CLÉLIA FERREIRA

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS E ENZIMÁTICOS DO
PROCESSO DIGESTIVO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA
E CINÉTICA DA CELOBIASE INTESTINAL DE
Rhynchosciara americana

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

São Paulo
1982

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido a colaboração de algumas instituições e de várias pessoas. A todas elas gostaria de transmitir um pouco do muito que lhes sou grata.

Inicialmente, ao Dr. Walter R. Terra, que sempre soube transmitir seu entusiasmo pela pesquisa científica, por sua constante orientação, confiança e apoio.

Ao Dr. Alberto de Freitas Ribeiro do Instituto de Biociências, colaborador inestimável da parte morfológica deste trabalho, pela grande amizade.

À amiga Luiza Y. Nakabayashi, pelo eficiente auxílio prestado na parte experimental desta tese e também pela sua dedicação na manutenção dos aparelhos e da ordem no laboratório.

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

Aos companheiros de laboratório, Dr. Antonio G. de Bianchi, Custódio D. Santos, Fernando Espinoza, Fernando Bastos, Osvaldo Marinotti e Sirley D. Pereira, pela amizade.

A Ana Maria Rocha e ao Sr. João Rocha pelo cuidado constante na manutenção dos animais e pelo auxílio técnico prestado.

A todos os amigos deste Instituto que durante todos esses anos colaboraram comigo apoiando-me e incentivando-me.

A Vera Lucia Romera, responsável pela eficiente datilografia desta tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Considerações iniciais	2
1.2. Hidrolases intestinais de oligômeros em mamíferos ..	3
1.3. Anatomia do tubo digestivo de <i>Rhynchosciara americana</i> ..	5
1.4. Hidrolases envolvidas na digestão em insetos	8
1.5. Organização espacial do processo digestivo nos insetos	12
1.6. Objetivos desse trabalho	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1. Materiais	18
2.2. Animais	18
2.3. Obtenção de fluido luminal dos cecos e células dos cecos gástricos e do ventrículo	18
2.4. Microscopia óptica e eletrônica	19
2.5. Preparação de microvilosidades de diferentes regiões do intestino médio	20
2.6. Fracionamento celular de células dos cecos gástricos tricos	21
2.7. Preparação das membranas dos cecos gástricos e sua solubilização por Triton X-100	22
2.8. Solubilização de hidrolases da membrana dos cecos por papaína	23
2.9. Determinação do peso molecular por centrifugação em gradiente de densidade	23
2.10. Eletroforese e determinação de atividades enzimáticas em géis de poliacrilamida	24
2.11. Eletrofocalização e determinação de atividades enzimáticas nos géis	25

2.12. Determinação de atividades enzimáticas e de proteínas	26
2.13. Inibição da hidrólise de celobiose por pNPβGlc e inibição da hidrólise de pNPβGlc por celobiose	28
2.14. Identificação da configuração da glicose liberada pela celobiase solubilizada em papaína	29
3. RESULTADOS	31
3.1. Atividade de arilamidases nas frações subcelulares e conteúdo luminal dos cecos gástricos	31
3.2. Eletroforese de arilamidases presentes no citosol e lúmen dos cecos gástricos	35
3.3. Histologia do intestino médio de <i>R. americana</i>	38
3.4. Ultraestrutura das células dos cecos gástricos	40
3.5. Ultraestrutura das células do ventrículo	42
3.6. Enzimas de microvilosidades de diferentes regiões do tubo digestivo	47
3.7. Solubilização da celobiase por detergente e por papaína	52
3.8. Peso molecular e pI da celobiase solubilizada por detergente e por papaína	52
3.9. Inativação térmica da celobiase solubilizada por detergente e por papaína	56
3.10. Efeito do pH e da temperatura na celobiase solubilizada por papaína	58
3.11. Especificidade de substrato da celobiase purificada	58
3.12. Inibição da celobiase solubilizada com papaína por Tris e lactonas	66

3.13. Configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase solubilizada por papaína	66
4. DISCUSSÃO	70
4.1. O papel das arilamidases dos cecos de <i>R.americana</i> ...	70
4.2. As células dos cecos gástricos de <i>R.americana</i>	71
4.3. As células do ventrículo anterior e posterior de <i>R.americana</i>	72
4.4. Função dos cecos e do ventrículo em <i>R.americana</i>	73
4.5. A função dos cecos do intestino médio e de estruturas semelhantes nos insetos	78
4.6. Aspectos físico-químicos da celobiase de <i>R.</i> <i>americana</i>	82
4.7. Especificidade, inibição e mecanismo da celo_ biase de <i>R.americana</i>	83
5. RESUMO	87
6. ABSTRACT	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ABREVIATURAS

Arg β Na,	L-arginina- β -naftilamida
EDTA,	etilenodiaminotetraacetato de sódio
Leu β Na,	L-leucina- β -naftilamida
LPNA,	L-leucina p-nitroanilida
Met β Na,	DL-metionina- β -naftilamida
NP β Fuc,	p-nitrofenil- β -D-fucosídeo
NP β Gal,	p-nitrofenil- β -D-galactosídeo
NP α Gli,	p-nitrofenil- α -D-glicosídeo
oNP β Gli,	o-nitrofenil- β -D-glicosídeo
pNP β Gli,	p-nitrofenil- β -D-glicosídeo
NPP,	p-nitrofenil fosfato
P β Gli,	fenil- β -D-glicosídeo
Phe-Gly,	L-fenilalanil-glicina
PHMB,	p-hidroximercuriobenzoato
Pro β NA,	L-prolina- β -naftilamida
SDS,	dodedil sulfato de sódio
TLCK,	N- α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona
Tris,	tris-(hidroximetil) amino metano
Z-Gly-Leu,	carbобенzoxiglicil-L-leucina
Z-Gly-Phe,	carbобенzoxiglicil-L-fenilalanina
Z-Val-Leu,	carbобенzoxivalil-L-leucina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

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

A digestão de polímeros, tais como polissacarídeos e proteínas, que correspondem a maior massa do alimento usualmente consumido pelos animais, pode ser dividida em três fases distintas. A primeira fase, a digestão primária, consiste no ataque às ligações internas dos polímeros por enzimas secretadas resultando nos oligômeros correspondentes. Estes são hidrolisados durante a digestão intermediária, tendo seu tamanho molecular reduzido por ação das mesmas enzimas envolvidas na primeira fase e/ou enzimas diferentes, geralmente também secretadas. Por fim, ocorre a digestão terminal através da qual os oligômeros (mais frequentemente dímeros e trímeros) são hidrolisados até monômeros, monossacarídeos e aminoácidos, 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 contém enzimas importantes na digestão, embora em grande número de organismos sua função seja apenas a de lubrificar o alimento (BARNARD, 1973).

A digestão terminal nos mamíferos é realizada por enzimas hidrolíticas presentes na membrana plasmática que recobre as microvilosidades das células intestinais (cf. KENNY & BOOTH, 1978; ver também item 1.2.). Em vista desses resultados, tem sido proposto que na maioria dos organismos a digestão terminal seja rea-

lizada em membranas celulares (por exemplo UGOLEV & DE LAEY, 1973), embora sejam necessários muito mais estudos para assegurar a generalidade da proposição.

A preocupação principal desta tese é em relação a digestão intermediária e final, isto é, em relação a sequência de processos pelo qual os oligômeros são hidrolisados até monômeros. Por outro lado, as hidrolases envolvidas em digestão terminal são de longe melhor conhecidas em mamíferos. Em vista disso, e levando em conta que muitas técnicas para o estudo das enzimas envolvidas na digestão terminal foram, e continuam sendo, desenvolvidas em mamíferos, iniciaremos a revisão enfocando primeiro as hidrolases de membrana de mamíferos e a seguir os processos digestivos dos insetos.

1.2. Hidrolases intestinais de oligômeros em mamíferos

A hidrólise terminal dos oligopeptídeos ocorre sob a ação de aminopeptidases e dipeptidases que apresentam uma certa variedade interespecífica. Entretanto, de regra, existem aminopeptidases integrantes da membrana das microvilosidades dos enterócitos responsáveis pela hidrólise de oligopeptídeos de três ou mais resíduos de aminoácidos e aminopeptidases e dipeptidases de citossol com atividade sobre tri- e dipeptídeos (p. ex., rato: vide KIM et al., 1974; homem: vide STERCHI & WOODLEY, 1980).

As aminopeptidases ligadas a membranas de microvilosidades foram purificadas a partir de enterócitos de porco (MAROUX et al., 1973; BENAJIBA & MAROUX, 1980), rato (KIM & BROPHY, 1976) e coelho (GORVEL et al., 1980; FERACCI & MAROUX, 1980). Os resultados, que envolveram a solubilização da enzima em detergentes e/ou sua remoção por tratamento com proteases, mostram a existência de uma aminopeptidase (aminopeptidase N) mais ativa sobre peptídeos

neutros e substratos sintéticos e outra (aminopeptidase A) mais ativa sobre derivados de aminoácidos ácidos.

A aminopeptidase N de intestino de porco é uma proteína transmembrana, composta de uma "cabeça" enzimaticamente ativa, hidrofílica, rica em carboidratos e que se salienta a partir da face externa da membrana e de uma âncora predominantemente hidrofóbica atravessando todo o cerne lipídico da membrana (MAROUX & LOUVARD, 1976; DESNUELLE, 1979). Como várias outras enzimas de membrana, a molécula de aminopeptidase pode ser extraída inteira com detergentes neutros, originando uma forma anfipática chamada de forma pós-detergente. A enzima pode ser também removida da membrana por clivagem proteolítica na junção hidrofílica-hidrofóbica da cadeia proteica. A forma resultante (forma pós-protease) corresponde grosseiramente à cabeça hidrofílica da enzima (MAROUX & LOUVARD, 1976; DESNUELLE, 1979).

As peptídeo hidrolases de citossol de enterócitos de mamíferos estão representadas por duas dipeptidases e por uma aminotripeptidase. Uma das dipeptidases atua na maioria dos dipeptídeos com poucas exceções, entre os quais estão os aminoacil-prolina que são hidrolisados pela outra dipeptidase (prolina dipeptidase) (cf. NÖREN et al., 1973; SJÖSTRÖM et al., 1973). A aminotripeptidase é uma aminopeptidase que atua sobre tripeptídeos e que apresenta uma especificidade ampla em relação ao resíduo do terminal N (DOUMENG & MAROUX, 1979).

