$  mM) concordam satisfatoriamente com os valores de seus respectivos Kms ( $7,4$  e  $2,0$  mM) (Tabela 20).

Tabela 20 - Especificidade de substrato da celobiase

| Substrato            | Km<br>(mM)      | V<br>( $\mu\text{M S}^{-1}$ ) | $10^4 \cdot V/Km$<br>( $\text{S}^{-1}$ ) |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|--|
| Celobiose            | $2 \pm 0,2$     | $6,1 \pm 0,2$                 | $30 \pm 4$                               |
| pNP $\beta$ Gli      | $0,18 \pm 0,01$ | $4,7 \pm 0,03$                | $261 \pm 16$                             |
| oNP $\beta$ Gli      | $0,63 \pm 0,07$ | $2 \pm 0,05$                  | $32 \pm 4$                               |
| pAP $\beta$ Gli      | $7,4 \pm 1,0$   | $3,4 \pm 0,3$                 | $4,6 \pm 1$                              |
| P $\beta$ Gli        | $6,4 \pm 0,9$   | $7,1 \pm 0,5$                 | $11 \pm 2$                               |
| Lactose              | $17 \pm 2$      | $6,2 \pm 0,6$                 | $3,6 \pm 0,8$                            |
| pNP $\beta$ Gal      | $0,33 \pm 0,04$ | $18 \pm 0,5$                  | $545 \pm 84$                             |
| oNP $\beta$ Gal      | $7,4 \pm 0,5$   | $6,7 \pm 0,3$                 | $9 \pm 1$                                |
| pAP $\beta$ Gal      | $26 \pm 5$      | $1,9 \pm 0,3$                 | $0,73 \pm 0,26$                          |
| P $\beta$ Gal        | $16,6 \pm 2,5$  | $5,4 \pm 0,5$                 | $3,2 \pm 0,8$                            |
| pAP-Tio- $\beta$ Gli | $0,51 \pm 0,03$ | $0,17 \pm 0,002$              | $3,3 \pm 0,2$                            |
| Salicina             | $6,3 \pm 0,6$   | $6,1 \pm 0,3$                 | $9,7 \pm 1,4$                            |
| pNP $\beta$ Fuc      | $0,33 \pm 0,03$ | $11,4 \pm 0,2$                | $345 \pm 37$                             |
| pNP $\beta$ Xil      | $1 \pm 0,1$     | $0,15 \pm 0,004$              | $1,5 \pm 0,2$                            |

\* A celobiase solúvel foi incubada com dez concentrações diferentes de cada substrato listado em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5 a 30°C. Os parâmetros cinéticos (médias e desvios padrões) foram determinados por uma regressão linear ponderada pelo procedimento de WILKINSON (1961) usando um programa escrito em Basic por ORSTREICHER & PINTO (1983).

Afim de verificar se um mesmo sítio da celobiose é capaz de hidrolisar  $\beta$ -glicosídeos,  $\beta$ -galactosídeos,  $\beta$ -fucosídeos e  $\beta$ -xilosídeos ou se, alternativamente, esses diferentes substratos são hidrolisados por sítios diferentes, estudos foram realizados usando um método que envolve a competição entre dois substratos, como explicado a seguir:

Se uma enzima for ensaiada na presença de dois substratos competitivos (isto é, um mesmo sítio for capaz de hidrolisar os dois substratos), a atividade sobre cada substrato na mistura será menor do que a obtida para cada substrato testado separadamente. A velocidade da reação de uma enzima com um sítio capaz de hidrolisar dois substratos será dada pela equação (deduzida assumindo condições de equilíbrio rápido, cf. SEGEL, 1975):

$$v = \frac{V_a [a]}{K_a(1 + \frac{[b]}{K_b}) + [a]} + \frac{V_b [b]}{K_b(1 + \frac{[a]}{K_a}) + [b]}$$

onde  $v$  é a velocidade da reação na presença de dois substratos ( $a$  e  $b$ ),  $V_a$  e  $V_b$  são as velocidades máximas dos dois substratos e  $K_a$  e  $K_b$  são as respectivas constantes de Michaelis.

Tabela 21 - Inibição por glicosídeos da celobiase purificada por eletroforese em gel de poliacrilamida\*

| Carboidrato                 | % de inibição |
|-----------------------------|---------------|
| Maltose                     | 9,7 ± 2,2     |
| Melibiose                   | 2,6 ± 1,2     |
| p-Nitrofenil α-D-glicosídeo | 7,4 ± 2,0     |
| Trealose                    | 4,9 ± 2,4     |

\* A celobiase foi purificada submetendo-se amostras da fração solúvel (sobrenadante, 100.000 x g, 60 min., 4°C) de homogeneizados de ventrículos a eletroforese em cilindros de gel de poliacrilamida 8,5%. As frações do gel correspondentes ao pico de atividade da celobiase foram reunidas e usadas como fonte de enzima purificada. A celobiase purificada foi incubada com cada um dos glicosídeos (7 mM) relacionados com e sem celobiase (3 mM) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5 a 30°C. Os valores são médias e desvios padrões da média de três determinações independentes.

A velocidade da reação da enzima com dois sítios diferentes, cada um catalisando a hidrólise de um substrato diferente, será dada pela equação:

$$v = \frac{v_a [a]}{K_a + [a]} + \frac{v_b [b]}{K_b + [b]}$$

onde todos os termos tem o mesmo significado da equação anterior. As velocidades calculadas quando um mesmo sítio da celobiase é capaz de hidrolisar os vários substratos concorda satisfatoriamente com as velocidades obtidas experimentalmente (Tabela 22).

Tabela 22 - Competição entre substratos da celobiase

| Substrato A<br>(4 mM)               | Substrato B<br>(4 mM)                 | V calculado ( $\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}$ ) |          | V observado<br>( $\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---|----------|--|
|                                     |                                       | 1 sítio   | 2 sítios |  |
| p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo | p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo | 8,5   | 20       | 5,3 $\pm$ 0,3                                      |
| "                                   | p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucosídeo    | 6,6   | 15       | 5,6 $\pm$ 0,1                                      |
| "                                   | p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilosídeo    | 3,7   | 4,6      | 2,9 $\pm$ 0,1                                      |

\* Os substratos a e b foram adicionados juntos e incubados com a celobiase em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5 a 30°C. As velocidades observadas para um e dois sítios foram calculadas a partir dos dados da Tabela 20, fazendo uso das equações apresentadas no texto. As v observadas correspondem as médias e desvios padrões da média obtidos a partir de 3 determinações independentes.

#### 3.2.8.4. Inibição da celobiase por Tris e lactonas

Tris,  $\delta$ -gliconolactona e  $\gamma$ -galactonolactona são inibidores competitivos lineares simples da celobiase. Tris ( $K_i$  0,54  $\pm$

0,09 mM) e  $\gamma$ -galactonolactona ( $K_i$   $0,16 \pm 0,02$  mM) são bons inibidores, enquanto que  $\delta$ -gliconolactona é um inibidor excepcional, com  $K_i$   $0,85 \pm 0,05$   $\mu$ M. O  $K_i$  para o ácido glicônico é  $0,430 \pm 0,002$  mM, isto é 500 vezes maior que o  $K_i$  para gliconolactona. Não está afastada a possibilidade de que a inibição observada com ácido glicônico seja devido a uma contaminação pela gliconolactona remanescente na preparação do ácido glicônico. O  $K_i$  para Tris e  $\gamma$ -galactonolactona são os mesmos quando se utiliza celobiose ou lactose como substrato. Esse resultado é mais uma evidência de que  $\beta$ -glicosídeos e  $\beta$ -galactosídeos são clivados por um mesmo sítio ativo da enzima.

#### 3.2.8.5. Inativação térmica da celobiase

A inativação térmica a  $53^\circ\text{C}$  da celobiase solúvel de *E. ello* pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem, onde uma forma molecular instável mais ativa se transforma em outra estável menos ativa (Figura 29). O fato das constantes de inativação de primeira ordem serem aproximadamente as mesmas para os vários substratos utilizados sugere que esses substratos são clivados por uma mesma enzima, em um mesmo sítio ativo.

#### 3.2.8.6. Configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase e o parâmetro $\rho$

Os resultados apresentados na Figura 30 mostram que a celobiase libera  $\beta$ -D-glicose a partir de o-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo, sugerindo que a reação catalisada pela enzima ocorre com retenção de configuração. Além disso, a utilização de vários substratos fenil- $\beta$ -D-glicosídeos p-substituídos e de vários substratos fenil- $\beta$ -D-galactosídeos p-substituídos (Tabela 20) possibilitou a determinação do parâmetro  $\rho$  da equação de Hammet-Hansch (HANSCH et al., 1965) que contém informação do tipo de mecanismo envolvido em catálise. A e-

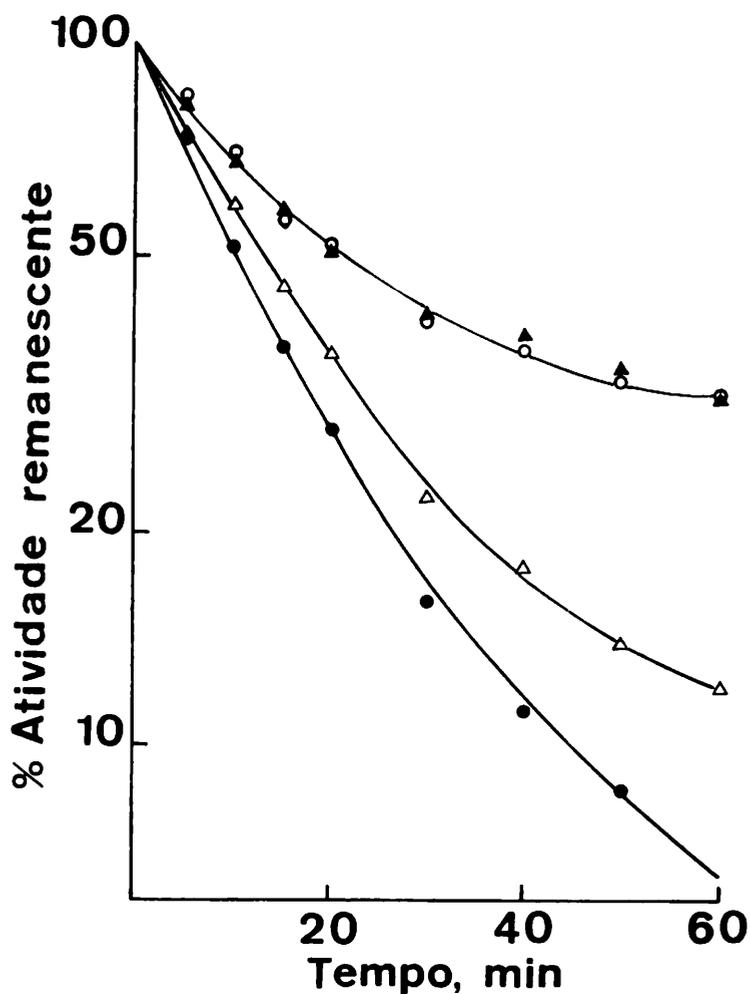


Figura 29 - Inativação térmica a 53°C da celobiase em tampão fosfato 50 mM pH 6,5. Os substratos utilizados foram: ●, pNPβGal; Δ, pNPβGli; ○, celobiose; ▲, lactose. Os pontos correspondem a resultados experimentais, enquanto que as curvas são teóricas. As curvas foram calculadas assumindo as seguintes atividades residuais (%) e constantes de inativação ( $s^{-1}$ ), respectivamente, para cada substrato. Celobiose e lactose: 30%,  $9,8 \times 10^{-4} s^{-1}$ . pNPβGli: 10%,  $10 \times 10^{-4} s^{-1}$ . pNPβGal: 6%,  $12 \times 10^{-4} s^{-1}$ .

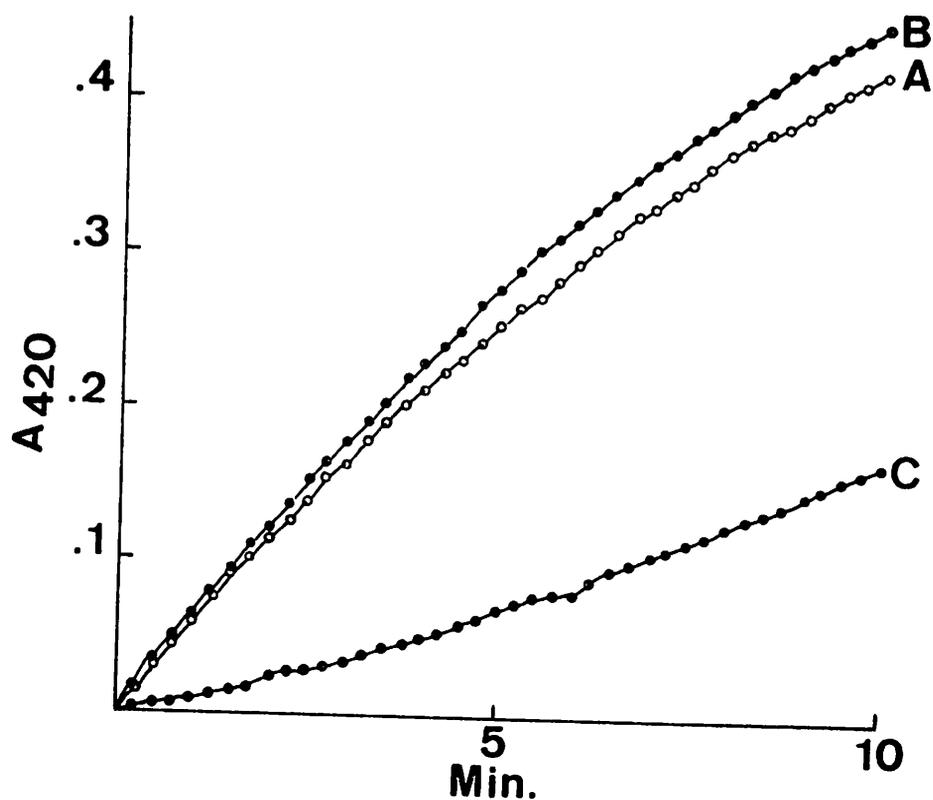


Figura 30 - Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase. A, D-glicose liberada pela celobiase. Após a anomerização (obtida por fervura), a curva experimental permanece idêntica; B,  $\alpha$ -D-glicose após anomerização; C,  $\alpha$ -D-glicose controle. As concentrações de glicose, e demais condições experimentais, em B e C são semelhantes àsquelas em A. Detalhes em Materiais e Métodos.

quação de Hammet-Hansch é a seguinte:  $\log V_x = K\pi + \rho\sigma + c$ , onde  $V_x$  é a velocidade máxima para um substrato com um substituinte  $x$ ;  $K$ ,  $\rho$  e  $c$  são constantes.  $\pi$  é um parâmetro de hidrofobicidade e  $\sigma$  é a constante de Hammet (JAFFE, 1953; HAMMET, 1970). O valor de  $\rho$  encontrado para a celobiase foi  $-0,26$  utilizando substratos fenil  $\beta$ -D-glicosídeos  $p$ -substituídos e  $0,36$  para substratos fenil  $\beta$ -D-galactosídeos  $p$ -substituídos.

#### 4. DISCUSSÃO

##### 4.1. O cenário da ação digestiva nas larvas de *E. ello*

As larvas de *E. ello* alimentadas com folhas de *Euphorbia pulcherrima* crescem bem, alcançando comprimento e peso semelhantes a larvas vivendo em condições naturais (cf. TERRA et al., 1982). O índice de consumo de folhas de *E. pulcherrima* para larvas de *E. ello* é 2,1, isto é, a larva come 2,1 vezes seu próprio peso por dia, o que é característico de larvas de Lepidoptera (cf. CHAPMAN, 1982). O baixo coeficiente de digestibilidade de folhas de *E. pulcherrima* encontrado para *E. ello*, 45 (em comparação com 72 para a vaca, cf. TRAGER, 1953) é também característico de larvas de Lepidoptera (cf. CHAPMAN, 1982). Esses índices podem ser considerados como adaptações para conciliar uma alta velocidade de crescimento com uma alimentação na base de folhas de plantas que apresentam baixo conteúdo protéico. Dessa forma, as larvas precisam digerir o conteúdo celular de grande quantidade de folhas, enquanto deixam as paredes celulares intactas para economizar tempo, a fim de obter uma quantidade suficiente de proteínas para manter uma alta taxa de crescimento. As evidências que apoiam essa hipótese consistem na ausência de células no intestino de *E. ello* e a descoberta de que as fezes das larvas apresentam células vazias com as paredes celulares intactas. Uma evidência mais direta para a referida hipótese foi relatada para o bicho da seda. Esta larva digere 62% da proteína e 0,7% das paredes celulares de folhas de amora, enquanto que a vaca digere 75% da proteína e 74% das paredes celulares de capim seco (cf. TRAGER, 1953).

A atividade digestiva que permite a enorme voracidade das larvas de *E. ello* tem como cenário o seu tubo digestivo. O tubo digestivo da larva de *E. ello*, como dos demais insetos, é dividido em uma região anterior, responsável pela ingestão e trituração do bolo

alimentar, uma região média (o ventrículo), responsável pela digestão e absorção do alimento e uma região posterior, responsável pela formação das fezes. O ventrículo de *E. ello* é formado por três regiões sucessivas que diferem no grau de dobramento do epitélio. Existem três tipos de células no ventrículo: as células colunares, as caliciformes e as endócrinas (estas pouco abundantes e, por isso, não serão mais tratadas aqui). As células mudam de morfologia ao longo do ventrículo (Figuras 3, 4, 5 e 7).

As células caliciformes do ventrículo de *E. ello* apresentam partículas nas membranas de suas microvilosidades (Figuras 4.6 e 7.14). Admite-se que essas partículas, os  $K^+$ -portassomos, correspondem à  $K^+$ -ATPase, presumivelmente responsável pela excreção de potássio nas larvas dos Lepidoptera (WOLFERSBERGER, 1979; WOLFERSBERGER et al., 1982; HARVEY et al., 1983). As células caliciformes da região anterior do ventrículo possuem mais partículas ao longo da membrana de suas microvilosidades, e mais mitocôndrias associadas, que as células caliciformes da região posterior do ventrículo (comparar Figuras 4.6 e 4.7 com 7.13 e 7.14). Isto sugere que há mais processos dependentes de energia associados aos  $K^+$ -portassomos da região anterior, do que da região posterior do ventrículo. Contudo, CIOFFI & HARVEY, 1981 demonstraram em uma outra mariposa da família Sphingidae (*Manduca sexta*), que o transporte líquido de potássio é maior na região posterior do que na região anterior do ventrículo, expressando os resultados por região ou por célula. Esses resultados aparentemente conflitantes podem ser explicados se admitirmos que as células caliciformes da região anterior tem que gerar gradientes de potássio maiores do que os das células caliciformes da região posterior, a fim de excretar potássio. O significado fisiológico da manutenção de uma elevada concentração de potássio no interior da cavidade das células caliciformes da região anterior seria duplo. Primeiro, nessas condições seria possível a secreção de po-

tássio em altas concentrações, isto é, com poucas moléculas de água acompanhantes. Segundo, a existência de potássio concentrado na base das células caliciformes poderia assistir à absorção de água pelas células colunares vizinhas, ao facilitar a difusão do potássio (ver detalhes abaixo).

A existência de um bordo em escova bem desenvolvido, de um grande número de mitocôndrias presentes no citoplasma apical e de invaginações da membrana plasmática basal com mitocôndrias associadas poderia proporcionar às células colunares a capacidade de transportar íons e água (ver THREADGOLD, 1976). O fato das invaginações da membrana plasmática basal constituírem um compartimento extracelular distinto, com acesso restrito para a hemolinfa (devido ao pequeno número de aberturas para o espaço extracelular subjacente), poderia capacitar as células colunares da região anterior e média do ventrículo a concentrar solutos nesse compartimento, criando um gradiente de pressão osmótica entre aquele compartimento e o lúmen, o que poderia levar à absorção de água (cf. BERRIDGE, 1970). A difusão de potássio da cavidade basal das células caliciformes poderia facilitar a concentração de solutos no compartimento extracelular das células colunares da região anterior e média do ventrículo. Nessas condições, as células colunares poderiam absorver água eficientemente, sem absorver potássio do lúmen do ventrículo. As invaginações da membrana plasmática basal das células colunares da região posterior do ventrículo, em contraste com aquelas da região anterior e média, apresentam aberturas regulares para o espaço extracelular subjacente, semelhante àsquelas de células secretoras, como por exemplo nos tubos de Malpighi (BERRIDGE, 1970). Além disso, as invaginações da membrana plasmática basal das células colunares posteriores formam um arranjo paralelo extenso, que acompanha a superfície das células caliciformes vizinhas. É possível que tais arranjos facilitem a secreção de água, associado com a excreção de potás

sio, pela região posterior do ventrículo.

A natureza ultraestrutural das células ventriculares da larva de *E. ello*, discutida acima, permite supor que haveria secreção de água no terço posterior do ventrículo e sua absorção nos dois terços anteriores do ventrículo, resultando em um fluxo de fluido em contracorrente com o movimento do bolo alimentar (este move-se da região anterior para a região posterior do ventrículo). Dessa forma, *E. ello* poderia apresentar um mecanismo de reciclagem das enzimas que penetrassem no espaço endoperitrófico como proposto para *R. americana* (ver item 1.3).

A existência dos presumidos fluxos de fluidos na larva de *E. ello* foi confirmada pelas experiências em que amarante foi introduzido no esôfago e injetado na hemolinfa de larvas de *E. ello*. Como se recorda, os resultados sugeriram que os dois terços anteriores do ventrículo absorvem água, enquanto que o último terço, secreta água.

#### 4.2. A natureza dos agentes da digestão nas larvas de *E. ello*

A discussão sobre a natureza dos agentes da digestão na larva de *E. ello* será dividida em três partes. Na primeira parte serão apresentados breves comentários sobre as principais enzimas (com exceção da celobiase) que ocorrem no ventrículo de *E. ello* e serão indicadas as tabelas que resumem as suas propriedades físicas e cinéticas. A seguir, serão comentadas as implicações fisiológicas e evolutivas de algumas propriedades das enzimas de *E. ello*. Finalmente, serão discutidos os resultados sobre a celobiase, que foi a enzima de *E. ello* melhor estudada.

Existem três  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases, no ventrículo de *E. ello*, que diferem entre si apenas em relação aos valores de pI.

Outros dados referentes a essa enzima são encontrados na Tabela 19.

*E. ello* apresenta uma amilase solúvel e uma amilase ligada às membranas das células colunares do ventrículo, que possuem parâmetros cinéticos muito semelhantes entre si e são imunologicamente idênticas. Abaixo será discutida a possibilidade da amilase solúvel ser derivada por processamento da amilase de membrana. Uma propriedade curiosa da amilase de *E. ello* é não ser ativada por cloreto, em contraste com numerosas outras amilases de insetos (veja em TERRA et al., 1977). Outras propriedades da amilase estão descritas na Tabela 18).

O ventrículo de *E. ello* apresenta dois tipos de carboxipeptidases: uma carboxipeptidase majoritária ligada às membranas das microvilosidades ( $M_r$  136.000) e uma minoritária, solúvel. A carboxipeptidase solúvel parece ser um hexâmero formado por duas subunidades de cada uma de três cadeias polipeptídicas que diferem entre si apenas em carga elétrica. Outras propriedades da carboxipeptidase solúvel estão resumidas na Tabela 18.

$\beta$ -frutosidase é uma enzima típica de fungos, geralmente considerada como estando ausente dos animais, embora haja relatos que mencionem a sua presença em insetos (MARZLUF, 1969; HUBER & LEBEVRE, 1971; HUBER & THOMPSON, 1973; HUBER, 1975; HUBER & MATHISON, 1976). Tanto quanto sabemos, este é o primeiro relato onde uma  $\beta$ -frutosidase de inseto foi caracterizada. A sua função no ventrículo da larva de *E. ello* parece ser de hidrolisar especificamente sacarose, uma vez que este substrato praticamente não é hidrolisado pela maltase ( $\alpha$ -glicosidase) de *E. ello*. As propriedades físicas e cinéticas da  $\beta$ -frutosidase de *E. ello* estão reunidas na Tabela 19.

A  $\alpha$ -galactosidase não é uma enzima muito ativa em *E. ello*. Os resultados sugerem que ela é um dímero que se dissocia em monômero

ros durante a eletroforese em gel de poliacrilamida. Outras propriedades da  $\alpha$ -galactosidase ventricular estão apresentadas na Tabela 19.

A similaridade dos parâmetros cinéticos da maltose 1 ( $M_r$  151.000) e da maltose 2 ( $M_r$  34.000) da larva de *E. ello*, suas taxas de inativação térmica idênticas e a descoberta de uma única espécie molecular de maltase por ultracentrifugação em gradiente de densidade ( $M_r$  134.000, Tabela 19) sugere que a maltase 1 é um tetrâmero da maltase 2. Este tetrâmero parece dissociar-se nas condições alcalinas que prevalecem durante a eletroforese. Essa hipótese é sustentada pela descoberta de que a maltase 1 purificada migra como a maltase 2 em cilindros de géis de poliacrilamida preparados sem o gel de empilhamento. Nessas condições o pH vigente durante a eletroforese é superior ao observado nos cilindros preparados com gel de empilhamento (cf. DAVIS, 1964). Outra evidência a apoiar aquela hipótese é a observação de que a maltase 2 purificada sedimenta-se em gradientes contínuos de glicerol como uma molécula de peso molecular de 92.000.

A tripsina de *E. ello* hidrolisa eficientemente BAPA e é fortemente inibida por benzamidina ( $K_i$  18  $\mu$ M), como ocorre com a maioria das tripsinas descritas (MARES-GUIA & SHAW, 1965). Da mesma forma que para amilase, a tripsina solúvel deve ser derivada de uma tripsina ligada a membrana das células colunares. Outras propriedades da tripsina estão resumidas na Tabela 18.

As propriedades da aminopeptidase e da trealase de *E. ello* estão resumidas nas Tabelas 18 e 19.

As dissacaridases (celobiase,  $\beta$ -frutosidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase) apresentam valores ótimos de pH em torno de 6 (Tabela 19) e se encontram majoritariamente associadas ao gli-

cocálix das células colunares posteriores (ver item 4.3). Por outro lado, os valores de pH determinados com um eletrodo de vidro na superfície do ventrículo posterior é 7,8 e no seu lúmen é 9,4 (Tabela 2). É tentador tentar explicar a aparente contradição assumindo que haja um gradiente de pH da superfície celular até o lúmen do ventrículo. Dessa forma, o pH nas vizinhanças do glicocálix poderia ser próximo a 6 e, portanto, mais compatível com as propriedades das dissacaridases. O pH ótimo da  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase é baixo (4,5), mas como a sua atividade diminui lentamente em pHs crescentes, ela apresentaria ainda cerca de 84% de sua atividade (se a hipótese acima for verdadeira) nas vizinhanças do glicocálix das células colunares, onde ela predomina.

Os estudos físico-químicos das enzimas digestivas de *E. ello* levou à descoberta de que várias das enzimas que não penetram no seu espaço endoperitrófico (p. ex. carboxipeptidase,  $\alpha$ -galactosidase e maltase) apresentam subunidades semelhantes (ou idênticas) entre si. O interesse desse achado é o fato dele apoiar a hipótese levantada por TERRA et al. (1985) sobre a evolução dos sistemas digestivos nos insetos superiores. Terra et al. (1985) inicialmente mostraram que todas as enzimas digestivas dos Coleoptera são pequenas o suficiente para atravessar a membrana peritrófica, enquanto que o mesmo não acontece com os insetos mais evoluídos como os Diptera (p. ex. *Rhynchosciara americana*) e os Lepidoptera (p. ex. *E. ello*). Eles admitiram então que a mudança no tamanho das hidrolases poderia ser uma consequência de poucas mutações que afetassem as suas moléculas, de modo que elas pudessem se arranjar em hidrolases oligoméricas compostas de umas poucas subunidades idênticas.