A digestão terminal dos carboidratos em mamíferos ocorre inteiramente sob ação de enzimas presentes na membrana das microvilosidades dos enterócitos. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise são transportados por carregadores, que, em alguns casos, parecem agir em íntima cooperação com as hidrolases, pois observa-se que a absorção de açúcares recém clivados é mais rápida que se os mesmos produtos forem adicionados ao lúmen intesti-

nal (CRANE, 1968; BARNARD, 1973).

A dissacaridase de membrana melhor estudada até o presente é a sacarase-isomaltase. Essa enzima apresenta duas subunidades de peso molecular semelhante (120.000 e 140.000), uma contendo o sítio de clivagem de isomaltose e a outra o sítio de clivagem de sacarose. Somente a subunidade que apresenta atividade de isomaltase possui um segmento ancorador hidrofóbico (BRUNNER et al., 1979). Estudos mais recentes mostraram que quando essa enzima não é exposta a enzimas pancreáticas, a proteína isolada apresenta uma só cadeia (SJÖSTRÖM et al., 1980). Essa pró-sacarase-isomaltase foi recentemente sintetizada em sistema livre de células, após isolamento de seu RNAm (WACKER et al., 1981).

Foram também caracterizadas as subunidades da lactase-florizina hidrolase. Essa proteína possui duas subunidades de mesmo peso molecular (160.000) e aparentemente cada uma delas possui um segmento ancorador hidrofóbico. Uma das cadeias hidrolisa florizina e a outra é responsável pela hidrólise de lactose. É interessante notar que o mesmo sítio que hidrolisa lactose catalisa a clivagem de celobiose (SKOVBJERG et al., 1981).

1.3. Anatomia do tubo digestivo de *Rhynchosciara americana**

Antes de comentarmos o processo digestivo dos insetos, seria conveniente descrever sumariamente a anatomia de seus tubos digestivos, o que faremos a seguir, utilizando a larva de *Rhynchosciara americana* como exemplo.

* *Rhynchosciara americana* - WIEDEMANN, 1821 (Diptera Nematocera Sciaridae), foi redescrita por NONATO & PAVAN (1821) como *angelae* e essa denominação foi usada em numerosas publicações até ser demonstrada sua sinonímia como *americana* por BREUER (1969).

O canal alimentar é um tubo de comprimento e grau de complexidade variável conforme o grupo taxonômico e a fase de desenvolvimento do inseto.

A larva de *R.americana* apresenta um tubo digestivo bastante simples, sem grandes dobramentos e com diâmetro que varia pouco em toda a sua extensão. É dividido em 3 regiões: anterior, média e posterior (Fig.1.). A região anterior é formada pela cavidade bucal, faringe e esôfago. Este termina na válvula cardíaca e não apresenta dilatação para formar um papo, como ocorre em muitos insetos. A porção mais longa do canal alimentar é a região média, composta pelo ventrículo e por dois longos cecos que se abrem junto à válvula cardíaca. O ventrículo termina no ponto de abertura dos tubos de Malpighi, onde inicia-se a região posterior que apresenta uma única dobra e abre-se diretamente no ânus. As células da região anterior e posterior do tubo digestivo são cobertas por uma cutícula, o que não ocorre na região média (MARQUES, 1976). O alimento é separado do epitélio ventricular por uma membrana tubular, a membrana peritrófica. Em *R.americana* esta membrana é sintetizada na junção entre a região anterior e o ventrículo, resultando em um tubo contínuo que não penetra nos cecos e envolve o bolo alimentar ao longo de todo o ventrículo até o intestino posterior onde se desfaz por ação de dentículos da cutícula (MARQUES, 1976).

A existência dessa membrana delimita dois compartimentos luminais distintos: o espaço endoperitrófico, que corresponde a região interior à membrana peritrófica, onde está presente o alimento e o espaço ectoperitrófico, que é formado pelo lúmen dos cecos e pela região entre as células do ventrículo e a membrana peritrófica (Fig.1).

O espaço ectoperitrófico apresenta proporções variadas em diferentes insetos, podendo atingir volume considerável e igualar aquele do espaço endoperitrófico (RICHARDS & RICHARDS, 1977).

Figura 1 - Representao diagramtica da circulao endo-ectoperitrfica de enzimas digestivas no intestino mdio da larva de *R. americana*. Fluido endgeno (setas tracejadas) é transportado para a regio posterior do intestino mdio e move-se a seguir em direo aos cecos onde é absorvido. As enzimas digestivas (setas slidas) penetram no espao endoperitrfico na regio anterior e so recuperadas para o espao ectoperitrfico gradativamente, à medida que as molculas dos polmeros tornam-se suficientemente pequenas para acompanhar as enzimas atravs da membrana peritrfica. As enzimas e os nutrientes so ento levados para os cecos, onde ocorre a digesto terminal e a absoro. O espao ectoperitrfico ventricular é virtual, o esquema apresenta essa regio grandemente ampliada para facilitar a visualizao dos fluxos.

Em *R. americana* o diâmetro da membrana peritrôfica é maior que o do lúmen ventricular, formando-se numerosas dobras (MARQUES, 1976). Desse modo, o espaço ectoperitrôfico nesse animal é constituído majoritariamente pelo lúmen dos cecos e, em menor escala, por pequenos bolsões formados entre o epitélio do ventrículo e as pregas da membrana peritrôfica.

1.4. Hidrolases envolvidas na digestão em insetos

A digestão dos insetos pode ser encarada sob dois aspectos principais. O primeiro se refere à organização espacial do processo digestivo, isto é, a descrição da sequência de processos pelos quais o alimento passa nas diferentes regiões do tubo digestivo, desde a sua ingestão até a sua absorção. O segundo aspecto consiste na descrição física e cinética das hidrolases envolvidas na digestão. Esse último aspecto é o mais conhecido e será revisto primeiro.

O alimento consumido pelos insetos, assim como dos demais animais, é composto primordialmente por carboidratos, proteinas e lipídeos. As enzimas envolvidas na digestão de lipídeos por insetos foram revistas recentemente (TURUNEN, 1979) e não mais serão comentados aqui.

A maioria das proteinases digestivas descritas em insetos são ativas em pHs alcalinos ou neutros e são do tipo serina proteinase com especificidades similares aquelas da tripsina ou quimotripsina de mamíferos (revisão em LAW et al., 1977). Entretanto, poucas dessas enzimas foram purificadas até a homogeneidade, como por exemplo a tripsina presente no tubo digestivo de *Manduca sexta* (MILLER et al., 1974) e a quimotripsina de *Vespa orientalis* (JANY et al., 1974). Existem descritas e purificadas além de serina proteinases, sulfidril proteinases (em *Rhodnius*

prolixus, GARCIA et al., 1978) e metaloproteínas (em *Tineola bisselliella*, WARD, 1975d, e).

As aminopeptidases de insetos tem sido pouco estudadas (LAW et al., 1977). O estudo mais completo existente foi realizado em tubo digestivo de *Tineola bisselliella*, onde foram detectadas 16 aminopeptidases solúveis, das quais 9 foram caracterizadas (WARD, 1975a,b,c). 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. A principal diferença 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, 1975b e c). Outras aminopeptidases solúveis purificadas e parcialmente caracterizadas foram as de *Glossina morsitans* (GOODING & ROLSETH, 1976) e de *Attagenus megatoma* (BAKER & WOO, 1981).

As carboxipeptidases intestinais foram melhor estudadas nas frações solúveis de *Tineola bisselliella*, onde foram encontradas duas carboxipeptidases sulfidrílicas com preferência para Z-Gly-Leu (WARD, 1976) e de *Attagenus megatoma*, que possui duas carboxipeptidases, uma semelhante à carboxipeptidase A e outra com preferência para Z-Val-Leu (BAKER, 1981).

As amilases que se encontram nos insetos são do tipo α -amilase (revisão em DADD, 1970). Existem duas amilases purificadas até a homogeneidade: a amilase de *C. chinensis* (PODOLER & APPLEBAUM, 1971) e a de *Tenebrio molitor* (BUONOCORE et al., 1976). O padrão de ação da α -amilase de insetos é (pelo menos no único caso em que este foi estudado, cf. TERRA et al., 1977) similar ao da α -amilase salivar humana.

As celulasas ocorrem como secreções próprias dos tubos

digestivos (ou de seus anexos) em várias ordens de insetos: *Colleoptera* (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.

As glicosidases usualmente encontradas no tubo digestivo de insetos são: α - e β -glicosidases, α - e β -galactosidases, trealases e raramente β -frutosidases (DADD, 1970 ; CRIPPENDALE, 1978). Com exceção das trealases (que serão comentadas mais abaixo), a maioria das glicosidases foi estudada de maneira superficial, frequentemente não passando da demonstração de que substratos selecionados são hidrolisados por homogeneizados crus do tubo digestivo e as enzimas sendo designadas de acordo com seu substrato (DADD, 1970; HOUSE, 1974). O que torna ainda mais difícil a interpretação dos dados encontrados é o fato de que grande número deles foi obtido utilizando-se apenas substratos sintéticos, quando se sabe que existem glicosidases que clivam substratos naturais, mas não os arilglicosídeos correspondentes e vice-versa (MORGAN, 1975a, c).

As sacarases de insetos estudadas em detalhe foram, com uma única exceção, apenas as obtidas a partir 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 PHMB 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 α -glicosidases ines

pecíficas, pouco sensíveis a reagentes sulfidrilas, apresentam 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 intestinal parcialmente purificada. A enzima é solúvel e corresponde a uma α -glicosidase inespecífica, embora a preparação pareça estar contaminada por outras glicosidases (KATAGIRI, 1979).

Muito poucas β -glicosidases (revisão em MORGAN, 1975a) e β -galactosidases (revisão em MORGAN, 1975b) de insetos em geral, e de seu tubo digestivo em particular, foram caracterizadas, mesmo ao nível apenas da determinação de seu pH ótimo e Km. O estudo mais completo dessas enzimas em tubos digestivos de insetos foi realizado em *L.migratória*. Nesse inseto MORGAN (1975c) usando filtração em gel, desnaturação térmica e focalização isoelétrica mostrou que apenas uma espécie molecular (PM 110.000) é responsável pela hidrólise de celobiose e lactose, enquanto que as atividades de aril- β -glicosidase e aril- β -galactosidase são distintas entre si e da enzima que cliva celobiose e lactose. Todas as enzimas referidas são solúveis.

Trealase (EC 3.2.1.28) é uma das carboidrases de insetos com distribuição mais ampla, ocorrendo principalmente no intestino médio, músculo do voo, corpo gorduroso e glândulas labiais (WYATT, 1967). Algumas trealases solúveis foram altamente purificadas a partir de insetos inteiros (KALF & RIEDER, 1958; FRIEDMAN, 1960; SAITO, 1960; DERR & RANDALL, 1966; GUILLOUX et al., 1968; HUBER & LEFEBVRE, 1971; DAHLMAN, 1971; GIEBEL & DOMNAS, 1976). Entretanto, *Rhynchosciara americana* é dos poucos insetos cuja trealase intestinal foi parcialmente purificada e caracterizada. Os resultados sugerem que se trata de uma enzima solúvel, com um peso molecular de 122.000, apresentando em seu sítio ativo duas car

boxilas envolvidas no processo de catálise (TERRA et al., 1978).

1.5. Organização espacial do processo digestivo nos insetos

A organização do processo digestivo nos insetos é pouco conhecida porque, embora existam muitos estudos sobre enzimas digestivas em insetos, são raros os que estudam a distribuição dessas enzimas no canal alimentar (revisões em DADD, 1970; WIGGLES - WORTH, 1972; HOUSE, 1974; LAW et al., 1977; CHIPPENDALE, 1978) . Desse modo, os passos pelos quais o alimento ingerido é hidrolisado nos diferentes sítios do tubo digestivo é praticamente desconhecido. Isto é uma consequência das dificuldades em se coletar amostras de enzimas dos diferentes sítios do tubo digestivo de insetos, e também pelo não estabelecimento pelos diferentes autores de critérios para distinguir enzimas secretadas daquelas presentes nos espaços luminais devido a descamação e/ou rompimento celular durante a dissecação, e para separar enzimas que penetram daquelas que apenas se adsorvem na membrana peritrófica. Além disso, nenhum trabalho, com exceção do realizado em *R. americana* (ver abaixo), analisa a distribuição de enzimas entre o espaço endo e o ectoperitrófico. Isto dificulta sobremaneira a compreensão do processo digestivo naqueles insetos. Entretanto, apesar disso, algumas generalizações podem ser feitas.

Nos Orthoptera (pelo menos na família Acrididae) a digestão de carboidratos é principalmente luminal. Parte dessas enzimas devem ser providas pelas glândulas salivares, embora um certo número seja exclusivamente secretado pelo intestino (Celobiase, aril- α -galactosidase, lactase, cf. KHAN, 1962; EVANS & PAYNE, 1964; FREEMAN, 1967; DROSTE & ZEBE, 1974). Como não existe informação sobre a distribuição das enzimas luminais entre os espaços ecto e endoperitrófico, não se pode saber se nestes insetos a maior

parte da digestão intermediária e final ocorre nos espaços ectoperitróficos ou não. Por outro lado, a digestão de carboidratos ao nível da membrana plasmática das microvilosidades das células intestinais dos Orthoptera deve ser insignificante, se existir. Essa conclusão segue-se da observação de que a maior parte das carboidrases celulares em *L.migratória* é solúvel (DROSTE & ZEBE, 1974). Os resultados são muito fragmentários para se tirar conclusões sobre a digestão terminal de proteínas em Orthoptera.

Os Coleoptera, exemplificados pelo besouro *Leptinotarsa decemlineata*, apresentam algumas semelhanças com os Orthoptera, desde que possuem algumas carboidrases secretadas pelo intestino (cf. FINK, 1932).

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 das formigas do gênero *Atta* são derivadas dos fungos que elas cultivam (BOYD & MARTIN, 1975). Aliás, a aquisição de enzimas digestivas de fontes externas, com a finalidade de expandir a gama de substratos naturais capazes de servirem como fonte nutritiva, parece não ser muito raro, sendo observado também entre os Isoptera. Nesta ordem, as térmites superiores (família Termitidae) adquirem as celulasas-C₁ críticas para iniciarem a digestão de celulose a partir de suas culturas de fungos (MARTIN & MARTIN, 1978, 1979).

Os Diptera, além de *R.americana* (ver abaixo), foram muito pouco estudados e só se podem fazer considerações em relação à digestão terminal de proteínas. É interessante notar que *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 que não penetre no espaço endoperitrófico, como ocorre em *R.americana* (cf. TERRA et al., 1979), devido ao seu elevado peso molecular. Em relação às carboxipeptidases parecem ocorrer diferenças reais entre os dois *Diptera*. Enquanto em *G.morsitans*, as carboxipeptidase A e B, com pesos moleculares respectivamente de 30.200 e 22.000, são encontrados no espaço endoperitrófico, as carboxipeptidases de *R.americana* não o são (TERRA et al., 1979).

Os dados discutidos permitem supor que a digestão intermediária e final nos insetos deve ocorrer de forma distinta nas diferentes ordens de insetos. Mesmo dentro de uma ordem devem ocorrer adaptações típicas de alguns gêneros, como parece ser o caso do gênero *Atta* entre os Hymenoptera e das térmitas superiores entre os Isoptera.

A larva de *R.americana*, tanto quanto sabemos, é o inseto cuja organização do processo digestivo é melhor conhecida. Para isso, um grande número de enzimas foram ensaiadas em diferentes segmentos do tubo digestivo e critérios foram desenvolvidos para determinar o sítio de ocorrência das enzimas (Terra et al., 1979).

Os resultados mostraram que toda a digestão ocorre no intestino médio e que as enzimas aí encontradas apresentam três tipos de distribuição: a) enzimas secretadas para o lúmen do intestino médio que penetram na membrana peritrófica (proteínase, celulase e α -amilase); b) enzimas secretadas para o lúmen do intestino médio, mas que não penetram na membrana peritrófica, permanecendo no fluido ectoperitrófico (trealase e aminopeptidase); c) enzimas restritas às células (entre elas celobiase, maltase, β -galactosidase, dipeptidase, carboxipeptidase e fosfatase alcalina). Entre as enzimas secretadas, a única que apresentava grande

atividade nas células do intestino médio (cerca de 50% da atividade do intestino médio total) era a aminopeptidase. Esses resultados permitiram propor a existência de três fases espacialmente organizadas no processo digestivo desse inseto. A primeira, ocorrendo no interior da membrana peritrófica, consistiria no ataque a polímeros resultando em oligômeros que difundir-se-iam para os espaços ectoperitróficos onde se daria a segunda fase da digestão, na qual esses oligômeros seriam degradados à moléculas menores. A terceira fase, correspondente à digestão terminal, ocorreria nas células do epitélio ventricular posterior e, principalmente, dos cecos.

Afim de determinar o sítio celular de ocorrência das hidrolases envolvidas em digestão terminal, que ocorrem principalmente nos cecos gástricos, esse tecido de *R.americana* foi submetido a centrifugação diferencial após homogeneização branda e vigorosa, assim como a técnicas que levam a purificação de microvilosidades celulares. Os resultados permitiram propor que a digestão terminal de proteínas ocorre na membrana plasmática (e talvez também no citossol) das células dos cecos, principalmente pela ação de aminopeptidases, enquanto que a digestão de carboidratos, com exceção da trealose, ocorre somente na superfície das microvilosidades (FERREIRA & TERRA, 1980).

As velocidades de excreção das enzimas que penetram no espaço endoperitrófico 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). De acordo com o modelo (Fig. 1.), o alimento e as enzimas caminhariam para a região posterior do tubo digestivo, 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 espaço endoperitrófico 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).

É interessante notar que quatro meses após ter sido publicado o modelo descrito acima, um modelo similar incluindo apenas fluxos de fluidos (as enzimas não foram consideradas) apareceu na literatura (DOW, 1981). O referido modelo foi proposto a partir da observação do movimento de corantes no tubo digestivo do gafanhoto *Schistocerca gregaria*.

1.6. Objetivos deste trabalho

Os objetivos deste trabalho consistem em fornecer subsídios para ampliar o conhecimento da organização espacial do processo digestivo em *R.americana* e iniciar o estudo físico e cinético das enzimas envolvidas em digestão intermediária e final, uma vez que as hidrolases mais ativas envolvidas em digestão primária já foram inicialmente caracterizadas (TERRA et al., 1977, 1979).

A fim de se obter um conhecimento maior da organização espacial do processo digestivo em *R.americana* procuramos obter dados ultraestruturais e bioquímicos que pudessem apoiar, ou refutar, o modelo da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Fig. 1). Além disso, pretendemos ampliar o conhecimento da digestão terminal de proteínas em *R.americana*, comparando as aminopeptidases (peptideo hidrolases mais importantes) presentes em diferentes organelas das células dos cecos (principal sítio de digestão intermediária e final de proteínas) com aquelas encontradas no fluido ectoperitrófico.

A celobiase (EC 3.2.1.21) dos cecos gástricos foi escolhida, para iniciar o estudo detalhado das enzimas envolvidas em digestão intermediária e final em *R.americana*, porque trata-se de enzima muito ativa e porque estudos preliminares sugeriram que existia apenas uma forma molecular da enzima. Dados referentes às enzimas digestivas ligadas a membrana plasmática, como a celobiase de *R.americana*, são particularmente desejáveis porque, tanto quanto sabemos, não existe nenhum estudo desse tipo em insetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Glicose oxidase (tipo II), peroxidase (tipo II), L-aminoácido oxidase (tipo II), p-hidroximercuribenzoato, 1,10-fenantrolina, catalase de fígado bovina, hemoglobina bovina, albumina sérica bovina, substratos sintéticos, dissacarídeos e dipeptídeos foram adquiridos da Sigma. Polylite 8001 foi adquirida 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

As larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera, Sciariidae) alimentam-se até o final de 2º período quase que continuamente e são usualmente encontradas debaixo de plantas em decomposição, em bananais da orla marítima. No laboratório as larvas são criadas com folhas de batata doce picadas e umedecidas de acordo com LARA et al. (1965). Neste estudo utilizamos fêmeas no final do 2º período do 4º estágio (TERRA et al., 1973). Neste estágio as larvas permanecem a maior parte do tempo sobre o alimento, de onde elas são coletadas e então dissecadas.