A celobiase solúvel de *E. ello* hidrolisa  $\beta$ -D-glicosídeos,  $\beta$ -D-galactosídeos,  $\beta$ -D-fucosídeos e  $\beta$ -D-xilosídeos, mas não hidrolisa  $\alpha$ -D-glicosídeos e  $\alpha$ -D-galactosídeos. As tentativas de separar a

atividade sobre  $\beta$ -D-glicosídeos da atividade sobre os outros substratos relacionados acima, usando várias técnicas de separação (eletroforese em gel de poliacrilamida, focalização isoelétrica e centrifugação em gradiente de densidade), foram infrutíferas. Os experimentos de competição entre substratos levam a crer que  $\beta$ -D-glicosídeos,  $\beta$ -D-galactosídeos,  $\beta$ -D-fucosídeos e  $\beta$ -D-xilosídeos são hidrolisados em um mesmo sítio ativo. A idêntica conclusão se chega ao apreciar o fato de que a celobiase apresenta constantes de inativação térmica praticamente iguais para diferentes substratos (celobiose e lactose  $9,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , pNP $\beta$ Gli  $10 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e pNP $\beta$ Gal  $12 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Além disso, o valor de  $K_i$  para Tris e para galactonolactona é o mesmo, independente do fato da celobiase ser ensaiada com celobiose ou lactose. Isso reafirma a conclusão anterior de que  $\beta$ -glicosídeos e  $\beta$ -galactosídeos são hidrolisados em um mesmo sítio ativo. Os resultados sugerem que a celobiase ventricular de *E. ello* é uma enzima que hidrolisa ligações  $\beta$ -glicosídicas com baixa especificidade em relação ao substrato.

Os valores do  $K_i$  para oNP $\beta$ Gli (5,7 mM), em uma reação onde celobiose é o substrato, e o  $K_i$  para celobiose (3,2 mM), em uma reação onde oNP $\beta$ Gli é o substrato, concordam com os valores de seus respectivos  $K_m$ s (7,4 e 2 mM). Como os valores de  $K_i$  dos inibidores competitivos lineares simples correspondem às constantes de dissociação verdadeiras dos respectivos complexos enzima-inibidores (cf. SEGEL, 1975) a concordância mencionada acima sugere que os  $K_m$ s da celobiase são na realidade  $K_{ss}$ , isto é, constantes de dissociação dos complexos enzima-substrato. Isso leva a conclusão que a celobiase deve operar segundo uma cinética de equilíbrio rápido.

Os mecanismos possíveis de hidrólise de ligações glicosídicas estão bem discutidos em várias publicações (CAPON, 1969; COGOLLI & SEMENZA, 1975; LEGLER, 1975; FERREIRA & TERRA, 1983) e não serão, por isso, detalhadas aqui. O fato da hidrólise de substratos  $\beta$ -

glicosídicos catalisada pela celobiase ocorrer com a liberação de  $\beta$ -D-glicose elimina os mecanismos do tipo substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N^2$ ) e catálise básica (inclusive geral), porque o primeiro tipo implicaria na inversão de configuração dos produtos e o segundo, no aparecimento de isômeros da glicose. Restam duas possibilidades principais: (1) qualquer mecanismo que envolva um número par de substituições nucleofílicas no  $C_1$  do glicosídeo, formando um intermediário enzima-substrato covalente e (2) um mecanismo semelhante à catálise ácida com a formação de um íon carbonium intermediário capaz de sofrer um ataque frontal pela água.

O mecanismo 1 leva à previsão de que os substituintes no aglicone não devem influenciar a constante catalítica da reação, pois de regra o passo limitante de uma reação que envolve um intermediário covalente é a etapa de sua saída da enzima (cf. FERSHT, 1977). Uma inspeção na Tabela 20 mostra claramente que os substituintes no aglicone influenciam a constante catalítica da reação da celobiase, sugerindo que o passo limitante da reação é a saída do aglicone. Por outro lado, as evidências que sugerem que a celobiase opera segundo uma cinética de equilíbrio rápido (que implica no complexo enzima - substrato estar em equilíbrio com o substrato e enzima livre) apoiam a hipótese de que o passo limitante da reação é a saída do aglicone. Finalmente, as constantes de reação  $\rho$  determinadas para a celobiase atuando tanto sobre fenil  $\beta$ -D-glicosídeos para substituídos ( $\rho = -0,26$ ) quanto sobre fenil  $\beta$ -D-galactosídeos para substituídos ( $\rho = 0,36$ ) são muito diferentes do valor esperado para uma reação com mecanismo semelhante ao 1. Este valor deveria ser próximo ao de reações com mecanismos semelhantes aos de catálise básica (onde ocorre um ataque nucleofílico da hidroxila 2 sobre o  $C_1$ , com a saída do aglicone) e que é de cerca de 2,5 (NATH & RYNDON, 1954).

O mecanismo 2 concorda com os dados experimentais que in-

dicam que o passo limitante da reação é a saída do aglicone, concorda com o valor de  $\rho$  encontrado (que é semelhante aos determinados em catálises ácidas, que são números negativos ou próximo de zero; cf. COGOLI & SEMENZA, 1975), além de permitir prever uma excepcional inibição da celobiase por  $\delta$ -gliconolactona. Essa inibição excepcional, que foi encontrada, sugere que a lactona (que é semelhante em estrutura ao íon carbonium, cf. LEVY & SNAITH, 1972) seja um análogo do estado de transição (ion carbonium) formado durante a catálise da celobiase (cf. WOLFENDEN, 1972; LIENHARD, 1973). De acordo com esse mecanismo a hidrólise de  $\beta$ -D-glicosídeos pela celobiase provavelmente ocorre através da protonação do oxigênio da ligação glicosídica. Como o mecanismo de hidrólise de tioglicosídeos é aparentemente o mesmo de glicosídeos (CAPON, 1969), o fato da velocidade de hidrólise de p-nitrofenil-1-tio  $\beta$ -D-glicosídeo ser muito menor que a velocidade de hidrólise de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicosídeo (Tabela 20) apoia o mecanismo proposto acima. Como se sabe, o enxofre é menos básico que o oxigênio, o que torna a sua protonação mais difícil que a do oxigênio (CAPON, 1969).

#### 4.3. A distribuição das enzimas nas diferentes regiões do tubo digestivo da larva de *E. ello*

As larvas de *E. ello* não apresentam enzimas digestivas nas glândulas salivares, e as atividades enzimáticas recuperadas das folhas comidas pelas larvas são insignificantes. Além disso, as atividades medidas no intestino anterior e intestino posterior correspondem a menos do que 2% daquelas encontradas no ventrículo. Dessa forma, praticamente todo o processo digestivo deve ocorrer sob a ação de hidrolases ventriculares como é comum entre os insetos (cf. WIGGLESWORTH, 1972). Além disso, não foi encontrado nenhum ativador ou inibidor presente nas células ventriculares ou no lúmen do

ventrículo, que afetasse as enzimas digestivas de *E. ello*.

As hidrolases aminopeptidase, celobiase, fosfatase alcalina,  $\beta$ -frutoseidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase devem ser restritas às células ventriculares, porque as suas atividades específicas no fluido ectoperitrófico são menores que nas células ventriculares (Tabela 5). Dessa forma, a ocorrência daquelas atividades no fluido ectoperitrófico poderia ser explicada por descamação e/ou rompimento celular durante a dissecação.

As enzimas  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, amilase, carboxipeptidase e tripsina devem ser secretadas para o espaço ectoperitrófico, porque as suas atividades específicas no fluido ectoperitrófico são maiores do que aquelas determinadas nas células (Tabela 5). Se as enzimas detectadas no espaço ectoperitrófico fossem consequência de descamação celular e/ou rompimento celular durante a dissecação, suas atividades específicas deveriam ser iguais ou menores do que as atividades específicas medidas nas células, porque as proteínas celulares (incluindo as enzimas em consideração) seriam diluídas pelas proteínas previamente presentes no fluido ectoperitrófico.

Dentre as enzimas que seriam secretadas para o espaço ectoperitrófico, somente a amilase e a tripsina ocorrem com elevadas atividades específicas nos conteúdos da membrana peritrófica (Tabela 5). Isso sugere que apenas essas duas enzimas penetrariam no espaço endoperitrófico. O fato de somente amilase e tripsina serem encontradas em grandes quantidades nos regurgitados das larvas de *E. ello* comprovaram a hipótese levantada acima, além de concordar com a afirmação de HORIE (1959), que os Lepidoptera (ele estudou *Bombyx mori*) apresentam uma única glicosidase nos seus regurgitados: a amilase. Deve-se mencionar ainda que além de tripsina e amilase, os regurgitados de *E. ello* apresentam pequenas quantidades de aminopeptidase e celobiase que, entretanto, diferem em migração eletroforé-

tica das contrapartidas encontradas no tecido ventricular. Essas du as últimas enzimas devem ser produtos das folhas ingeridas pelo inseto.

Nesse ponto, surge uma questão interessante. O que impediria a algumas enzimas presentes no espaço ectoperitrófico de atravessarem a membrana peritrófica?

Uma comparação entre os diâmetros das enzimas que atravessam a membrana peritrófica (amilase e tripsina), com os daquelas que não atravessam a membrana peritrófica ( $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e carboxipeptidase) (Tabelas 18 e 19) sugere a resposta: os poros da membrana peritrófica da larva de *E. ello* teriam um diâmetro de 7 a 7,5 nm. Essa estimativa está de acordo com os dados obtidos usando partículas de ouro coloidal em *Aedes aegypti* (ZHUKHNIKOV, 1970) e com os dados obtidos a partir do estudo da distribuição das enzimas no ventrículo das larvas de *R. americana* (TERRA & FERREIRA, 1983) e *T. pubescens* (ESPINOZA-FUENTES et al., 1984). É interessante notar que *A. aegypti*, *R. americana* e *T. pubescens* possuem membrana peritrófica do tipo II (ver WIGGLESWORTH, 1972), enquanto que as larvas de *E. ello* apresentam membrana peritrófica do tipo I (ver WIGGLESWORTH, 1972). As membranas do tipo I se caracterizam por serem sintetizadas por grande parte da superfície ventricular, por um processo semelhante a uma delaminação, enquanto que aquelas do tipo II são sintetizadas por um anel de células dispostas na região limite entre o ventrículo e o intestino anterior.

O estudo da distribuição das enzimas nas regiões do ventrículo discutidas acima mostraram que algumas enzimas são restritas as células (aminopeptidase, celobiase, fosfatase alcalina,  $\beta$ -frutuosidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase), enquanto outras são encontradas nas células e no lúmen do ventrículo ( $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, amilase, carboxipeptidase e tripsina). A localização des

sas enzimas nas células ventriculares juntamente com os processos envolvidos na secreção das enzimas encontradas no lúmen ventricular serão discutidos a seguir.

A aminopeptidase está enriquecida, enquanto que a succinato e a lactato desidrogenase não estão, na fração  $P_3$  (centrifugação diferencial) e na fração  $S_3$  (sonicação) (Figuras 9 e 10, Tabelas 14 e 15) obtidas de homogeneizados das células de ventrículos anteriores e posteriores. Essas frações apresentam, ao microscópio eletrônico, principalmente microvilosidades das células colunares (Figuras 11E, 12C e 13D). Por outro lado, a atividade específica de aminopeptidase em preparações de membrana aumenta, quando essas membranas são lavadas (Tabela 10), e é possível remover praticamente a totalidade da aminopeptidase dessas membranas com detergente (Tabela 17). Esses resultados levam à conclusão que a aminopeptidase é uma proteína integrante das membranas plasmáticas que cobrem as microvilosidades das células colunares (mas não das células caliciformes) do ventrículo de *E. ello*. Assim, o fato de que a fração de microvilosidades obtidas por precipitação diferencial com cálcio estar tão enriquecida em aminopeptidase como as frações  $P_3$  e  $S_3$  é um argumento em favor de que a chamada fração de microvilosidades consiste principalmente de microvilosidades de células colunares. Uma inspeção dessa fração ao microscópio eletrônico revela perfis de membranas que não apresentam partículas ao longo de sua superfície e que, por isso, devem ser derivadas das microvilosidades das células colunares (Figura 13C). O cálcio parece agregar mitocôndrias (como em enterócitos de mamíferos) e as membranas plasmáticas das células caliciformes. Essas membranas são reconhecíveis pelas partículas a ela associadas (Figura 13B).

Uma comparação entre os três métodos utilizados para a preparação de microvilosidades das células colunares está mostrado nas

Tabelas 23 e 24. A centrifugação diferencial e a sonicação são demoradas e exigem o uso de tecido fresco, enquanto que a precipitação diferencial por cálcio é mais fácil, de realização rápida e pode utilizar tecido congelado. Embora as preparações de microvilosidades obtidas por precipitação diferencial com cálcio sejam um tanto contaminadas por mitocôndrias e citossol, os níveis encontrados são aceitáveis para a maioria dos propósitos como, por exemplo, servir de material de partida para a purificação de enzimas de microvilosidades. Os níveis de contaminação das preparações de microvilosidades podem ser diminuídos, se necessário, por tratamento com Tris seguido por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de glicerol (ver item 3.1.10) e/ou por repetidas lavagens como descrito para preparações de enterócito de mamífero (KESSLER et al., 1978). A técnica de sonicação de tecido proporciona preparações de microvilosidades das células colunares virtualmente livres de contaminantes, se condições controladas e adequadas são utilizadas (CIOFFI & WOLFERSBERGER, 1983). Contudo, o método é trabalhoso e a recuperação das membranas das microvilosidades é baixa (Tabelas 23 e 24). Provavelmente este é o método mais adequado para preparar membranas plasmáticas que não sejam das microvilosidades das células colunares.

A distribuição da atividade de fosfatase alcalina pelas frações subcelulares obtidas por diferentes técnicas é semelhante àquela da aminopeptidase, o que sugere que a fosfatase alcalina (como a aminopeptidase) ocorra somente nas microvilosidades das células colunares.