2.3. Obtenção de fluido luminal dos cecos e células dos cecos gástricos e do ventrículo

As larvas eram lavadas em água destilada, dispostas sobre gelo picado para ficarem imóveis e em seguida dissecadas em

NaCl 0,1M gelado, como se segue. Os animais eram presos pela cápsula cefálica e, com o auxílio de uma pinça, a parede do corpo era estirada, resultando em seu descolamento da cápsula cefálica. O segmento anal e as glândulas salivares eram cortadas com um estilete e o tubo digestivo removido pela parte anterior do animal. O conteúdo dos cecos era recolhido com um capilar seguido do seccionamento do tubo digestivo na altura do proventrículo e da abertura dos túbulos de Malpighi. A membrana peritrófica com o seu conteúdo pastoso era agora retirada do intestino médio, os cecos removidos e o ventrículo restante cortado em uma porção anterior e outra posterior. Para alguns experimentos, o ventrículo posterior era ainda seccionado em uma porção proximal e uma distal (região dos dobramentos).

Os epitélios eram lavados extensivamente em salina para remover o restante do fluído antes de serem utilizados.

2.4. Microscopia óptica e eletrônica

As larvas foram dissecadas como descrito acima, em NaCl 0,1M gelado ou em sua própria hemolinfa. Como a membrana peritrófica da larva de R.americana contém grande quantidade de areia em seu interior (cf. TERRA & BIANCHI, 1975), é necessário removê-la antes da fixação para não danificar a lâmina do micrótomo. Esse procedimento, entretanto, não altera a aparência do tecido quando observado em um microscópio óptico (cf. MARQUES, 1976). Para os estudos de microscopia óptica, as seções do intestino médio foram fixadas em solução de Bouin e embebidas em parafina. Os cortes de 7µm obtidos em seguida, foram depois corados com hematoxilina e eosina. Para observação do material ao microscópio eletrônico, os tecidos foram fixados por 2 h a 4°C em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4 (SABATINI et al., 1963), contendo 0,2M

de sacarose. Após lavagem com sacarose 0,2M em tampão cacodilato, as porções do tubo digestivo 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 18h em acetato de uranila 1%. Após desidratação, em concentrações crescentes de etanol a temperatura ambiente, o material foi embebido com a resina Polylite 8001 (COIRO et al., 1972). Os cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo Porter-Blum MT II, contrastados em citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e examinados em um microscópio eletrônico Siemens Elmiskop IA, operado a uma voltagem 60 KV.

2.5. Preparações de microvilosidades de diferentes regiões do intestino médio

O procedimento utilizado foi basicamente o descrito por SCHMITZ et al. (1973).

Células dos cecos gástricos, ventrículo anterior e ventrículo posterior eram homogeneizadas em meio hipotônico constituído por Tris 2mM - Manitol 50mM, pH 7,1, usando-se um Omni-Mixer da Sorvall à 15.000 rpm por 20 s. Os homogeneizados eram filtrados em malha de nylon de 45µm e seu volume acertado de modo a conter material correspondente a 10 animais por ml.

Cloreto de cálcio sólido foi então adicionado aos homogeneizados para ficar numa concentração final de 10mM. As suspensões resultantes eram agitadas por 10 min antes de proceder - se as seguintes centrifugações:

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

2.6. Fracionamento celular de células dos cecos gástricos

Para verificação da distribuição subcelular de enzimas, células dos cecos gástricos eram homogeneizadas em meio isotônico consistindo da KCl 0,11M pH 7,0. Lotes de material correspondentes a 20 larvas eram homogeneizados em 1,5ml de meio através de 5 a 10 movimentos de pistão em um homogeneizador tipo Dounce de pistilo bem ajustado (condição branda de homogeneização). Em outra série de experimentos, o tecido era homogeneizado com auxílio de um Omni-Mixer da Sorvall a 15.000 rpm por 20 s (condição vigorosa de homogeneização). Em ambos os casos, após a homogeneização, o material era filtrado em malha de nylon de $45\mu\text{m}$ e o volume do filtrado elevado de modo a conter material correspondente a 10 animais por ml.

Em todos os casos, após retirada de uma alíquota de homogeneizado, procedia-se ao seguinte esquema de centrifugação:

O primeiro precipitado era lavado uma vez por ressuspensão no meio de homogeneização e os sobrenadantes reunidos antes de prosseguir-se com as centrifugações.

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

2.7. Preparação das membranas dos cecos gástricos e sua solubilização por Triton X-100

Epitélio dos cecos gástricos eram homogeneizados em meio isotônico consistindo de KCl 0,11M, pH 7,0. A homogeneização era feita utilizando-se um Omni-Mixer da Sorvall a 15.000 rpm por 20s. A seguir, o homogeneizado era filtrado em malha de nylon de 45 µm e o volume do filtrado elevado de modo a conter material correspondente a 10 animais por ml. Após a retirada de uma alíquota para controle, o homogeneizado era centrifugado a 25.000xg por 30 min e o sedimento lavado uma vez por ressuspensão no meio de homogeneização. O sedimento corresponde majoritariamente a membranas plasmáticas (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). Essa preparação de membrana era a seguir exposta a Triton X-100 por 20 h a 4°C, numa ra

ção de 10mg de Triton X-100/mg de proteína, antes do material ser centrifugado a 25.000xg por 30 min. O sobrenadante era utilizado como fonte de enzimas, após adicionar-se igual volume de Triton X-100 5%. A centrifugação desse sobrenadante por 60 min a 100.000xg não leva à formação de nenhum sedimento e a sua atividade em relação às enzimas ensaiadas permanece inalterada, se mantido a -20°C , por período de pelo menos um mês.

2.8. Solubilização de hidrólases da membrana dos cecos por papaína

Membranas dos cecos gástricos foram preparadas como descrito no item 2.7. e o sedimento obtido homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0 com auxílio de um homogeneizador Potter-Elvehjem.

Para ativar a papaína, 2,8mg da enzima foram incubadas, a 37°C por 5 min, na presença de tampão fosfato de potássio 62mM, pH 7,0 e cisteína 50mM. A suspensão de membranas obtidas como descrito acima era incubada com papaína ativada a 30°C , numa razão de 1mg de papaína/10mg de proteína de membrana. Aliquotas eram retiradas em tempos diferentes e TLCK era adicionado para ficar num excesso molar de 20 vezes em relação a papaína. Após diluir duas vezes com água gelada, as alíquotas eram centrifugadas a 100.000xg por 1 h e os sobrenadantes utilizados como fonte de enzima. A atividade das enzimas ensaiadas nessas preparações, se mantidas a -20°C , permanecem inalteradas por pelo menos um ano.

2.9. Determinação do peso molecular por centrifugação em gradiente de densidade

Amostras de 0,2ml de proteínas de membrana dos cecos so

lubilizadas com Triton X-100 ou com papaína, contendo 1,5mg de hemoglobina bovina e 50µg de catalase de fígado bovina, foram aplicadas no topo de gradientes contínuos de glicerol (glicerol 5 a 10% (P/V) em tampão fosfato pH 6,2 50mM) de 4,6ml. Esses materiais foram centrifugados a 96.000xg por 15 h a 4°C e alíquotas (0,2ml) foram coletados a partir do fundo de cada tubo 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 (PM 64.500) e catalase (PM 232.000) adicionadas à amostra. A posição da hemoglobina nos gradientes foi verificada determinando-se a absorbância das frações a 545nm e a da catalase, realizando-se ensaios da enzima segundo MARTIN & AMES (1961). A recuperação da atividade aplicada aos gradientes, para as diferentes enzimas ensaiadas, foi de cerca de 100%.

2.10. Eletroforese e determinação de atividades enzimáticas em géis de poliacrilamida

As amostras de diferentes preparações de enzima (fluido luminal dos cecos, citossol e membranas das células dos cecos solubilizadas em Triton ou papaína) foram aplicadas a géis de poliacrilamida preparados segundo HEDRICK & SMITH (1968) em tubos de 5mm de diâmetro interno e 10mm de comprimento. A separação eletroforética foi obtida com uma corrente de 2,5mA por coluna a 4°C.

Quando se desejava detectar atividade de glicosidases , a concentração de Tris nos géis era diminuída imergindo-os por 60 min em tampão fosfato 10mM, pH 6,0 a 4°C. Esse tampão era trocado em intervalos de 20 min.

Os géis eram fracionados em um fracionador de géis de

acrilamida (Autogeldivider Savant Instruments, USA) com tampão fosfato 0,1M, pH 6,2 (géis utilizados para detecção de glicosidases) ou com tampão fosfato 0,1M, pH 8,0 (géis utilizados para detecção de aminopeptidases). Frações de 9 gotas (correspondentes a 2mm do gel) foram coletadas e um volume do mesmo tampão utilizado no fracionamento foi adicionado a cada uma delas. Esse tampão continha Triton X-100 0,1%, quando era feita eletroforese de material solubilizado em Triton X-100. As frações permaneciam por 3 a 20 h a 4°C, sendo a seguir filtradas em papel Whatman nº 41 e desse filtrado eram retiradas alíquotas para os vários ensaios. A recuperação da atividade aplicada aos géis, para as diferentes enzimas ensaiadas, foi de cerca de 77%.

2.11. Eletrofocalização e determinação de atividades enzimáticas nos géis

Os géis de poliacrilamida 7,5% utilizados continham anfolitos pH 4-6 e pH 5-7 (1% de cada anfolito) e também Triton X-100 0,17%, 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 0,15ml de uma mistura de glicerol 8,8%, anfolito pH 4-6 0,7% e anfolito pH 5-7 0,7% em água. Sobre essa solução, após uma pré-focalização de 30 min, aplicava-se a preparação de enzima contendo glicerol 11,4%. Seguia-se uma eletrofocalização a 4°C por 2 a 3 h com uma voltagem de 31 V/Cm.

Após focalização, os géis foram divididos em frações e tratados como descrito no item 2.10.

O gradiente de pH ao longo dos géis era determinado fracionando um cilindro de gel preparado de forma idêntica aos demais,

com água bidestilada no lugar do tampão. O pH de suas frações era medido com um eletrodo de vidro, após permanecer por 3 h a temperatura ambiente. Em alguns casos, essas mesmas frações foram utilizadas para medida de atividade enzimática. A recuperação da atividade aplicada aos géis, para as diferentes enzimas ensaiadas, foi de cerca de 74%.

2.12. Determinação de atividades enzimáticas e de proteínas

Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito na Tabela I.

Em cada determinação, a mistura de reação foi incubada por 30, 60, 90 e 120 min, com exceção daquelas que continham δ -gliconolactona. Controles sem enzima (brancos de substrato) e sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade calculada foi expressa em nmol de substrato hidrolisado por min (mUnidades, mU).

Quando δ -gliconolactona estava presente, as velocidades iniciais foram calculadas a partir de incubações realizadas por 20 min a 30°C em tampão fosfato 100mM, pH 6,2. Nessas condições, 32% da concentração inicial de δ -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 de membrana foi assegurada pela medida da concentração de δ -gliconolactona remanescente (HESTRIN, 1949) em diferentes tempos, na presença e ausência de nossas preparações. O ácido glicônico, para ser usado como inibidor, foi preparado como se segue. Soluções de δ -gliconolactona 2,0mM em tampão fosfato 0,2M pH 8,0 foram incubadas a 30°C por 4 h. Após esse tempo elas foram diluídas com tampão fosfato 0,2M pH 6,2 e seus valores de pH ajustados para 6,2.

Os substratos derivados de nitrofenol foram ensaiados

Tabela I. - Condições padrões e métodos de determinação da atividade de hidrolases*

Enzima	EC	Substrato	Concentração (mM)	pH	T(°C)	Determinação realizada
Celobiase	3.2.1.21	celobiose	7	6,2	30	glicose ¹
Maltase	3.2.1.20	Maltose	7	6,0	30	glicose ¹
Aril-β-glicosidase	3.2.1.21	pNPβg1i	10	6,2	30	p-nitrofenol ²
Aril-β-glicosidase	3.2.1.21	oNPβg1i	-	6,2	30	o-nitrofenol ²
Aril-β-glicosidase	3.2.1.21	Pβg1i	-	6,2	30	glicose ¹
Aril-β-glicosidase	3.2.1.21	salicina	-	6,2	30	glicose ¹
Aril-β-galactosidase	3.2.1.23	NPβgal	10	6,2	30	p-nitrofenol ²
Aril-β-fucosidase	3.2.1.38	NPβfuc	10	6,2	30	p-nitrofenol ²
Fosfatase alcalina	3.1.3.1	NPP	4	10,4	37	p-nitrofenol ²
Aminopeptidase	3.4.11.-	LPNA	1	8,0	37	p-nitroanilina ³
Aminopeptidase	3.4.11.-	ArgβNA	0,56	8,0	37	β-naftilamina ⁴
Aminopeptidase	3.4.11.-	LeuβNA	1	8,0	37	β-naftilamina ⁴
Aminopeptidase	3.4.11.-	MetβNA	0,125	8,0	37	β-naftilamina ⁴
Aminopeptidase	3.4.11.-	ProβNA	0,125	8,0	37	β-naftilamina ⁴
Carboxipeptidase	3.4.12.-	ZglyPhe	15	8,0	37	grupos amino ⁵
Dipeptidase	3.4.13.11	Phe-gly	5	8,0	37	fenilalanina ⁶

* Os ensaios foram realizados nas temperaturas e pHs indicados. Os tampões utilizados (50mM) foram: citrato-fosfato (pH 6,0), fosfato (pH 6,2), Tris-HCL (pH 8,0) e glicina-NAOH (pH 10,4). A exceção foi pH 8,0 na maioria dos ensaios com LPNA (fosfato). O meio de reação com NPP continha, além do tampão, ZnCl₂ 2,5mM e MgSO₄ 1mM e o meio com ZglyPhe, NaCl 50mM. 1- Segundo DAHLQVIST - (1968). 2- Ver item 2.12. 3- Segundo ERLANGER et al. (1961). 4- Segundo HOPPS et al (1966). 5- Segundo ROSEN (1957). 6- Segundo NICHOLSON & KIM (1975).

nos pHs indicados em um volume de reação de 0,2ml e a reação interrompida pela adição de 1ml de tampão bicarbonato 0,25M carboⁿato 0,25M e SDS 1%. Em experimentos controles, verificou-se que essa concentração desnatura todas as enzimas ensaiadas. Nessas condições, o coeficiente de extinção molar a 420nm do p-nitrofenol^oato é 18.000 e do o-nitrofenol^oato é 4.600.

É importante ressaltar que todos os sedimentos obtidos por centrifugação eram suspensos por reomogeneização em homogenei^zador tipo Potter-Elvehjem. Quando essa providência não é tomada antes de realizar-se os ensaios enzimáticos, a recuperação total das enzimas particuladas fica bastante diminuída. Também deve-se salientar que em todos os meios de reação para ensaios de enzimas previamente solubilizadas em Triton X-100, a concentração desse detergente nunca ficou abaixo de 0,05%. Experimentos controle mostraram que a atividade das enzimas é constante em todas as concentrações de Triton utilizadas nos ensaios.

Para a determinação de proteínas, um volume de HClO_4 1,0N gelado era adicionado à amostra de concentração proteica desconhecida. Após esperar 10 min no gelo, a suspensão era centrifugada a 10.000xg por 10 min e o sedimento resultante lavado com HClO_4 0,3N. Esse sedimento, após solubilização em NaOH 1,0N, era utilizado na determinação de proteínas segundo LOWRY et al. (1951), empregando-se albumina de soro bovino como padrão.

2.13. Inibição da hidrólise de celobiose por pNP β gli e inibição da hidrólise de pNP β gli por celobiose

Afim de se determinar a atividade sobre pNP β gli e sobre celobiose, quando os substratos encontravam-se presentes simultaneamente nos meios de incubação, uma alíquota era retirada de cada amostra para determinar p-nitrofenol^oato, e daí estimar a

hidrólise de pNP β gli, e outra alíquota era utilizada para medida de glicose. A determinação de glicose nesse experimento era feita adicionando-se H₂SO₄ ao final da incubação com o reagente de glicose oxidase-peroxidase (DAHLQVIST, 1968). Nessas condições, o p-nitrofenol encontra-se protonado e não interfere na leitura da absorbância, necessária para a medida de glicose. Após descontar-se (a partir das medidas de p-nitrofenolato) as moléculas de glicose produzidas na hidrólise de pNP β gli, obtinha-se uma medida da atividade sobre celobiose.

2.14. Identificação da configuração da glicose liberada pela celobiase solubilizada em papaína

A glicose oxidase de fungos oxida β -D-glicose preferencialmente (KEILIN & HARTREE, 1952) e, por isso, ela tem sido usada, juntamente com peroxidase e um corante acceptor de eletrons, na identificação da configuração anomérica da glicose liberada por dissacaridases (p.ex. SEMENZA et al., 1969).

Afim de se identificar a configuração da glicose liberada pela celobiase solubilizada por papaína, a celobiase foi incubada por 15 min à temperatura ambiente (24°C) em tampão acetato 20mM pH 5,6 com oNP β gli. O tampão acetato foi utilizado no lugar do tampão fosfato porque esse último íon acelera o processo de anomerização (SCHRAY & BENKOVIC, 1978). Ao término dos 15 min, inibia-se a celobiase pela adição de δ -gliconolactona (final 1mM) ao meio de incubação e retirava-se deste uma alíquota de 0,1 ml antes e outra após ferve-lo por 5 min. Às alíquotas, adicionava-se 1 ml de reagente de glicose oxidase-peroxidase (DAHLQVIST, 1968) e a absorbância era a seguir lida continuamente a 420nm. 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 com concentrações de glicose iguais a das amostras experimentais. Os controles foram incubados por 7,5 min antes da adição de δ -gliconolactona e reagente de glicose oxidase-peroxidase.

A ausência de mutarrotase (EC 5.1.3.33) em nossas preparações foi assegurada pelos resultados idênticos obtidos na incubação de α -D-glicose, com o reagente de glicose oxidase-peroxidase, na presença e ausência de nossas preparações.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade de arilamidases nas frações subcelulares e conteúdo luminal dos cecos gástricos

As várias frações particuladas das células dos cecos gástricos são semelhantes entre si, apresentando uma maior atividade sobre Leu β NA em tampão Tris, uma atividade intermediária sobre LpNA em tampão Tris e uma menor atividade sobre LpNA em tampão fosfato, enquanto que o contrário é observado para a fração solúvel (Tabela II). O conteúdo luminal dos cecos apresenta uma atividade de arilamidase semelhante àquela da fração solúvel.

A hidrólise de diferentes aminoacil- β -naftilamidas e Phe-Gly nas frações particuladas (Figura 2), ocorre principalmente em P₁, quando se utiliza condições brandas de homogeneização, e na fração P₃, quando o homogeneizado utilizado foi obtido em condições vigorosas. Essas atividades hidrolíticas são também encontradas no sobrenadante final (Figura 2). Os dados sugerem que as arilamidases e Phe-Gly hidrolase ocorrem ligadas à membrana plasmática e no citossol das células dos cecos. Essa conclusão é compatível com o fato de que após homogeneização branda, a membrana plasmática produz fragmentos grandes que sedimentam-se principalmente em baixas acelerações. Por outro lado, quando a homogeneização é mais vigorosa, os fragmentos de membrana plasmática resultantes são menores e sedimentam-se somente em acelerações mais elevadas (EVANS, 1978), como é evidenciado pela distribuição de fosfatase alcalina, marcadora da membrana plasmática (Fig. 2 e FERREIRA & TERRA, 1980). Não há evidências para a ocorrência de qualquer quantidade significativa de arilamidases (ou Phe-Gly hidrolase) em lisossomos. Se isso acontecesse, no fracionamento feito a partir de homogeneizado obtido em condições brandas de homogeneização a atividade específica na fração P₃ deveria ser maior

Figura 2 - Distribuição da atividade de arilamidase, sobre vários substratos, em frações subcelulares dos cecos gástricos de *R. americana*. A, homogeneização branda. B, homogeneização vigorosa. Os ensaios foram realizados em tampão Tris 50mM, pH 8,0. Fosfatase alcalina é um marcador da membrana plasmática das células dos cecos (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). Os resultados são apresentados segundo DE DUVE et al., (1955). As frações são representadas da esquerda para a direita na ordem em que foram obtidas (P_1 , P_2 , P_3 , P_4 e S, respectivamente). Os dados são valores representativos obtidos para uma das 3 determinações independentes realizadas.