Nas células do ventrículo da larva de *E. ello*, a celobiose e a maltase são encontradas somente na forma solúvel (Figuras 9 e 10). Se isso é verdadeiro, a recuperação de quantidades apreciáveis dessas enzimas na fração P<sub>1</sub> (Figuras 9 e 10) precisa ser explicada. É possível que as glicosidases desta fração sejam enzimas de

Tabela 23 - Atividades enzimáticas em diferentes preparações de microvilosidades das células colunares do ventrículo anterior\*

| Enzimas                 | Centrifugação diferencial |                         | Sonicação       |                         | Precipitação diferencial |                         |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                         | Recuperação (%)           | Fator de enriquecimento | Recuperação (%) | Fator de enriquecimento | Recuperação (%)          | Fator de enriquecimento |
| Amilase                 | 3 ± 1                     | 0,7 ± 0,2               | 11 ± 0,4        | 3,7 ± 0,3               | 11,4 ± 0,7               | 1,9 ± 0,2               |
| Aminopeptidase          | 20 ± 2                    | 4,7 ± 0,2               | 11,8 ± 0,4      | 4,0 ± 0,2               | 26 ± 6                   | 4,2 ± 0,9               |
| Celbiase                | 0,03 ± 0,01               | 0,007 ± 0,001           | 0,9 ± 0,1       | 0,30 ± 0,03             | 1,4 ± 0,2                | 0,23 ± 0,05             |
| Lactato desidrogenase   | 1,4 ± 0,3                 | 0,33 ± 0,03             | 0,5 ± 0,4       | 0,2 ± 0,1               | 3 ± 1                    | 0,4 ± 0,1               |
| Succinato desidrogenase | 1,9 ± 0,2                 | 0,44 ± 0,03             | 0,22 ± 0,06     | 0,09 ± 0,02             | 3,8 ± 0,2                | 0,44 ± 0,02             |
| Tripsina                | 13 ± 1                    | 3,1 ± 0,1               | 5,8 ± 0,5       | 2,0 ± 0,2               | 5,7 ± 0,9                | 0,9 ± 0,1               |

\* As microvilosidades preparadas por centrifugação diferencial correspondem as membranas da fração P<sub>3</sub> (ver Figuras 9 e 10); aquelas preparadas por sonicação correspondem a fração S<sub>3</sub> (ver Tabelas 14 e 15) e aquelas obtidas por precipitação diferencial são descritas em Materiais e Métodos (ver Tabelas 11 e 12). A recuperação (e o enriquecimento) foram calculados em relação a atividade (e atividade específica) presente no homogeneizado original do ventrículo ou, no caso da sonicação, em relação à soma de atividades e conteúdo protéico das frações obtidas após a sonicação. Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada.

Tabela 24 - Atividades enzimáticas em diferentes preparações de microvilosidades das células colunas do ventrículo posterior\*

| Enzimas                 | Centrifugação diferencial |                         | Sonicação       |                         | Precipitação diferencial |                         |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                         | Recuperação (%)           | Fator de enriquecimento | Recuperação (%) | Fator de enriquecimento | Recuperação (%)          | Fator de enriquecimento |
| Amilase                 | 9 ± 2                     | 1,23 ± 0,06             | 11,5 ± 0,2      | 2,9 ± 0,3               | 12 ± 2                   | 2,3 ± 0,3               |
| Aminopectidase          | 22 ± 2                    | 4,8 ± 0,3               | 15 ± 2          | 3,7 ± 0,1               | 24 ± 1                   | 4,6 ± 0,2               |
| Celobiase               | 0,059 ± 0,008             | 0,012 ± 0,001           | 1,5 ± 0,2       | 0,35 ± 0,02             | 1,6 ± 0,3                | 0,3 ± 0,06              |
| Lactato desidrogenase   | 3 ± 1                     | 0,38 ± 0,01             | 0,16 ± 0,04     | 0,12 ± 0,08             | 3,1 ± 0,4                | 0,24 ± 0,03             |
| Succinato desidrogenase | 4,6 ± 0,6                 | 0,9 ± 0,1               | 0,85 ± 0,04     | 0,22 ± 0,03             | 5,9 ± 0,6                | 0,47 ± 0,07             |
| Tripsina                | 9,5 ± 0,7                 | 1,9 ± 0,2               | 9 ± 2           | 2,2 ± 0,2               | 6,2 ± 0,9                | 1,2 ± 0,1               |

\* Os resultados são médias e desvios padrões da média baseados em determinações realizadas em 3 preparações diferentes obtidas a partir de 2 larvas cada. Outros detalhes como na Tabela 23.

citossol englobadas em fragmentos celulares. Entretanto, essa hipótese não encontra apoio na distribuição intracelular observada para a lactato desidrogenase, enzima marcadora de citossol (Figuras 9 e 10). É mais provável que as atividades de glicosidases da fração  $P_1$  resultem de enzimas presas no glicocálix presente entre as microvilosidades das células colunares. Essa hipótese é corroborada pela visualização de grandes vesículas com bordos em escova na fração  $P_1$  (Figura 11C). Após vários ciclos de congelamento e descongelamento, essas vesículas provavelmente mudam de estrutura, liberando as enzimas presas ao glicocálix intermicrovilar. O fato de que grande quantidade das glicosidases são encontradas no tecido remanescente (fração  $S_1$ ) após a sonicação, fornece apoio adicional à hipótese de que essas enzimas estão aprisionadas no glicocálix intermicrovilar. É importante recordar que a maior parte do citossol do tecido esvai-se das células durante a sonicação, a julgar pelos dados de lactato desidrogenase (Tabelas 14 e 15). É tentador correlacionar as glicosidases solúveis em vesículas que ocorrem principalmente na fração  $P_2$  (Figuras 9 e 10) com o conteúdo de vesículas secretoras visíveis ao microscópio eletrônico (Figura 12B). Provavelmente essas são as únicas glicosidases verdadeiramente intracelulares. As glicosidases ensaiadas na fração solúvel celular devem corresponder a moléculas frouxamente ligadas ao glicocálix das células colunares, e que devem ser liberadas durante a homogeneização do tecido. O comportamento da trealase segue aproximadamente aquele descrito para celobiase e maltase, exceto por uma alta atividade nas membranas da fração  $P_1$  e fração  $P_4$  (principalmente das células da região posterior do ventrículo) (Figuras 9 e 10). Isto sugere que a maior parte da atividade de trealase é solúvel (com parte presa no glicocálix) e que há possivelmente atividade minoritária presente nos microsossomos, principalmente das células da região posterior do ventrículo. É interessante notar que trealases solúveis e microssômicas ocorrem

no ventrículo de outras larvas de insetos (WYATT, 1967).

$\beta$ -N-acetilglicosaminidase,  $\beta$ -frutosidase e  $\alpha$ -galactosidase não foram ensaiadas nas frações obtidas por centrifugação diferencial. Entretanto, como essas enzimas ocorrem majoritariamente nas células ventriculares na forma solúvel é possível que elas se associem ao glicocálix das células colunares, como descrito para as outras glicosidases. É importante ressaltar, contudo, que a  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase ocorre também no fluido ectoperitrôfico.

A amilase e a tripsina parecem ocorrer tanto na forma solúvel quanto na forma associada a membrana, se levarmos em consideração as grandes quantidades de enzimas que se sedimentam ao centrifugarmos homogeneizados de ventrículos em diferentes condições (água, solução isotônica de baixa força iônica e alta força iônica e soluções salinas hipertônicas). O decréscimo da atividade específica de amilase em microvilosidades purificadas, após tratamento com solução de Tris hiperosmótica, é provavelmente uma consequência da remoção das formas frouxamente associadas a membrana. Por outro lado, o incremento de atividade específica observado para tripsina indica a inexistência de formas dessa enzima frouxamente associadas a membrana. (Tabela 13). Resultados semelhantes foram observados ensaiando essas enzimas em membranas lavadas com solução isotônica de alta força iônica (Tabela 10, terceira lavagem). Entretanto, é provável que pelo menos parte da amilase e da tripsina estejam ligadas à membrana plasmática das microvilosidades das células colunares, porque a distribuição da atividade específica dessas enzimas entre as frações de um gradiente descontínuo de glicerol, ao qual foi aplicado microvilosidades purificadas tratadas com Tris, é semelhante à da fosfatase alcalina e da aminopeptidase (Tabela 13).

As proteínas associadas a membrana são usualmente classificadas em duas amplas categorias: as proteínas periféricas e as

proteínas integrantes (SINGER, 1974). As proteínas periféricas são liberadas das membranas por tratamento com soluções de alta força iônica e admite-se que estejam associadas às proteínas integrantes. As proteínas integrantes estão supostamente embebidas na matriz de lipídeos de onde elas são solubilizadas principalmente pela ação de detergentes. Entretanto, cerca de 20 a 30% das proteínas integrantes são insolúveis em detergentes devido a interações intermoleculares com o citoesqueleto (MERSCHER et al., 1981; LESSLAVER et al., 1982).

Soluções isotônicas de alta força iônica liberam somente parte da amilase e não afetam grandemente a tripsina (Tabela 10, terceira lavagem). Triton X-100 solubiliza apenas parte da amilase e da tripsina de membranas lavadas (Tabela 17). Esses resultados demonstram, que a amilase e a tripsina não são proteínas periféricas nem integrantes típicas. É possível que a amilase e a tripsina associada a membrana sejam proteínas integrantes ligadas ao citoesqueleto ou, alternativamente, proteínas associadas à cadeia de carboidratos de proteínas integrantes ligadas ao citoesqueleto. As membranas plasmáticas são caracterizadas pela presença de um glicocálix, que corresponde aos resíduos de carboidratos ligados às proteínas integrantes e aos glicolipídeos das membranas (HUGHES, 1975). Entretanto, a ligação covalente da amilase e tripsina com os resíduos de carboidratos do glicocálix, após sua secreção para o lúmen ventricular, é difícil de imaginar. Além disso, o fracasso nas tentativas de solubilizar a amilase e a tripsina associadas a membranas com borato de sódio 0,8 M pH 6,0, manose 0,5 M, galactose 0,5 M e glicose 0,5 M em água argumenta contra a existência de uma ligação do tipo lectina entre as enzimas e o glicocálix. Dessa forma, é provável que a amilase e a tripsina associadas a membranas sejam realmente proteínas integrantes tornadas insolúveis em detergente devido a interações intermoleculares com o citoesqueleto.

A amilase e a tripsina solúveis que se sedimentam com a fração P<sub>1</sub> devem corresponder a enzimas aprisionadas no espaço entre as microvilosidades, como discutido acima para as dissacaridases. A amilase e a tripsina solúveis encontradas nas demais frações particuladas são provavelmente envolvidas por membranas. Isto é particularmente evidente no caso da amilase, onde a atividade específica (na forma solúvel) é muito alta nas frações P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub> obtidas das células do ventrículo anterior, e na fração P<sub>4</sub> obtida das células do ventrículo posterior (Figuras 9 e 10). Os recipientes prováveis da amilase solúvel são as pequenas vesículas que são vistas brotando ao longo das microvilosidades das células colunares e fundindo entre si e com o topo das microvilosidades das células colunares do ventrículo anterior (Figuras 3.1 e 11A). Essas vesículas são recuperadas principalmente na fração P<sub>3</sub> obtida a partir das células do ventrículo anterior e na fração P<sub>4</sub> obtida das células do ventrículo posterior (Figuras 11E e 12D).

A amilase solubilizada por pH 10 comporta-se em eletroforese, eletrofocalização, ultracentrifugação em gradiente de densidade e em elevadas temperaturas de forma muito semelhante à amilase solúvel, embora elas apresentem um Km ligeiramente diferente para amido (Tabela 18). O antissoro obtido a partir da amilase solúvel purificada por eletroforese em gel de poliacrilamida reage com a forma solubilizada por pH 10, indicando uma identidade imunológica total entre as duas formas de amilase (Figura 17). Esses resultados, juntamente com a demonstração de que a proteinase associada a membranas das células ventriculares da larva de *Bombyx mori* é imunologicamente idêntica à sua proteinase solúvel (EGUCHI & IWAMOTO, 1976; EGUCHI et al., 1982), sustentam a hipótese de que as formas solúveis de amilase e tripsina em larvas de Lepidoptera são provavelmente derivadas das formas associadas a membranas, por alguma espécie de processamento como, por exemplo, uma proteólise limitada. Se é

verdade que as formas solúveis da amilase e tripsina são derivadas das correspondentes formas associadas a membranas, e que as formas solúveis estão localizadas dentro das pequenas vesículas referidas acima, é possível que as formas associadas a membranas estejam ligadas às membranas das vesículas e que elas tornam-se ligadas à membrana do topo das microvilosidades das células colunares anteriores por fusão de membranas. Apóia essa hipótese a evidência de que a amilase e a tripsina ligadas a membranas estão provavelmente associadas ao citoesqueleto, uma vez que é esperado que vesículas envolvidas em processos contínuos de fusão de membranas apresentem um citoesqueleto bastante desenvolvido (JACOBSON, 1983). Além disso, a razão entre as atividades específicas de aminopeptidase e amilase (ou tripsina) na membrana das microvilosidades (purificadas por precipitação diferencial) das células ventriculares anteriores e nas membranas das vesículas destacantes (Figura 3.3) é bastante diferente (Tabela 16). Isto sugere que o topo das microvilosidades das células ventriculares anteriores de onde as vesículas destacam-se são, como esperado, uma região diferenciada.

As taxas de excreção das enzimas digestivas calculadas a partir de homogeneizados do intestino posterior (Tabela 8) são provavelmente de confiança, porque esses homogeneizados correspondem na realidade aos conteúdos do íleo (região anterior do intestino posterior), que não foram ainda desidratados significativamente. Além disso, experimentos controles mostraram que pelo menos amilase e tripsina são estáveis em condições semelhantes àsquelas vigentes no ventrículo e íleo e foi possível demonstrar também que o ventrículo, o intestino posterior e os tubos de Malpighi não contêm inibidores, nem ativadores, para amilase e tripsina. É possível entretanto que as taxas de excreção determinadas estejam um pouco subestimadas, devido a desnaturação parcial das enzimas causada pela desidratação progressiva do conteúdo do íleo. As taxas calculadas a partir das

fezes são provavelmente falsas, devido a intensa desidratação pela qual passa a bolota fecal antes de sua excreção. A alta taxa de excreção observada para trealase (Tabela 8) é provavelmente um artefato, resultante do fato de se considerar tanto a trealase celular quanto a trealase luminal como se fossem a trealase luminal. É interessante notar que a trealase é encontrada em quase todos os tecidos dos insetos (FRIEDMAN, 1975).

A taxa de excreção de amilase e tripsina (mesmo considerando que elas podem estar um pouco subestimadas) são muito baixas em relação as altas atividades observadas para essas enzimas dentro da membrana peritrófica. Isso sugere a existência de um mecanismo pelo qual a amilase e a tripsina sejam recuperadas do alimento à medida que ele progride no ventrículo e antes que os seus restos sejam excretados. Outra evidência no mesmo sentido é a descoberta de que a amilase e a tripsina ocorrem principalmente na região anterior do conteúdo da membrana peritrófica. Um modelo para o referido mecanismo foi proposto, baseando-se nos fluxos de fluidos observados no ventrículo de *E. ello* (item 4.1), e será desenvolvido no item seguinte.