Tabela II. - Atividades de arilamidases (mU/animal) em frações subcelulares e fluido luminal dos cecos gástricos de *R. americana* em diferentes condições*

Condição de ensaio	Fração das células dos cecos					Conteúdo luminal dos cecos	
	H	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	S	
LPNA, fosfato	162 ± 44	52,7 ± 9,8	23,1 ± 4,9	25,9 ± 5,5	5,53 ± 0,38	48,1 ± 8,1	58,2 ± 5,7
LPNA, Tris	213 ± 2	83,6 ± 5,6	34,8 ± 3,0	46,4 ± 4,1	10,2 ± 0,9	38,1 ± 5,2	24,7 ± 4,2
LeuBNA, Tris	478 ± 25	187 ± 8	79,6 ± 7,6	123 ± 2	19,9 ± 1,1	26,0 ± 2,8	14,7 ± 2,0

* Homogeneizados de células dos cecos, obtidos em condições brandas de homogeneização, foram submetidos a um fracionamento celular como descrito em Material e Métodos. As frações celulares e o fluido luminal foram ensaiados a 37°C em LPNA 1mM ou LeuBNA 1mM, na presença de tampão fosfato 0,1M pH 8,0 - ou tampão Tris 50mM pH 8,0. As atividades apresentadas são médias mais desvios padrões de duas determinações realizadas em 2 preparações diferentes obtidas a partir de 200 larvas cada uma.

Tabela III. - Atividade arilamidásica relativa, sobre vários substratos, da fração particulada, fração solúvel e do conteúdo luminal dos cecos gástricos*

Fonte de enzima	ProBNA	MetBNA	ArgBNA	Phe-gly	LeuBNA
Fração particulada	1,55 ± 0,05	12,1 ± 1,0	17,5 ± 3,2	21,7 ± 7,8	100 (6272 ± 54)
Fração solúvel	1,58 ± 0,46	20,2 ± 8,6	44 ± 15	59,1 ± 8,8	100 (584 ± 51)
Conteúdo luminal	—	19,1 ± 9,4	67 ± 16	62 ± 15	100 (831 ± 149)

* Os dados referentes à fração particulada (P_1) e à fração solúvel foram obtidos de experimentos semelhantes aos descritos na Fig. 2A. As atividades específicas sobre os vários substratos foram calculados tomando-se como 100 a atividade específica sobre LeuBNA (apresentada entre parênteses). Os números são médias mais desvios padrões das determinações realizadas em pelo menos três preparações obtidas de 200 larvas cada uma, exceto no caso dos conteúdos luminais cujas preparações vieram de 50 larvas cada.

do que na fração P_1 e, após homogeneização vigorosa, parte da atividade das arilamidases particuladas deveria ser transferida para a fração solúvel (cf. FERREIRA & TERRA, 1980).

Os dados apresentados na Tabela III confirmam as conclusões tiradas dos dados da Tabela II: as enzimas ligadas a membranas são diferentes das de citossol, que por sua vez são semelhantes às aquelas presentes no fluido ectoperitrófico.

Como as hidrolases particuladas parecem estar ligadas à membrana, as microvilosidades dos cecos foram purificadas e usadas como fonte de enzimas de membrana no estudo do efeito de vários compostos sobre sua atividade. As preparações de microvilosidades provavelmente são muito menos contaminadas por enzimas solúveis que qualquer outra fração particulada obtida por centrifugação diferencial (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). A atividade arilamidásica de microvilosidades, citossol e fluido luminal foi inibida (Tabela IV) por metais pesados (Zn^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+}) e por fenantrolina, mas foi pouco afetada por Ca^{2+} , Mg^{2+} e EDTA. A atividade arilamidásica das microvilosidades foi bastante inibida por PHMB, enquanto as arilamidases de citossol e lúmen foram pouco afetadas por essa substância.

3.2. Eletroforese de arilamidases presentes no citossol e lúmen dos cecos gástricos

A atividade arilamidásica do citossol dos cecos apresenta 3 picos principais (2, 4 e 5) e 2 picos minoritários (1 e 3) após separação eletroforética (Fig. 3). A arilamidase 1 de citossol é muito mais ativa sobre Leu β NA que sobre LPNA e algumas vezes ela se separa completamente do pico 2, como na Fig. 3c, que apresenta resultados obtidos de uma eletroforese de enzimas luminiais. As arilamidases 4 e 5 de citossol resolvem-se mal, embora

Tabela IV. - Efeito de vários compostos na hidrólise de LPNA pelo conteúdo luminal e pelas microvilosidades e citossol das células dos cecos gástricos de *R. americana*.

Fonte de enzima	Nada	CaCl_2	CoCl_2	ZnCl_2	MnCl_2	MgSO_4	EDTA	Fenantrolina	PHMB
Microvilosidades	100	$75,2 \pm 2,5$	$39,1 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$36,9 \pm 3,8$	$71,5 \pm 7,3$	$84,1 \pm 0,4$	$18,2 \pm 9,2$	$35,7 \pm 0,1$
Fração solúvel	100	$72,1 \pm 13,3$	$29,3 \pm 1,4$	$0,8 \pm 0,3$	$41,3 \pm 1,0$	$79,1 \pm 10,2$	$114,8 \pm 1,2$	$27,5 \pm 1,0$	$80,2 \pm 8,8$
Conteúdo luminal	100	$73,7 \pm 0,8$	$34,6 \pm 2,9$	$0,8 \pm 0,3$	$40,5 \pm 3,5$	$71,6 \pm 4,1$	$116,8 \pm 4,9$	$28,5 \pm 1,7$	$90,2 \pm 4,0$

* As microvilosidades foram preparadas como descrito em Material e Métodos. A fração solúvel corresponde ao sobrenadante final obtido após centrifugação diferencial de um homogeneizado preparado em condições vigorosas de homogeneização. As enzimas foram pré-incubadas com os compostos por 1 h a 22°C em tampão Tris 50mM - pH 8,0 e a seguir LPNA (1mM final) foi adicionado e a atividade residual determinada. PHMB estava presente (na pré-incubação e durante o ensaio) em uma concentração final de 0,5mM e todos os demais compostos, em 1,0mM. As atividades residuais são médias mais desvios padrões baseados em duas análises realizadas em duas preparações obtidas de 200 larvas cada.

Figura 3 - Atividade de arilamidase no citossol e lúmen dos cecos, após separação eletroforética a 4°C, em cilindros de gel de poli-acrilamida. A, atividade de enzimas do citossol sobre LeuβNa; B, atividade de enzimas do citossol sobre LPNA; C, atividade de enzimas do lúmen dos cecos sobre LeuβNA; D, atividade de enzimas do lúmen dos cecos sobre LPNA. Esses perfis foram obtidos utilizando-se preparações obtidas de 200 larvas (células dos cecos) ou 50 larvas (fluido luminal). Perfis obtidos com outras preparações são muito semelhantes a esses.

possam ser diferenciadas pela observação de suas atividades sobre LPNA. A razão de migração e a razão de atividade sobre LeuβNA e LPNA apoiam a suposição de que as arilamidases luminais são idênticas às arilamidases presentes no citossol, com exceção da arilamidase 5, que não é encontrada no fluido luminal, aparecendo unicamente no citossol.

3.3. Histologia do intestino médio de *R.americana*

O tubo digestivo da larva de *R.americana* é composto por um pequeno intestino anterior, um intestino médio longo, com 2 cecos gástricos conectados à região anterior, e um intestino posterior de paredes finas. Entre o intestino anterior e o intestino médio existe um pró-ventrículo e a região onde os túbulos de Malpighi encontram o intestino delimita a transição entre o intestino médio e o posterior.

Uma larva madura pesa cerca de 50mg e possui um ventrículo cilíndrico de cerca de 16mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro. Os cecos gástricos tem cerca de 10mm de comprimento e 0,8mm de diâmetro. A parede interna dos cecos e do quarto posterior do ventrículo é enrugada. Esse enrugamento é um reflexo de um dobramento do epitélio (Figs. 4b e c). As células dos cecos gástricos são poliédricas, com microvilosidades cobrindo suas faces apicais (Fig. 4c.). As células ventriculares variam em aspecto ao longo do comprimento do ventrículo, que pode ser considerado como dividido em 4 regiões: ventrículo anterior proximal e distal e ventrículo posterior proximal e distal (região com dobramentos). O ventrículo anterior proximal apresenta células achatadas, com núcleos apicais, enquanto que no ventrículo anterior distal encontramos grandes células colunares com células menores intercaladas irregularmente, as células regenerativas (Fig. 4a.). No ven-

Figura 4 - Cortes histológicos do intestino médio da larva de *R. americana*. (a) Células da região proximal do ventrículo anterior (metade inferior do campo) com núcleos apicais e células da região distal do ventrículo (metade superior do campo) mostrando células colunares com células regenerativas intercaladas. O ventrículo anterior apresenta-se colapsado devido à remoção da membrana peritrófica na dissecação. Os cecos gástricos apresentam um bordo em escova bastante desenvolvido. Barra=100µm. (b) Ventrículo posterior proximal (metade superior) e ventrículo posterior distal - (região com dobramentos, na metade inferior). Barra=100µm. (c) Detalhes dos cecos gástricos. Barra=50µm. (d) Detalhes do ventrículo posterior distal. Barra=50µm. (AV) ventrículo anterior; (BB) bordo em escova; (GC) cecos gástricos; (L) lúmen; (N) Núcleo; (RC) células regenerativas.

trículo posterior distal (região com dobramentos), células aproximadamente colunares estão arranjadas em grupos, em grandes dobramentos epiteliais, formando profundas criptas multicelulares (Fig. 4d). Dependendo da posição das células nas criptas multicelulares, formam-se pequenas criptas entre células adjacentes. O ventrículo posterior proximal é uma região de transição entre o ventrículo anterior distal e o ventrículo posterior distal. Assim, suas células assemelham-se inicialmente aquelas do ventrículo anterior e, conforme se vai para as regiões mais posteriores, as células apresentam faces apicais convexas, com pequenas criptas entre células adjacentes, e com dobramentos em sua lâmina basal (Fig. 4b).

3.4. Ultraestrutura das células dos cecos gástricos

A membrana plasmática apical das células dos cecos gástricos é modificada em microvilosidades cilíndricas que apresentam um arranjo hexagonal (Fig. 5c). As microvilosidades tem cerca de $3,8\mu\text{m}$ de comprimento e são cobertas por um proeminente glicocálix. No citoplasma de cada microvilosidade, ocorrem microfibrilamentos que podem ser vistos penetrando ligeiramente no citoplasma apical, abaixo da base das microvilosidades.

A membrana plasmática lateral tem uma superfície pequena, devido a existência de criptas profundas entre células adjacentes (Fig. 4c e 5c). Essa membrana apresenta dobramentos irregulares, algumas vezes modificados em interdigitações, ao longo dos complexos funcionais, que são principalmente junções septadas (Fig. 5c). A membrana plasmática basal apresenta invaginações com poucas aberturas para o espaço extracelular subjacente (Fig. 5b). Existem várias mitocôndrias associadas a essas invaginações, embora elas sejam particularmente abundantes no citoplasma

Figura 5 - Cecos gástricos da larva de *R.americana*. (a) Detalhe do ápice de uma célula dos cecos gástricos. (b) Detalhe da base de uma dessas células. Observam-se algumas aberturas (setas) para o espaço extracelular subjacente. (c) Detalhe do ápice de duas células dos cecos gástricos. (BI) invaginações basais; (BL) lâmina basal; (G) complexo de Golgi; (JC) complexo juncional ; (LM) músculo longitudinal; (LS) esfera lipídica; (Ly) lisossomo; (Mi) mitocôndria; (Mv) microvilosidade; (N) núcleo; (RER) retículo endoplasmático rugoso; (SER) retículo endoplasmático liso. Barra=1µm.

apical, próximo à base das microvilosidades (Fig. 5a).

Esferas contendo lipídeos, que estão frequentemente associadas a mitocôndrias, aparecem dispersas no citoplasma, embora predominem no citoplasma apical. Nessas células, o retículo endoplasmático rugoso é abundante e ocorre em grupos de cisternas alongadas, usualmente dispostas em arranjos paralelos (Fig. 5c). Elementos do aparelho de Golgi estão dispersos principalmente no citoplasma apical, na forma de pequenos grupos de cisternas dilatadas e vesículas associadas a essas cisternas (Fig. 5c).

As células também apresentam alguns lisossomos, microtúbulos dispersos irregularmente e um grande núcleo apical.

3.5. Ultraestrutura das células do ventrículo

As células do ventrículo anterior, com exceção das células regenerativas, são caracterizadas pela presença de microvilosidades curtas (cerca de 0,6µm de comprimento) arranjadas irregularmente na superfície apical (Figs. 6a e b) e por invaginações pronunciadas da membrana plasmática basal (Fig. 6a). Essas invaginações estão dispostas paralelamente, possuem numerosas mitocôndrias associadas e estendem-se quase até a superfície apical da célula. As invaginações apresentam numerosas aberturas adjacentes à lâmina basal (Fig. 6c). No citoplasma apical, existem elementos do Golgi organizados como pequenos grupos de cisternas pouco dilatadas, com vesículas associadas e alguns elementos do retículo endoplasmático (Fig. 6b). Encontram-se ainda no citoplasma esferas lipídicas e numerosos microtúbulos irregularmente dispersos.

No ventrículo posterior, as células (com exceção das regenerativas) assemelham-se às daquelas dos cecos gástricos, apresentando na face apical microvilosidades longas (região proximal: cerca

de 8,1µm de comprimento; região distal: cerca de 5,4µm de comprimento) e invaginações da membrana plasmática basal moderadamente desenvolvidas, com mitocôndrias associadas e poucas aberturas para o espaço extracelular subjacente (Figs. 7a, c, 8b e c). A semelhança entre as células do ventrículo posterior e dos cecos gástricos é maior quando se considera a região distal do ventrículo posterior (região com dobramentos). Nessa região, células com microvilosidades muito compridas estão agrupadas em grandes dobramentos epiteliais formando criptas multicelulares (Fig. 8a). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático rugoso ocorrem principalmente na região apical da célula e um grande número de esferas lipídicas são encontradas dispersas no citoplasma (Figs. 7a e b). Essas observações concordam com resultados anteriores que mostraram que o tubo digestivo é um reservatório de lipídeos (TERRA et.1975) e que esses são armazenados principalmente na região posterior do tubo digestivo (MARQUES, 1976). Entretanto, a distribuição das esferas lipídicas entre as várias células do ventrículo posterior proximal não é uniforme; algumas células estão repletas de esferas, enquanto outras células apresentam poucas esferas. Esta diferença foi descrita anteriormente utilizando-se métodos histoquímicos e foi usada para apoiar a distinção entre células "digestivas" e "colunares" do ventrículo posterior proximal (MARQUES,1976). Entretanto, com base nos dados de ultraestrutura obtidos aqui, essa distinção não parece ser justificável. As células do ventrículo posterior apresentam um retículo endoplasmático rugoso moderadamente desenvolvido, elementos do Golgi dispostos principalmente no citoplasma apical e microtúbulos espalhados irregularmente pelo citoplasma. Entre as microvilosidades, observa-se com frequência pequenas depressões que parecem ser internalizadas na forma de vesículas de pinocitose (Figs. 7b, 8b). Lisossomos dispersos no citoplasma são observados somente nas células do ventrículo posterior distal.

Figura 6 - Ventrículo anterior da larva de *R.americana*. (a) Aspecto geral de uma célula de ventrículo anterior. (b) Detalhe do ápice de uma dessas células. (c) Detalhe da base de uma dessas células. As invaginações basais apresentam numerosas aberturas (setas) para o espaço extracelular subjacente. Abreviaturas como na Figura 5. Barra=1µm.

Figura 7 - Ventrículo posterior proximal da larva de *R.americana*. (a) Detalhe do ápice de células do ventrículo posterior proximal mostrando uma cripta entre duas células adjacentes. (b) Detalhe do ápice de uma célula do ventrículo posterior proximal. Observam-se vesículas de pinocitose (setas) e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. (c) Detalhe da base de uma célula do ventrículo posterior proximal. (d) Detalhe do ápice de uma dessas células. Abreviaturas como na Figura 5. Barra=1µm.

Figura 8 - Ventrículo posterior distal da larva de *R.americana*.
(a) Detalhe do ápice de várias células do ventrículo posterior distal formando uma cripta multicelular. (b) Detalhe do ápice de uma célula do ventrículo posterior distal com uma vesícula pinocítica (seta). (c) Detalhe da base dessas células, onde há poucas aberturas (seta) para o espaço extracelular subjacente. Abreviaturas como na Figura 5. Barra=1µm.

3.6. Enzimas de microvilosidades de diferentes regiões do tubo digestivo

As recuperações de microvilosidades purificadas em nos sas preparações podem ser calculadas a partir dos dados obtidos para fosfatase alcalina (Tabela V), uma vez que essa enzima ocor re somente na membrana que cobre as microvilosidades das células do tubo digestivo de *R.americana* (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). A Tabela VI mostra que a quantidade porcentual de proteína celular que ocorre em microvilosidades é semelhante nas células dos cecos e do ven - trículo posterior, em contraste com a quantidade muito menor en - contrada no ventrículo anterior, mesmo se levarmos em conta as recuperações das diferentes preparações, estimadas a partir dos dados da Tabela V.

As microvilosidades purificadas à partir das diferentes regiões do intestino médio apresentam atividades específicas de 2 a 4 vezes maiores que as do homogeneizado inicial para as car - boidrases (com exceção de maltase) e 1 a 1,5 vezes maior para as peptidases e maltase (Tabela VII). O aumento observado na ativi dade específica apoia a suposição de que essas enzimas estão liga - das à membrana plasmática, embora a recuperação das atividades na fração de microvilosidades (Tabela VII) demonstre que parte da a - tividade de peptidase e maltase deve ocorrer em outro lugar.

As microvilosidades das células dos cecos gástricos e do ventrículo posterior são muito semelhantes entre si e exibem alta atividade específica para as enzimas digestivas, enquanto que as microvilosidades das células do ventrículo anterior possuem uma quantidade bem menor dessas enzimas (Tabelas VII e VIII). Uma inspeção cuidadosa nas Tabelas VII e VIII mostra que, embora as microvilosidades das células dos cecos gástricos e ventrículo pos terior sejam muito semelhantes, as microvilosidades das células

Tabela V. - Atividade de fosfatase alcalina em homogeneizados e em microvilosidade purificadas das células de diferentes regiões do intestino médio de *R.americana*

Seção do intestino médio	Homogeneizado (mU/animal)	Microvilosidades (mU/animal)	(% do Homogeneizado)
Cecos gástricos	2,07 ± 0,15	0,91 ± 0,14	44 ± 10
Ventrículo anterior	0,093 ± 0,010	0,020 ± 0,003	21,5 ± 5,5
Ventrículo posterior	0,99 ± 0,17	0,38 ± 0,06	38 ± 12

* As microvilosidades foram purificadas como descrito em Material e Métodos. Os dados são médias mais desvios padrões de duas determinações realizadas em duas preparações diferentes, contendo 200 larvas cada uma.