#### 4.4. Digestão e secreção de enzimas digestivas na larvas de *E. ello*

A análise da ultraestrutura das células ventriculares, os dados sobre a distribuição das enzimas entre diferentes regiões do tubo digestivo, assim como os resultados obtidos para a taxa de excreção de enzimas digestivas, forneceram uma base para a elaboração de um modelo abrangente para a organização espacial do processo digestivo nas larvas de *E. ello*. O modelo proposto é semelhante ao desenvolvido para *R. americana* discutido anteriormente (ver item 1.3). De acordo com esse modelo (Figura 31) um fluido seria secretado para o lúmen da região posterior do ventrículo de *E. ello*, provavel -

poucas aberturas para o espaço extracelular subjacente. A absorção por essas células é provavelmente auxiliada pelas células caliciformes de gargalo comprido. As enzimas (setas contínuas) entram no espaço endoperitrófico anterior de onde são recuperadas paulatinamente à medida que os polímeros que elas hidrolisam tornam-se suficientemente pequenos para acompanhá-las através da membrana peritrófica. As enzimas e nutrientes são a seguir, deslocados para o ventrículo anterior, onde a digestão final e absorção do alimento ocorrem na superfície das células colunares. BL, lâmina basal; BMI, invaginações da membrana basal; BS, vesículas brotantes, GC, complexo de Golgi; GCC, cavidade da célula caliciforme; JC, complexo juncional; Mi, mitocôndria; MM<sub>v</sub>, microvilosidades modificadas; Mt, microtúbulos; Mv, microvilosidades; N, núcleo celular; PV, vesículas destacantes; RER, retículo endoplasmático rugoso; SER, retículo endoplasmático liso; SV, vesícula de secreção.

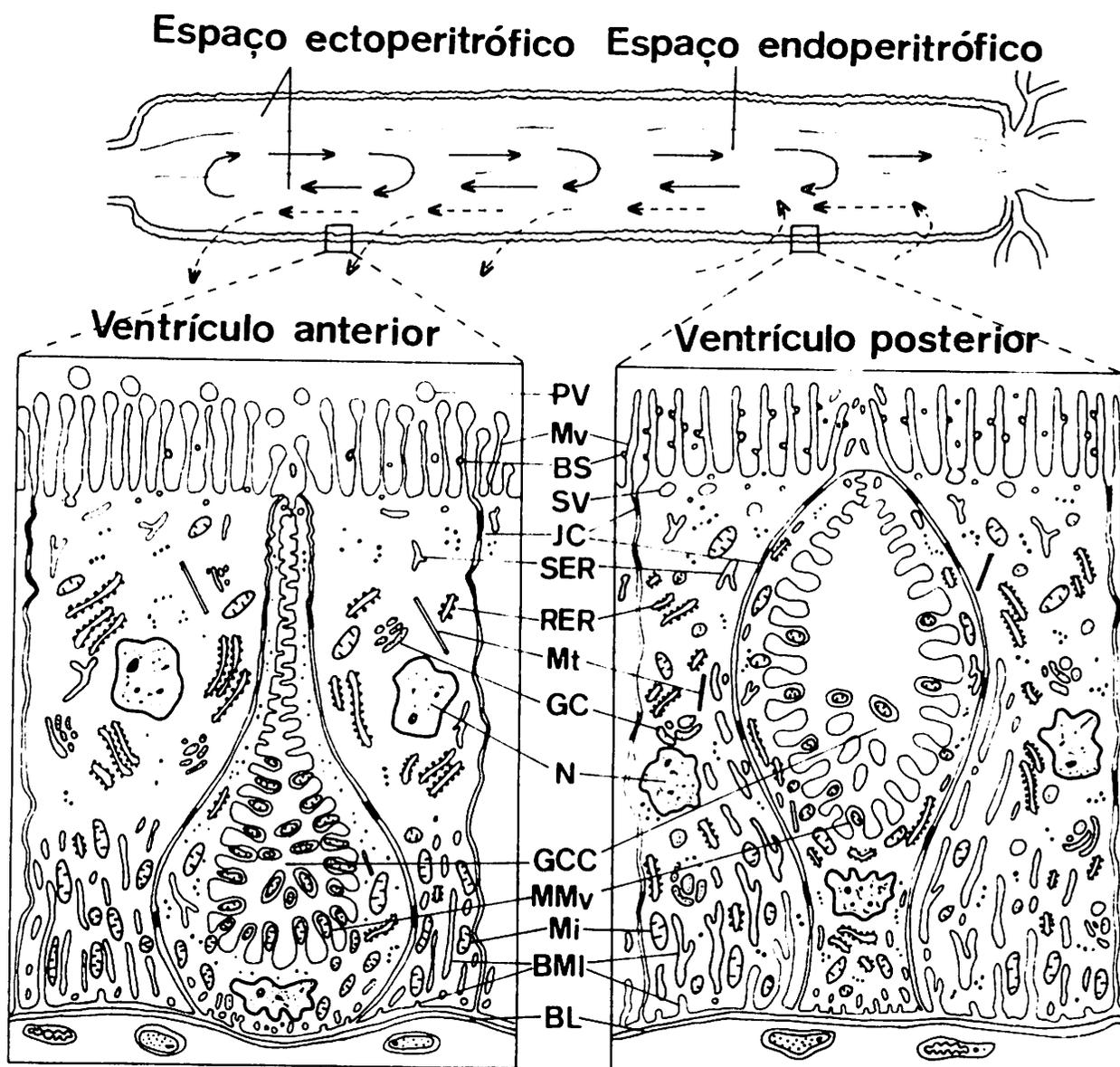


Figura 31 - Diagrama representando os fluxos de água e a circulação endo-ectoperitrônica das enzimas digestivas no ventrículo da larva de *E. ello*. Um fluido (setas tracejadas) é secretado para o lúmen do ventrículo posterior, provavelmente acompanhando o potássio secretado pelas células caliciformes pedunculadas, as quais devem ser auxiliadas nesse processo pelas células colunares caracterizadas por invaginações altamente desenvolvidas e com muitas aberturas para o espaço extracelular subjacente. O fluido move-se para a região anterior. Nesta região, o fluido é absorvido pelas células colunares que apresentam invaginações basais moderadamente desenvolvidas, com

mente acompanhando a excreção de potássio pelas células caliciformes pedunculadas, que poderiam ser assistidas nesse processo pelas células colunares caracterizadas por uma membrana plasmática basal altamente invaginada, com numerosas aberturas para o espaço extracelular subjacente. O fluido mover-se-ia, a seguir, para a região anterior do ventrículo. Nesse local o fluido seria absorvido pelas células colunares com membranas plasmáticas basais moderadamente invaginadas, que apresentam poucas aberturas para o espaço extracelular subjacente. A absorção por essas células é provavelmente assistida pelas células caliciformes com gargalo comprido. A digestão iniciar-se-ia dentro da membrana peritrófica pela ação das despolimerases amilase e tripsina. Como as larvas de *E. ello* não digerem a parede celular das células das folhas que elas comem (não possuem celulase), a penetração de suas enzimas digestivas nas células vegetais deve ocorrer através dos plasmodesmos ou por injúrias mecânicas das paredes celulares. Logo que os oligômeros produzidos pela ação da tripsina sobre as proteínas e da amilase sobre amido tornam-se pequenos o suficiente para atravessar a membrana peritrófica, eles difundir-se-iam para o espaço ectoperitrófico e dali para a superfície das células ventriculares. No espaço ectoperitrófico, as cadeias glicosídicas covalentemente ligadas a peptídeos seriam atacadas pela  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e os peptídeos por uma carboxipeptidase solúvel. A maior parte da digestão final, entretanto, ocorreria sob a ação de enzimas immobilizadas na superfície das células colunares. As dissacaridases (celobiase,  $\beta$ -frutosidase, maltase,  $\alpha$ -galactosidase e trealase) são enzimas solúveis associadas ao glicocálix, enquanto que a aminopeptidase e uma carboxipeptidase são enzimas integrantes da membrana plasmática das microvilosidades celulares. As despolimerases e os nutrientes remanescentes seriam a seguir levados pelo contrafluxo de fluido para a região anterior do ventrículo onde as despolimerases, ao penetrar novamente no espaço endoperitrófico, completariam um ciclo da circulação endo-ectoperi-

trôfica das enzimas digestivas (Figura 31).

Uma comparação entre os dados sobre digestão em *E. ello* e *R. americana* é interessante. O intestino médio das larvas de *R. americana* é composto de um ventrículo cilíndrico com dois grandes cecos conectados na região anterior (ver item 1.3, Figura 1). Uma vez que a membrana peritrôfica (tipo II, RICHARDS & RICHARDS, 1977) não entra nos cecos, os espaços luminais exteriores à membrana peritrôfica (espaços ectoperitrôficos) são muito grandes em *R. americana*. O contrário é observado nas larvas de *E. ello*, que não apresentam cecos gástricos e apresentam membranas peritrôficas do tipo I, que provavelmente resultaram da delaminação periódica das células do ventrículo (RICHARDS & RICHARDS, 1977). Provavelmente uma consequência evolutiva dessas diferenças é a grande importância da digestão ectoperitrôfica em *R. americana* (cf. TERRA et al., 1979; FERREIRA & TERRA, 1982a; TERRA & FERREIRA, 1983), em contraste com a sua pequena importância em *E. ello*. Em lugar de uma digestão ectoperitrôfica verdadeira, as larvas de *E. ello* apresentam uma digestão no glicocálix. É importante, contudo, acentuar que em ambos os insetos, a digestão final parece ocorrer sob a ação de enzimas imobilizadas na superfície das células ventriculares. Nas larvas de *R. americana*, as enzimas responsáveis pela digestão final são proteínas integrantes de membrana (FERREIRA & TERRA, 1980, 1982b, 1983) enquanto que nas larvas de *E. ello* elas são solúveis associadas ao glicocálix ou integrantes de membranas das microvilosidades das células colonares. Nesse sentido é interessante mencionar que *Fulgora candellaria* (Homoptera: Fulgoridae) apresenta, nas células de seu ventrículo, um glicocálix onde, por testes citoquímicos, foi demonstrada a presença de aminopeptidase, fosfatase alcalina e  $\alpha$ -glicosidase (MARSHALL & CHEUNG, 1970).

Resta ainda discutir um importante aspecto do processo di

gestivo de *E. ello*: o mecanismo de secreção de suas enzimas digestivas. Embora não existam evidências diretas para isso, é possível que somente as células colunares estejam envolvidas na secreção de enzimas, uma vez que somente elas apresentam o que podem ser considerados processos secretores (para uma revisão dos processos secretores em insetos ver BIGNELL et al., 1982). Principalmente na região posterior do ventrículo, é possível acompanhar vesículas semelhantes a vesículas de secreção desde o complexo de Golgi até o ápice das células colunares (Figuras 6.11 e 6.12). Além disso, um processo de secreção microapócrina é observado nas microvilosidades das células colunares e, aparentemente, ocorre ao longo de todo o ventrículo de *E. ello* (embora mais acentuada na região posterior). Embora alguns autores argumentem que a maioria dos processos de secreção apócrina sejam produtos da degeneração de células e artefatos de fixação (ver discussão em BIGNELL et al., 1982), a presença de duas membranas nas vesículas brotantes ao longo das microvilosidades (Figura 5.9) concorda com o modelo usualmente aceito para secreção apócrina (ver FRANKE et al., 1976 para referências). Por outro lado, as vesículas que parecem estar se destacando do topo das microvilosidades das células colunares da região anterior e média do ventrículo de *E. ello* (Figura 3.1) não são semelhantes aos processos de secreção apócrina típicos.

Deixando de lado momentaneamente o significado da secreção apócrina, o fato das vesículas semelhantes a vesículas de secreção serem encontradas principalmente nas células colunares posteriores sugere que essas sejam as principais responsáveis pela secreção das enzimas solúveis. A descoberta de que todas as enzimas digestivas, exceto amilase, são encontradas em maior quantidade nas células da região posterior (Tabela 9) favorece a referida hipótese. O fato de fluidos serem secretados pela região posterior do ventrículo e serem absorvidos na região anterior favorece também a hipótese

de que a região posterior seja secretora de enzimas. Caso a secreção via vesículas secretoras ocorresse nas células colunares anteriores, a sua difusão para toda a superfície ventricular seria dificultada pela dinâmica de fluidos existentes no ventrículo.

As vesículas destacantes encontradas nas células colunares anteriores e médias são provavelmente uma adaptação para conciliar a secreção de amilase (e pequena quantidade de tripsina) com a absorção de água. É possível que essas vesículas também participem na síntese da membrana peritrófica. A formação de membrana peritrófica do tipo I (RICHARDS & RICHARDS, 1977), que é o tipo que ocorre em *E. ello*, envolve a síntese de um material quitinoso semelhante a uma rede, à qual substâncias amorfas são adicionadas, podendo incluir material originado do glicocálix (BAINES, 1978; ADANG & SPENCE, 1981). A inclusão de material originado da membrana plasmática à membrana peritrófica foi demonstrado pela descoberta de fosfolípidos nas membranas peritróficas induzidas por injeção de ar no intestino posterior (GÄNDER, 1968). Nesse aspecto, é interessante notar que alguns insetos que não possuem membrana peritrófica apresentam elaboradas estruturas na superfície das células do ventrículo; estruturas essas compostas de membranas com ou sem glicocálix associado (MARSHALL & CHEUNG, 1970; ANDRIES & TORPIER, 1982). As membranas das vesículas destacantes do ventrículo de *E. ello* são ricas em amilase e tripsina (Tabela 16). A ausência de enzimas dentro das vesículas destacantes é provavelmente uma consequência da liberação do seu conteúdo logo após o seu desprendimento do topo das microvilosidades. Essa liberação deve ser uma consequência da fusão das pequenas vesículas entre si e com o topo das microvilosidades das células colunares anteriores e/ou por solubilização parcial da membrana devido ao alto pH do lúmen ventricular. Nesse sentido, é importante mencionar que grande parte da aminopeptidase e da carboxipeptidase de membrana é solubilizada por tratamento das membranas com

tampão glicina/NaOH 20 mM pH 10 (Tabela 17).

Os resultados discutidos acima foram incorporados em um modelo da atividade secretora do ventrículo de *E. ello* (Figura 32).

teralmente das microvilosidades (BV), embora a maioria funda-se entre si e com a membrana do topo das microvilosidades. Associado com as fusões, parte da amilase é liberada no lúmen ventricular e parte é retida no glicocálix. As vesículas destacantes (PV) destacam-se do topo dilatado das microvilosidades por contínua incorporação das pequenas vesículas. As vesículas destacantes liberam a amilase pelo contínuo processo de fusão de membranas e por solubilização parcial no lúmen do ventrículo, que é altamente alcalino. A membrana remanescente das vesículas, com algumas moléculas de amilase ainda associadas, são finalmente incorporadas na camada externa da membrana peritrófica em formação. A tripsina segue uma rota de secreção semelhante à da amilase, embora a maior parte da atividade de tripsina seja liberada em solução somente no lúmen da região posterior do ventrículo, que é altamente alcalina. As dissacaridases são secretadas por exocitose (principalmente no ventrículo posterior) e ficam presas no glicocálix no espaço entre as microvilosidades das células colunares.

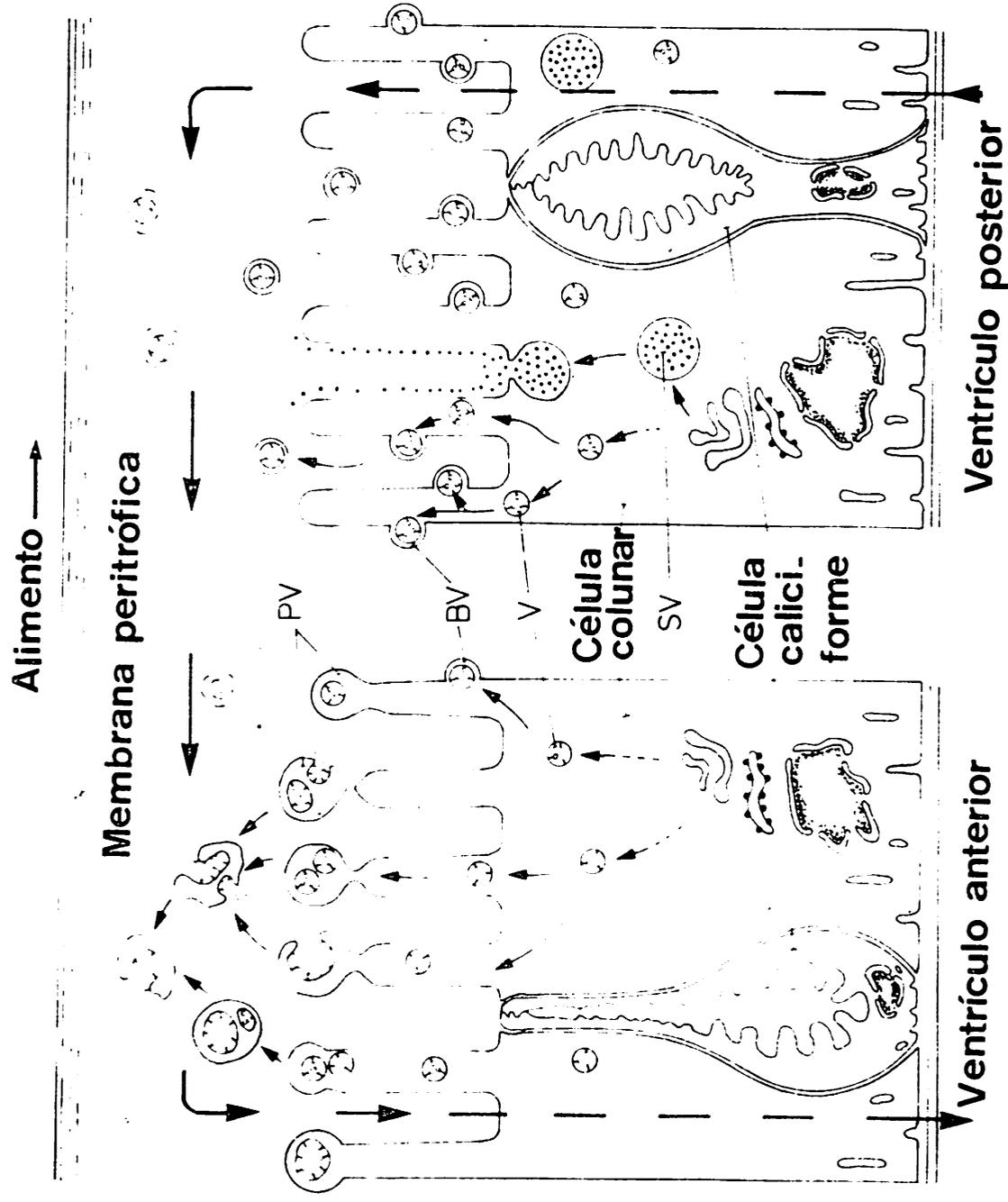


Figura 32 - Modelo dos processos secretórios e dos fluxos de água em *E. ella*.

As enzimas e os nutrientes parcialmente digeridos são recuperados do interior da membrana peritrófica através de um contrafluxo de fluidos (setas grandes) causado pela secreção de água para o lúmen na região posterior do ventrículo e sua transferência para a hemolinfa na região anterior do ventrículo. A amilase é secretada principalmente pelas células colunares da região anterior do ventrículo. Primeiramente, a amilase é uma proteína integrante da membrana das pequenas vesículas (V), que migram para as microvilosidades da célula. Nas microvilosidades, a amilase é processada tornando-se solúvel dentro das pequenas vesículas. As pequenas vesículas podem brotar la-

## 5. RESUMO

O ventrículo de *E. ello* apresenta células colunares e células caliciformes. As células caliciformes apresentam uma cavidade formada pela invaginação da membrana plasmática apical. Essa membrana plasmática invaginada apresenta microvilosidades modificadas as quais algumas vezes (região posterior) ou sempre (região anterior) contêm mitocôndrias. O lado citoplasmático dessas microvilosidades com mitocôndrias apresenta partículas que se supõe corresponder a uma  $K^+$ -ATPase responsável pela extrusão de potássio. A membrana apical das células colunares apresenta microvilosidades com vesículas brotantes em sua parte mediana (região anterior e posterior) e vesículas destacantes no ápice (região anterior). A membrana plasmática basal apresenta invaginações com mitocôndrias associadas e poucas aberturas (região anterior) ou muitas aberturas (região posterior) para o espaço extracelular subjacente. A ultraestrutura das células do ventrículo anterior é coerente com uma função de absorção de fluidos, enquanto que aquela do ventrículo posterior é coerente com uma função de secreção de fluidos. Os resultados obtidos pela injeção de amarante no tubo digestivo e na hemolinfa de *E. ello* concordam com as observações ultraestruturais.

Algumas propriedades físicas e cinéticas das enzimas digestivas de *E. ello* foram determinadas. A amilase e a tripsina são encontradas na forma solúvel e ligada a membranas. A amilase solúvel ( $M_r$  48.000;  $pH_0$  9,8;  $K_m$  para amido 0,12%;  $pI$  6,0) e a tripsina solúvel ( $M_r$  55.000;  $pH_0$  9,5;  $K_m$  para BAPA 0,17 mM;  $pI$  4,6) parecem ser derivadas das formas ligadas a membranas. A aminopeptidase ( $pH_0$  8,0 e  $K_m$  para LPNA 0,36 mM) ocorre somente ligada a membranas, enquanto que a carboxipeptidase é encontrada na forma solúvel (um hexâmero com três subunidades diferentes de  $M_r$  17.000;  $pH_0$  9,0;  $K_m$  para ZGlyPhe 0,18 mM) e ligada a membranas ( $M_r$  136.000 e  $pH_0$  9,0). As en

zimas  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase ( $M_r$  142.000;  $pH_o$  4,5;  $K_m$  para pNPAG 0,027 mM),  $\beta$ -frutoseidase ( $M_r$  80.000;  $pH_o$  6,0;  $K_m$  para rafinose e sacarose 30 mM),  $\alpha$ -galactosidase (dímero com duas subunidades iguais de  $M_r$  39.000;  $pH_o$  6,0;  $K_m$  para pNP $\alpha$ Gal 7,4 mM), maltase (tetrâmero de subunidades iguais de  $M_r$  34.000;  $pH_o$  5,8;  $K_m$  para maltose 1,4 mM; para pNP $\alpha$ Gli 0,63 mM;  $K_i$  para Tris 0,34 mM) e trealase ( $M_r$  103.000;  $pH_o$  5,7;  $K_m$  0,69 mM) são majoritariamente solúveis. Um estudo mais detalhado foi realizado com a celobiase. Essa enzima é solúvel possui pH ótimo 6,5,  $M_r$  130.000 e pI 6,8. A celobiase hidrolisa  $\beta$ -glicosídeos,  $\beta$ -galactosídeos,  $\beta$ -fucosídeos e  $\beta$ -xilosídeos em um mesmo sítio ativo, operando segundo uma cinética de equilíbrio rápido. A hidrólise da ligação glicosídica ocorre sem inversão de configuração através de um mecanismo semelhante ao da catálise ácida, envolvendo a formação de um íon carbônium intermediário.

Afim de estudar a organização do processo digestivo nas larvas de *E. ello* as enzimas comentadas acima foram ensaiadas nas diferentes regiões do ventrículo. As enzimas que fazem o ataque inicial ao alimento (amilase e tripsina) penetram no espaço endoperitrófico, enquanto que permanecem fora da membrana peritrófica as enzimas envolvidas em digestão intermediária e final ( $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, aminopeptidase, carboxipeptidase, celobiase,  $\beta$ -frutoseidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase). Dessas enzimas, apenas a  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e uma carboxipeptidase solúvel são encontradas no fluido ectoperitrófico.

Para determinar a localização subcelular das enzimas foram realizados fracionamentos celulares do ventrículo anterior e posterior. Os resultados envolvendo centrifugação diferencial de homogeneizados de células ventriculares preparadas em condições isotônicas, preparação de microvilosidades celulares por sonicação e por precipitação diferencial por cálcio mostraram que a aminopeptidase

é ligada à membrana plasmática das microvilosidades das células colunares, enquanto que a celobiase,  $\beta$ -frutoseidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase e trealase são enzimas solúveis que parecem ser secretadas por exocitose para o lúmen, principalmente da região posterior do ventrículo, ficando aprisionadas nas microvilosidades das células colunares. As formas de amilase e tripsina associadas a membrana parecem ser proteínas integrantes, apresentando interações intermoleculares com o citoesqueleto, enquanto que as formas intracelulares solúveis parecem estar dentro das vesículas que brotam ao longo das microvilosidades e que fundem entre si e com o topo das microvilosidades das células colunares do ventrículo anterior, formando as vesículas destacantes. Os mecanismos de secreção comentados acima foram incorporados em um modelo geral que descreve a secreção de enzimas digestivas pelas células colunares do ventrículo de *E. ello*.

A baixa excreção das enzimas presentes no espaço endoperitrofico (amilase e tripsina), a maior atividade dessas enzimas na região anterior do conteúdo da membrana peritrofica, juntamente com os dados de ultraestrutura, possibilitaram a proposição de um mecanismo para a reciclagem de enzimas, mecanismo este que seria responsável pela recuperação das enzimas do alimento não digerido, antes dele ser excretado.

## 6. ABSTRACT

*Erinnyis ello* midgut is composed of goblet and columnar cells. Goblet cells have a cavity, which is formed by invagination of the apical membrane. The infolded apical membrane shows modified microvilli, which sometimes (posterior midgut) or always (anterior and middle midgut) contain mitochondria. The cytoplasmic side of the membrane of the microvilli that contain mitochondria are studded with small particles, which are supposed to be a  $K^+$ -ATPase responsible for  $K^+$  extrusion. Columnar cells display microvilli with vesicles pinching off from their tips (anterior and middle midgut) or with a large number of double membrane spheres budding along their length (posterior midgut). Basal infoldings (with associated mitochondria) in columnar cells occur in a parallel ~~array~~<sup>array</sup> with many openings to the underlying space (posterior midgut) or are less organized with few openings (anterior and middle midgut). The results suggest that the anterior and middle region of the midgut absorb water, whereas the posterior region secretes it. Supports this belief the observations carried out after introduction of amaranth into the oesophagus of *E. ello* larvae and injection of amaranth into *E. ello* haemocoel.

Some physical and kinetical properties of *E. ello* digestive enzymes were determined. Amylase and trypsin are found in a soluble and in a membrane-bound form. Soluble amylase ( $M_r$  48000;  $pH_0$  9.8;  $K_m$  for starch 0.12%,  $pI$  6.0) and soluble trypsin ( $M_r$  55000;  $pH_0$  9.5;  $K_m$  for BAPA 0.17 mM;  $pI$  4.6) are supposed to be derived from membrane bound forms. Aminopeptidase ( $pH_0$  8.0;  $K_m$  for LPNA 0.36 mM) occurs only membrane-bound, whereas carboxypeptidase is found in a soluble (a hexamer composed of three different  $M_r$  17000 - subunits;  $pH_0$  9.0;  $K_m$  for ZGlyPhe 0.18 mM) and in a membrane-bound ( $M_r$  136000;  $pH_0$  9.0) form.  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase ( $M_r$  142000;  $pH_0$  4.5;  $K_m$  for pNPAG 0.027 mM),  $\beta$ -fructosidase ( $M_r$  80000;  $pH$  6.0;  $k_m$  for raffinose and

sucrose 30 mM),  $\alpha$ -galactosidase (a dimer composed of two identical  $M_r$  39000 - subunits; pH 6.0;  $K_m$  for pNP $\alpha$ Gal 7.4 mM), maltase (a tetramer of identical  $M_r$  34000 - subunits; pH 5.8;  $K_m$  for maltose 1.4 mM, for pNP $\alpha$ Glu 0.63 mM;  $K_i$  for Tris 0.34 mM) and trehalase ( $M_r$  103000; pH 5.7;  $K_m$  0.69 mM) are mainly soluble. A more comprehensive study was accomplished with cellobiase. This enzyme is soluble and has pH 6.5,  $M_r$  130000 and pI 6.8. The cellobiase hydrolyses  $\beta$ -D-glucosides,  $\beta$ -D-galactosides,  $\beta$ -D-fucosides and  $\beta$ -D-xylosides at the same active site. It exhibits rapid-equilibrium kinetics. The hydrolysis of the  $\beta$ -D-glucosidic bond catalyzed by the  $\beta$ -D-glucosidase occurs without inversion of configuration, through a mechanism similar to acid catalysis which involves the intermediary formation of a carbonium ion.

In an attempt to study the spatial organization of the digestive process in *E. ello* larvae, several enzymes were assayed at different sites in *E. ello* midguts. The enzymes responsible for the initial attack to the food (amylase and trypsin) penetrate into the endoperitrophic space, whereas the others ( $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, aminopeptidase, carboxypeptidase,  $\beta$ -fructosidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase and trehalase) are absent from there.

The subcellular distribution of enzymes in cells from the anterior and posterior midgut were studied by the differential centrifugation of tissue homogenates and by the purification of cell microvilli using sound disruption or calcium differential precipitation techniques. The results showed that the aminopeptidase is bound to the plasma membrane covering the columnar cells microvilli, whereas cellobiase,  $\beta$ -fructosidase,  $\alpha$ -galactosidase, maltase and trehalase are soluble enzymes, which seem to be secreted by exocytosis and then becoming trapped into the glycocalyx, mainly of the posterior midgut. The membrane-associated forms of amylase and trypsin seem

to be true integral proteins displaying intermolecular interactions with cytoskeletal elements. The soluble intracellular forms of those enzymes are supposed to be contained inside small vesicles, which are seen<sup>n</sup> budding along columnar cells microvilli and fusing one with each other and with the tips of the microvilli from the anterior midgut cells. Secretory mechanisms are discussed in the light of the evidence that the posterior midgut secretes, whereas the anterior midgut absorbs water.

The low excretion rates of amylase and trypsin, the major activities that those enzymes display in the anterior midgut contents and the above mentioned ultrastructural data led to the proposal of a mechanism by which the enzymes are recovered from the undigested food before they are excreted.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKRELL, B.A.C.; KEARNEY, E.B. & SINGER, T.P. (1978). Mammalian succinate dehydrogenase. In: Methods of Enzymology. S. Fleisher and I. Packer, editors. Academic Press, Inc., New York. 53, 466-83.
- ADANG, M.J. & SPENCE, K.D. (1981). Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Cell Tissue Res. 218, 141-7.
- ANDRIES, J.C. (1982). L'intestin moyen des insects. I. Origine embryologique et ultrastructure. Ann. Biol. 21, 143-86.
- ANDRIES, J.C. (1983). L'intestin moyen des insects. II. Dynamique cellulaire. Ann. Biol. 22, 261-88.
- ANDRIES, J.C. (1984). L'intestin moyen des insects. III. Fonctions de la cellule mésentérique. Ann. Biol. 23, 167-91.
- ANDRIES, J.C. & TORPIER, G. (1982). An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cirenea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. Biol. Cell. 46, 195-202.
- BAGINSKI, E.S.; FOA, P.P. & ZAK, B. (1967). Micro-determination of inorganic phosphate, phospholipids and total phosphate in biologic materials. Clin. Chem. 13, 326-32.
- BAINES, D.M. (1978). Observation on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.) nymphs. Acrida 7, 11-22.

- BAKER, J.E. (1981). Isolation and properties of digestive carboxypeptidase from midguts of larval of the black carpet beetle *Attagenus megatoma*. *Insect Biochem.* 11, 583-92.
- BAKER, J.E. (1983). Properties of amylases from midguts of larval of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. *Insect Biochem.* 13, 421-8.
- BAKER, J.E. & WOO, S.M. (1981). Properties and specificities of a digestive aminopeptidase from larval of *Attagenus megatoma* (Coleoptera Dermestidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 189-94.
- BAKER, J.E.; WOO, S.M. & BYRD, R.V. (1984). Ultrastructural features of the geet of *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. *Can. J. Zool.* 62, 1251-9.
- BARNARD, E.A. (1973). Comparative biochemistry of digestive enzymes. In: Comparative Animal Physiology (Ed. by Prosser C.L.) pp. 139-46. Saunders, Philadelphia.
- BELLOTTI, A. & VAN SCHOONHOVEN, A. (1978). Mite and insect pest of cassava. *A. Rev. Ent.* 23, 39-67.
- BENTLEY, R. & BHATE, D. (1960). Mutarrotase from *Penicillium notatum*. I. Purification, assay, and general properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 235, 1219-24.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. (1974). Colorimetric assay with  $\alpha$ -lactate, NAD, phenazine methosulphate and INT. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edn. H.U. Bergmeyer, editor. Verlag Chemie, Weinheim. 579-82.

- BERRIDGE, M. (1970). A structural analysis of intestinal absorption. In: Insect Ultrastructure. (Eds. by Neville, A.C.). Symp. R. Ent. Soc. London. 5, 135-51.
- BIGNELL, D.E. (1981). Nutrition and digestion. In: (Bell, W.J. & Adiyodi, K.G., editors). The American Cockroach. pp. 57-86. Chapman & Hall, London.
- BIGNELL, D.E.; OSKARSSON, H. & ANDERSON, J.M. (1980). Colonization of the epithelial face of the peritrophic membrane and the ectoperitrophic space by Actinomycetes in a soil-feeding termite. J. Invert. Pathol. 36, 426-8.
- BIGNELL, D.E.; OSKARSSON, H. & ANDERSON, J.M. (1982). Formation of membrane-bounded secretory granules in the midgut epithelium of a termite, *Cubetermes severus*, and a possible intercellular route of discharge. Cell Tissue Res. 222, 187-200.
- BILLINGSLEY, P.F. & DOWNE, A.E.R. (1983). Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae). Can. J. Zool. 61, 2574-86.
- BOUDREAUX, H.B. (1979). Arthropod Phylogeny with Special Reference to Insects. Wiley, New York.
- BOYD, N.D. & MARTIN, M.M. (1975). Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. J. Insect Physiol. 21, 1815-20.
- BUONOCORE, V.; POERIO, E.; SILANO, V. & TOMASI, M. (1976). Physical and catalytical properties of  $\alpha$ -amylase from *Tenebrio molitor*. L. Biochem. J. 153, 621-5.

- CAPON, B. (1969). Mechanism in carbohydrate chemistry. *Chem. Rev.* 69, 407-98.
- CARVALHO, C.F. (1980). Aspectos biológicos, técnica para obtenção de ovos em condições de laboratório e avaliação de danos de *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera-Sphingidae) em mandioca em condições de campo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- CHAPMAN, R.F. (1982). The insects: structure and function. 3rd edn, Hodder and Stoughton, London.
- CHIPPENDALE, G.M. (1978). The function of carbohydrates in insect life process. In: Biochemistry of Insects. (Ed. by Rockstein, M.). pp. 1-55, Academic Press, New York.
- CIOFFI, M. (1979). The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell.* 11, 467-79.
- CIOFFI, M. & HARVEY, W.R. (1981). Comparasion of potassium transport in three structurally distinct regions of the insect midgut. *J. Exp. Biol.* 91, 103-16.
- CIOFFI, M. & WOLFERSBERGER, M.G. (1983). Isolation of separate apical, lateral and basal plasma membrane from cells of an insect epithelium. A procedure based on tissue organization and ultrastructure. *Tissue Cell* 15, 781-803.
- COGOLI, A. & SEMENZA, G. (1975). A probable oxocarbonium ion in the reaction mechanism of small intestinal sucrase and isomaltase. *J. Biol. Chem.* 250, 7802-9.

- COIRO, J.R.R.; WEIGI, D.R.; KISIELIUS, J.; MENEZES, H. & BILOTTA, J.A.T. (1972). A new embedding medium (Polylite 8001) for biological material. *Cienc. Cult.* 24, 660-2.
- DADD, R.H. (1970). Digestion in insects. In: Chemical Zoology. (Ed. by Florkin, M. & Scheer, B.T.). Vol. 5, Arthropoda. Part A, pp. 117-45, Academic Press, New York.
- DAHLMAN, D.L. (1971). Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larvae. *J. Insect Physiol.* 17, 1677-87.
- DAHLQVIST, A. (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 22, 99-107.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Methods and applications to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-27.
- DERR, R.F. & RANDALL, D.D. (1966). Trehalase of the differential grasshopper, *Melanoplus differentialis*.
- DOW, J.A. (1981). Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *J. Insect Physiol.* 27, 579-85.
- DROSTE, H.J. & ZEBE, E. (1974). Carbohydrasen und Kohlenhydratverdauung im Darmtrakt von *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 20, 1639-57.
- DUBOWSKI, K.M. (1962). An o-toluidine method for body fluid glucose determination. *Clin. Chem.* 8, 215-35.
- DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-17.

- DZIADIK-TURNER, C.; KOGA, D.; MAI, M.S. & KRAMER, K.J. (1981).  
Purification and characterization of two  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase  
from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera  
Sphingidae). Arch. Biochem. Biophys. 212, 546-60.
- EGUCHI, M. & ARAI, M. (1983). Relationship between alkaline  
proteases from the midgut lumen and epithelia of the silkworm:  
solubilization and activation of epithelial protease (6B3).  
Comp. Biochem. Physiol. 75B, 589-93.
- EGUCHI, M. & IWAMOTO, A. (1975). Changes in protease, esterase,  
and phosphatases in the alimentary canal of the silkworm during  
metamorphosis. Insect Biochem. 5, 495-507.
- EGUCHI, M. & IWAMOTO, A. (1976). Alkaline proteases in the midgut  
tissue and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect  
Biochem. 6, 491-6.
- EGUCHI, M. & IWAMOTO, A. (1982). Comparison of three alkaline  
proteases from digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L.  
Comp. Biochem. Physiol. 71B, 663-8.
- EGUCHI, M.; IWAMOTO, A. & YAMAUCHI, K. (1982). Interrelation of  
proteases from the midgut lumen, epithelia and peritrophic  
membrane of the silkworm, *Bombyx mori* L. Comp. Biochem. Physiol.  
72A, 359-63.
- EICHHOLZ, A. & CRANE, R.K. (1965). Studies on the organization of  
brush border in intestinal epithelial cells. I - Tris disruption  
of isolates hamster brush border and density gradient separation of  
fractions. J. Cell Biol. 26, 687-91.

- ENDO, Y. & NISHIITSUTSUJI-UWO, J. (1981). Gut endocrine cell in insects: the ultrastructure of the gut endocrine cells of the lepidopterous species. *Biomed. Res.* 2, 270-80.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-8.
- ESPINOZA-FUENTES, F.P.; FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1984). Spatial organization of digestion in the larval and imaginal stages of the sciarid fly *Trichosia pubescens*. *Insect Biochem.* 14, 631-8.
- EVANS, G. (1975). *The life of beetles*. George Allen and Unwin, London.
- EVANS, W.A.L. & PAYNE, D.W. (1964). Carbohydrases of the alimentary tract of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Forsk. *J. Insect Physiol.* 10, 657-74.
- EVANS, W.H. (1978). Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. (Ed. by Work, T.S. & Work, E.). Vol. 7, Part 1. North-Holland, Amsterdam.
- FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F. & TERRA, W.R. (1981). Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. *J. Insect Physiol.* 27, 559-70.
- FERREIRA, C. (1982). Aspectos ultraestruturais e enzimáticos do processo digestivo e caracterização física e cinética da celobíase intestinal de *Rhynchosciara americana*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1980). Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 467-73.
- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1982a). Properties of arylamidases found in cytosol, microvilli and in luminal contents of *Rhynchosciara americana* midgut caeca. *Insect Biochem.* 12, 413-7.
- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1982b). Function of the midgut caeca and ventriculus: microvilli bound enzymes from cells of different midgut regions of starving and feeding *Rhynchosciara americana* larvae. *Insect Biochem.* 12, 257-62.
- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1983). Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound  $\beta$ -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana* larvae). *Biochem. J.* 213, 43-51.
- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1984). Soluble aminopeptidases from cytosol and luminal contents of *Rhynchosciara americana* midgut caeca. Properties and phenanthroline inhibition. *Insect Biochem.* 14, 145-50.
- FERREIRA, C. & TERRA, W.R. (1985). Minor aminopeptidases purified from the plasma membrane of midgut caeca cells of an insect (*Rhynchosciara americana*) larvae. *Insect Biochem.*, no prelo.
- FERSHT, A. (1977). Enzyme structure and mechanism. Freeman, San Francisco.
- FRANKE, W.W.; LÜDER, M.R.; KARTENBECK, J.; ZERBAN, H. & KEENAN, T.W. (1976). Involvement of vesicle coat material in casein secretion and surface regeneration. *J. Cell Biol.* 69, 173-95.

- FREEMAN, M.A. (1967). Proteolytic enzymes of the crop fluid from *Locusta migratoria* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 20, 1013-5.
- FRIEDMAN, S. (1960). The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, Meig. *Arch. Biochem. Biophys.* 87, 252-8.
- FRIEDMAN, S. (1975). Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Partial purification, tissue specificities and some kinetical properties of adult enzymes. *Insect Biochem.* 5, 151-64.
- GÄNDER, E. (1968). Zur histochemie und histologie des mettdarmes von *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* in zusammenhang mit der blutverdauung. *Acta Trop.* 25, 132-75.
- GARCIA, E.S. & GUIMARÃES, J.A. (1979). Proteolytic enzymes in the *Rhodnius prolixus* midgut. *Experientia* 35, 305-6.
- GARCIA, E.S.; GUIMARÃES, J.A. & PRADO, J.L. (1978). Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. *Archs. Biochem. Biophys.* 188, 315-22.
- GIEBEZ, P.E. & DOMNAS, A.J. (1976). Soluble trehalases from larvae of the mosquito, *Culex pipiens*, and the fungal parasite, *Lagenidium giganteum*. *Insect Biochem.* 6, 303-11.
- GLOCK, G.E. & MCLEAN, P. (1953). Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55, 400-8.
- GOODCHILD, A.J.P. (1963). Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. *Proc. Zool. Sol. Lond.* 141, 851-70.

- GOODING, R.H. & ROLSETH, B.M. (1976). Digestive processes of haematophagous insects. XI. Partial purification and some properties of six proteolytic enzymes from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). *Can. J. Zool.* 54, 1950-9.
- GUILLOUX, E.; CORTOIS, J.E. & PERCHERON, F. (1968). Étude d'une tréhalase purifiée extraite du hanneton (*Melolontha vulgaris*). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1915-31.
- HAMMETT, L.P. (1970). *Physical Organic Chemistry*, pp. 347-89. McGraw-Hill Book Co., New York.
- HANOZET, G.M.; GIORDANA, B. & SACCHI, V.F. (1980).  $K^+$ - dependent phenylalanine uptake in membrane vesicles isolated from the midgut of *Philosamia cynthia* larvae. *Biochem. Biophys. Acta* 506, 481-6.
- HANSCH, C.; DEUTSCH, W. & SMITH, R.N. (1965). The use of substituent constant and regression analysis in the study of enzymatic reaction mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2738-42.
- HARVEY, W.R.; CIOFFI, M. & WOLFERSBERGER, M.G. (1983). Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. *Am. J. Physiol.* 244, R163-75.
- HEDRICK, J.L. & SMITH, A.J. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel electrophoresis. *Archs. Biochem. Biophys.* 126, 155-64.
- HESTRIN, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.* 180, 249-61.

- HONIGBERG, B.M. (1970). Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: (Krishna, K. & Weesner, F.M., editors). Biology of termites. Vol. 2, pp. 1-36. Academic Press, New York.
- HORIE, Y. (1959). Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Carbohydrases in the digestive fluid and in the midgut tissue. Bull. Seric. Exp. Stn. Tokyo. 15, 365-82.
- HOUSE, H.L. (1974a). Nutrition. In: The Physiology of Insecta (Ed. by Rockstein, M.) 2nd ed., V. 5, pp. 1-62. Academic Press, New York.
- HOUSE, H.L. (1974b). Digestion. In: The physiology of insecta. (Ed. by Rockstein, M.) 2nd ed. V. 5, pp. 63-117, Academic Press, New York.
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. (1983). Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. Comp. Biochem. Physiol. 75B, 509-12.
- HUBER, R.E. (1975). The purification and study of a honey bee abdominal sucrase exhibiting unusual solubility and kinetic properties. Archs. Biochem. Biophys. 168, 198-209.
- HUBER, R.E. & LEFEBVRE, Y.A. (1971). The purification and some properties of soluble trehalase and sucrase from *Drosophila melanogaster*. Can. J. Biochem. 49, 1155-64.
- HUBER, R.E. & MATHISON, R.D. (1976). Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). Can. J. Biochem. 54, 153-64.

- HUBER, R.E. & THOMPSON, D.J. (1973). Studies on a honey bee sucrase exhibiting unusual kinetics and transglucolytic activity. *Biochemistry* 12, 4011-20.
- HUGHES, R.C. (1975). The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles. *Essays Biochem.* 11, 1-36.
- JACOBSON, B.S. (1983). Interactions of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview. *Tissue Cell* 15, 829-52.
- JAFFE, H.H. (1953). A reexamination of the Hammett equation. *Chem. Rev.* 53, 191-261.
- JANY, K.D.; PFLEIDERER, G. & MOLITORIS, H.P. (1974). Purification and some physical properties of a chymotrypsin-like protease of the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. *Eur. J. Biochem.* 42, 419-28.
- KALF, G.F. & RIEDER, S.V. (1958). The purification and properties of trehalase. *J. Biol. Chem.* 230, 691-8.
- KANEKATSU, R. (1978). Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Fac. Text. Sci. Technol.* 76 (Series E n<sup>o</sup> 9) 1-21.
- KATAGIRI, C. (1979).  $\alpha$ -D-glucosidase in the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 9, 205-9.
- KEILIN, D. & HARTREE, E.F. (1952). Specificity of glucose oxidase (Notatin). *Biochem. J.* 50, 331-41.
- KENNY, A.J. & BOOTH, A.G. (1978). Microvilli: their ultrastructure, enzymology and molecular organization. *Essays Biochem.* 14, 1-44.

- KESSLER, M.; ACUTO, O.; STORELLI, C.; MURER, H.; MULLER, M. & SEMENZA, G. (1978). A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochem. Biophys. Acta* 506, 136-54.
- KIMURA, S. (1976). Insect haemolymph exo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 446, 399-406.
- KIMURA, S. (1977). Exo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and chitobiase in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 7, 237-45.
- KHAN, M.A. (1962). The distribution of dipeptidase activity in the digestive system of *Locusta migratoria* L. and *Dysdercus fasciatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 6, 169-70.
- KLUNGNESS, L.M. & PENG, Y.S. (1984). Scanning electron microscope observation of pollen food bolus in the alimentary canal of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Can. J. Zool.* 62, 1316-9.
- KOGA, D.; MAI, M.S.; DZIADIK-TURNER, C. & KRAMER, K.J. (1982). Kinetics and mechanism of exochitinase and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera Sphingidae). *Insect Biochem.* 12, 493-9.
- KOVOOR, J. (1969). Anatomie comparée du tube digestif des termites. II. Sous-famille des Nasutitermitinae. *Insectes Soc.* 16, 195-233.
- KOVOOR, J. (1971). Anatomie comparée du tube digestif des termites. III. Sous-famille des Macrotermitinae. *Insectes Soc.* 18, 49-69.

- KRISTENSEN, N.P. (1981). Phylogeny of insect orders. *Ann. Rev. Entomol.* 26, 135-57.
- KUNG, J.T.; HANRAHAN, V.M. & CALDWELL, M.L. (1953). A comparison of the action of several alpha amylases upon a linear fraction from corn starch. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5548-54.
- LANE, N.J. & HARRISON, J.B. (1979). An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J. Cell Sci.* 39, 355-72.
- LASKER, R. & GIESE, A.C. (1956). Cellulose digestion by the silverfish *Ctenolepisma lineata*. *J. exp. Biol.* 33, 542-53.
- LAW, J.H.; DUNN, P.E. & KRAMER, K.J. (1977). Insect proteases and peptidases. *Adv. Enzymol.* 45, 389-425.
- LEGLER, G. (1975). The mechanism of action of glycosidases. *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* 22, 403-9.
- LESSLAUER, W.; LERCH, P. & GMÜNDER, H. (1982). Two detergent-insoluble proteins of the human lymphocyte membrane are enriched in an isolated membrane fraction. *Biochem. Biophys. Acta* 693, 351-8.
- LEVY, G.A. & SNAITH, S.M. (1972). The inhibition of glycosidases by aldonolactones. *Adv. Enzymol.* 36, 151-81.
- LIENHARD, G.E. (1973). Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180, 149-54.
- LOJDA, Z.; GOSSRAU, R. & SCHRIEBLER, T.H. (1979). *Enzyme Histochemistry: a Laboratory Manual*. Springer, Berlin.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, J.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.
- MARES-GUIA, M. & SHAW, E. (1965). Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate site chain. *J. Biol. Chem.* 240, 1579-85.
- MARSHALL, A.T. & CHEUNG, W.W.K. (1970). Ultrastructure and cytochemistry of an extensive plexiform surface coat on the midgut cells of a fulgorid insect. *J. Ultrastruct. Res.* 33, 161-72.
- MARTIN, M.M. (1983). Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, 313-24.
- MARTIN, M.M. & MARTIN, J.S. (1978). Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. *Science* 199, 1453-5.
- MARTIN, M.M. & MARTIN, J.S. (1979). The distribution and origins of the cellulolytic enzymes of the higher termite, *Macrotermes natalensis*. *Physiol. Zool.* 52, 11-21.
- MARTIN, R.G. & AMES, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372-9.
- MARZLUF, G.A. (1969). Studies of trehalase and sucrase of *Drosophila melanogaster*. *Archs. Biochem. Biophys.* 134, 8-18.
- MESCHER, M.F.; JOSÉ, M.J. & BACK, S.P. (1981). Actin-containing matrix associated with the plasma membrane of marine tumor and lymphoid cells. *Nature* 289, 139-44.

- MILLER, J.W., KRAMER, K.J. & LAW, J.H. (1974). Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Johannson (Lepidoptera, Sphingidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 48B, 117-29.
- MORGAN, M.R.J. (1975a). Initial characterization of the gut cellobiase of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. *Insect Biochem.* 5, 251-64.
- MORGAN, M.R.J. (1975b). Initial characterization of the gut lactase of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. *Insect Biochem.* 5, 479-87.
- MORGAN, M.R.J. (1975c). Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl  $\beta$ -glucosidase, and aryl  $\beta$ -galactosidase activities of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 5, 609-17.
- MORGAN, M.R.J. (1976). Gut carbohydrases in locusts and grasshoppers. *Acrida* 5, 45-58.
- NATH, R.L. & RYDON, H.N. (1954). The influence of structure on the hidrolisis of substituted phenyl  $\beta$ -D-glucosides by Emulsin. *Biochem. J.* 57, 1-10.
- NICHOLSON, J.A. & KIM, Y.S. (1975). A one-step  $\alpha$ -aminoacid oxidase assay for intestinal peptide bydrolase activity. *Analyt. Biochem.* 63, 110-7.
- NOELTING, G. & BERNFELD, P. (1948). Sur les enzymes amylolytiques. III. La  $\beta$ -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. *Helv. Chim. Acta*, 31, 286-90.
- NOIROT, C.H. & KOVOOR, J. (1958). Anatomie comparée du tube digestif des termites. I. Sous-famille des Termitinae. *Insectes Sociaux*, 5, 439-71.

- ORSTREICHER, E.G. & PINTO, G.F. (1983). Pocket computer program for fitting the Michaelis-Menten equation. *Comput. Biol. Med.* 13, 309-15.
- OUCHTERLONY, O. (1968). Handbook of Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publisher, Ann Arbor.
- OVERTON, J.; EICHHOLZ, A. & CRANE, R.K. (1965). Studies on the organization of brush border in intestinal epithelial cells. II. Fine structure of fractions of Tris-disrupted hamster brush border. *J. Cell. Biol.* 26, 693-706.
- PITT, D. (1975). Lysosomes and Cell Function. Longman, London.
- PODOLER, H. & APPLEBAUM, S.W. (1971). The  $\alpha$ -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*: Purification and properties. *Biochem. J.* 121, 317-20.
- POWNING, R.F. & IRZYKIEWICZ, H. (1964).  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in the cockroach (*Periplaneta americana*) and in the pull-ball (*Lycoperdon perlatum*). *Comp. Biochem. Physiol.* 12, 405-15.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 208-12.
- RIBEIRO, J.M.C. & PEREIRA, M.E.A. (1983). Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 14, 103-8.
- RICHARDS, A.G. & RICHARDS, P.A. (1977). The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22, 219-40.
- ROBYT, J.F. & FRENCH, D. (1967). Multiple attack hypothesis of  $\alpha$ -amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 8-16.

- ROSEN, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for aminoacids. *Archs. Biochem. Biophys.* 67, 10-5.
- ROTHSCHILD, W. & JORDAN, K. (1903). A revision of the Lepidopterous family Sphingidae. *Novit. Zool. London*, 9 suplement.
- SABATINI, D.D.; BENSCH, K. & BARNETT, R.J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19-58.
- SAITO, S. (1960). Trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* purification and properties of the enzyme. *J. Biochem.* 48, 101-9.
- SASAKI, T. & SUSUKI, Y. (1982). Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 703, 1-10.
- SCHMITZ, J.; PREISER, H.; MAESTRACCI, D.; GHOSH, B.K.; CERDA, J.J. & CRANE, R.K. (1973). Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 98-112.
- SCHRAY, K.J. & BENKOVIC, S.J. (1978). Anomerization rates and enzyme specificity for biologically important sugars and sugar phosphates. *Accounts Chem. Res.* 11, 136-41.
- SEGEL, I.H. (1975). *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.* John Wiley & Sons, New York.
- SEMENZA, G.; CURTIS, H.C.; RAUNHARDT, O.; MORE, P. & MÜLER, M. (1969). The configurations at the anomeric carbon of the reaction products of some digestive enzymes. *Carbohydr. Res.* 10, 417-28.

- SINGER, S.J. (1974). The molecular organization of membranes. *A. Rev. Biochem.* 43, 805-33.
- STRYER, L. (1981). *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edn. Freeman, San Francisco.
- SUMIDA, M. & YAMASHITA, O. (1977). Trehalase transformation in silkworm midgut during metamorphosis. *J. Comp. Physiol.* 115, 241-53.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. (1981). The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. *J. Insect Physiol.* 27, 325-31.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. (1983). Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara* do not enter the endoperitrophic space. *Insect Biochem.*, 13, 143-50.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. & BASTOS, F. (1985). Phylogenetic considerations on insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* No prelo.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. & DE BIANCHI, A.G. (1977). Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 201-9.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. & DE BIANCHI, A.G. (1978). Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochim. Biophys. Acta* 524, 131-41.

- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. & DE BIANCHI, A.G. (1979). Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic space and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-94.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. & SANTOS, C.D. (1982). The haemolymph of the Sphingidae moth *Erinnyis ello*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A, 373-7.
- THREADGOLD, L.T. (1976). The ultrastructure of the Animal Cell. Pergamon, Oxford.
- TRAGER, W. (1953). Nutrition. In: Insect Physiology. (Ed. by Roeder, K.D.), pp 350-86. Wiley, New York.
- TREHERNE, J.E. (1967). Gut absorption. *A. Rev. Ent.* 12, 43-58.
- TURUNEM, S. (1979). Digestion and absorption of lipids in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A, 455-60.
- UGOLEV, A.M. & DE LAEY, P. (1973). Membrane digestion. A concept of enzymic hydrolysis on cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 105-28.
- WARD, C.W. (1975a). Properties and specificity of the major metal-chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochim. Biophys. Acta* 384, 215-27.
- WARD, C.W. (1975b). Properties and specificity of a second metal-chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 439-45.
- WARD, C.W. (1975c). Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 1-23.

- WARD, C.W. (1975d). Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of the enzymes of intermediate electrophoretic mobility. *Biochim. Biophys. Acta.* 410, 361-9.
- WARD, C.W. (1975e). Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of the enzymes of highest electrophoretic mobility. *Aust. J. Biol. Sci.* 28, 447-55.
- WARD, C.W. (1976). Properties of the major carboxypeptidase in the larvae of the webbing clothes moth, *Tineola bisselliella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 429, 564-72.
- WHARTON, D.R.A.; WHARTON, M.L. & LOLA, J.E. (1965). Cellulase in the cockroach, with special reference to *Periplaneta americana* (L). *J. Insect. Physiol.* 11, 947-59.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1972). The principles of insect physiology. 7th ed., Methuen & Co Ltd, London.
- WILKINSON, G.N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* 80, 324-32.
- WOLFENDEN, R. (1972). Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. *Acc. Chem. Res.* 5, 10-8.
- WOLFERSBERGER, M.G. (1979). A potassium-modulated plasma membrane ATPase from the midgut of *Manduca sexta* larvae. *Fed. Proc.* 38: 242.
- WOLFERSBERGER, M.G. (1984). Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. *Amer. Zool.* 24, 187-97.
- WOLFERSBERGER, M.G.; HARVEY, W.W. & CIOFFI, M. (1982). Transepithelial potassium transport in insect midgut by an electrogenic alkali metal ion pump. In: Bronner, F.; Kleinzeller, A. (eds.). *Current Topics in Membranes and Transport*. Vol. 16. Academic Press, New York, pp. 109-33.

WYATT, G.R. (1967). The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4, 287-360.

ZHUZHNIKOV, D.P. (1970). Permeability of the peritrophic membrane in the larvae of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 16, 1193-202.