Tabela VI. - Proteína ($\mu\text{g}/\text{animal}$) presente em homogeneizados e em microvilosidades purificadas de diferentes regiões do intestino médio*

Seção do intestino médio	Homogeneizado	Microvilosidades
Cecos gástricos	146 $\pm$ 24	20,0 $\pm$ 5,2
Ventrículo anterior	37,9 $\pm$ 6,0	1,3 $\pm$ 0,3
Ventrículo posterior	82,1 $\pm$ 10	8,4 $\pm$ 0,1

* Os dados são médias mais desvios padrões de duas determinações realizadas em duas preparações diferentes, contendo 200 larvas cada uma.

Tabela VII - Hidrolases presentes em homogeneizados e em microvilosidades de diferentes regiões do intestino médio da larva de *R. americana**

Enzima	Seção do intestino médio	Homogeneizado			Microvilosidades				
		mU/mg	mU/animal	mU/mg	mU/animal				
Aminopeptidase	CG	1703	± 103	249	± 15	2558	± 377	117	± 17
Aminopeptidase	VA	516	± 18	19,6	± 2,0	344	± 21	2,13	± 0,41
Aminopeptidase	VP	1063	± 46	87,2	± 2,3	1258	± 138	27,4	± 1,0
Carboxipeptidase	CG	349	± 64	50,9	± 8,3	449	± 57	20,4	± 7,9
Carboxipeptidase	VA	100	± 22	3,79	± 0,45	66	± 18	0,409	± 0,047
Carboxipeptidase	VP	179	± 36	14,7	± 2,9	181	± 61	3,9	± 1,0
Celobiase	CG	58,8	± 9,4	8,59	± 0,42	166	± 49	7,6	± 2,2
Celobiase	VA	8,0	± 1,3	0,30	± 0,05	19,8	± 4,6	0,121	± 0,028
Celobiase	VP	66	± 13	5,4	± 1,0	211	± 32	4,6	± 1,1
β-Fucosidase	CG	49,5	± 5,6	7,23	± 0,22	146	± 38	6,63	± 0,93
β-Fucosidase	VA	2,00	± 0,23	0,075	± 0,017	3,61	± 0,94	0,022	± 0,005
β-Fucosidase	VP	57,7	± 9,2	4,74	± 0,43	178	± 20	3,88	± 0,14
Maltase	CG	31,1	± 4,0	4,55	± 0,61	45,4	± 5,7	2,07	± 0,27
Maltase	VA	7,18	± 3,4	0,272	± 0,053	30,8	± 5,3	0,191	± 0,037
Maltase	VP	32,6	± 5,6	2,67	± 0,18	46,7	± 7,0	1,02	± 0,07

* As atividades nas microvilosidades foram calculadas a partir das determinações realizadas em microvilosidades purificadas, levando em conta as recuperações reais obtidas nas diferentes preparações. Essas foram estimadas a partir das recuperações encontradas para fosfatase alcalina (Tabela V), enzima que ocorre somente na membrana que cobre as microvilosidades do intestino médio de *R. americana* (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). Os dados são médias mais desvios padrões de duas determinações realizadas em duas preparações diferentes, contendo 200 larvas cada uma. CG, ceos gástricos; VA, ventrículo anterior; VP, ventrículo posterior.

Tabela VIII. - Proteína e hidrolases presentes em preparações de microvilosidades de diferentes regiões do intestino médio*

Seção do intestino médio	Proteína (µg/animal)	Aminopeptidase (mU/mg)	β-galactosidase (mU/ml)
Cecos gástricos	20,5	2053	364
Ventrículo anterior	0,567	355	35,2
Ventrículo posterior proximal	0,352	443	11,0
Ventrículo posterior distal	2,57	1026	406

* As determinações foram realizadas em homogeneizados obtidos de seções do intestino médio de 300 larvas dissecadas sob lupa. Embora os dados sejam provenientes de uma única preparação, uma comparação com as Tabelas VI e VII apoia a suposição de que os resultados são significativos.

dos cecos são mais ricas em peptidases (aminopeptidase e carboxipeptidase) e mais pobres em oligossacaridasas (celobiase, β -galactosidase e maltase) que as microvilosidades do ventrículo posterior.

3.7. Solubilização da celobiase por detergentes e por papaína

Cerca de 85% da atividade originariamente presente na preparação de membranas dos cecos gástricos de *R.americana* é solubilizada em Triton X-100. Por outro lado, a papaína é capaz de solubilizar cerca de 75% da celobiase de membranas, após 45-60 min de tratamento.

Em ambas as solubilizações, a atividade solubilizada somada com aquela não solubilizada corresponde a cerca de $95 \pm 5\%$ da atividade encontrada inicialmente na preparação de membranas. Isso significa que a atividade catalítica da enzima não é afetada apreciavelmente por nenhum dos dois processos de solubilização.

3.8. Peso molecular e pI da celobiase solubilizada por detergente e por papaína

Os experimentos de focalização isoeletrica mostraram que existe apenas um pico de atividade sobre celobiose tanto nas preparações em detergente (pI = 5,4), quanto nas preparações com papaína (pI = 4,7) (Fig. 9). Nos dois casos, a atividade sobre NP β Gal parece coincidir parcialmente com aquela sobre celobiose.

Da mesma forma que no caso da focalização isoeletrica, apenas um pico de atividade sobre celobiose é visível, nas preparações em detergente e em papaína, após separação em gradiente contínuo de glicerol (Fig. 10).

A celobiase solubilizada em detergente apresenta um pe-

Figura 9 - Focalização isoeletrica de hidrolases de membranas. Solubilizadas por Triton X-100: (A) ensaio com NPβGal, (B) ensaio com celobiose. Solubilizadas por papaína: (C) ensaio com NPβGal, (D) ensaio com celobiose. Perfis obtidos com outras preparações são muito semelhantes a esses. Ver detalhes em Material e Métodos.

Figura 10 - Perfis de sedimentação, em gradientes contínuos de glicérol, de hidrolases de membranas solubilizadas por Triton X-100 ou por papaína. As frações (0,2ml) foram coletadas a partir do fundo do tubo. Solubilizadas por Triton X-100: (A) ensaio com NPβGal, (B) ensaio com celobiose, (C) ensaio com NPβFuc. Solubilizadas por papaína: (D) ensaio com NPβGal, (E) ensaio com celobiose, (F) ensaio com NPβFuc. Marcadores de peso molecular: CAT, catalase de fígado bovino (PM 232000); H, hemoglobina bovina (PM 64500). Perfis obtidos com outras preparações são muito semelhantes a esses. Ver detalhes em Material e Métodos.

Figura 11 - Separação eletroforética em cilindro de poliacrilamida 9% de hidrolases de membranas. Solubilizadas por Triton X-100: (A) ensaio com NPβGal, (B) ensaio com celobiose. Solubilizadas por papaína: (C) ensaio com NPβGal, (D) ensaio com celobiose. Perfis obtidos com outras preparações são muito semelhantes a estes. Ver detalhes em Material e Métodos.

so molecular de 106400 ± 6600 , enquanto que aquela solubilizada em papaína, 64834 ± 6000 (Fig. 10). Os resultados apresentados nessa figura mostram ainda que a atividade sobre NP β Gal e NP β Fuc coincidem parcialmente com aquela sobre celobiase em ambas as preparações. Por outro lado, a atividade sobre NP β Gli coincide perfeitamente com a sobre celobiose nas duas preparações. Os dados permitem supor que a enzima responsável pela hidrólise de celobiose e pNP β Gli também hidrolisaria NP β Gal e NP β Fuc, embora outras enzimas também atacariam esses dois últimos substratos.

Os resultados das eletroforeses de celobiase solubilizada por detergente e por papaína (Fig. 11) confirmaram as observações que indicavam a existência de apenas uma espécie molecular de celobiase e que esta seria responsável por parte da hidrólise de NP β Gal.

3.9. Inativação térmica da celobiase solubilizada por detergente e por papaína

A inativação térmica da celobiase solubilizada por detergente e da celobiase solubilizada por papaína segue uma cinética de primeira ordem aparente por um período de tempo equivalente a pelo menos 3 meias-vidas (Fig. 12). Isso significa que é muito provável que exista apenas uma espécie molecular de celobiase nas duas preparações. Por outro lado, o fato da meia vida de inativação ser praticamente a mesma para as duas espécies de celobiase ($t_{1/2}$ celobiase em detergente = 17 min; $t_{1/2}$ celobiase em papaína = 14 min) sugere que a papaína não deve ter afetado de forma apreciável a região da molécula de celobiase responsável pela catálise.

Figura 12 - Inativação térmica da celobiase solubilizada por detergente (○) e por papaína (●) a 50°C, em tampão fosfato 50 mM pH 6,2. Os resultados são médias mais desvios padrões obtidos em duas determinações independentes.

3.10. Efeito do pH e da temperatura na celobiase solubilizada por papaína

O efeito do pH sobre a atividade da celobiase sugere a existência de um grupo desprotonado (cujo pK_a não foi possível de terminar) e um grupo protonado (pK_a 7,7) no sítio ativo da forma funcional da enzima, que apresenta um pH_{ótimo} em cerca de pH 6,2 (tampão citrato-fosfato 50mM) (Fig. 13). As descontinuidades das curvas em pH 6,75 correspondem à troca de tampões, devendo ser reputadas a efeitos dos ânions, cátions ou ainda das forças iônicas diferentes dos tampões usados.

Os resultados mostram ainda que K_m é independente de pH ao longo de todo o espectro de pHs. Isso é uma forte evidência a indicar que a celobiase opera em equilíbrio rápido e não em estado estacionário (cf. TIPTON & DIXON, 1979), isto é, a concentração do complexo enzima-substrato deve estar em equilíbrio com as concentrações da enzima e do substrato livres.

A energia de ativação da celobiase determinada em condições de saturação com o substrato entre 20 e 48°C é 12,8 Kcal/mol (Fig. 14).

3.11. Especificidade de substrato da celobiase purificada

A celobiase foi purificada submetendo-se a enzima solubilizada sob ação da papaína a uma centrifugação em gradiente de densidade. Alíquotas equivalentes às frações 17, 18 e 19 do gradiente E da Fig. 10 de vários gradientes foram reunidos e usadas como fonte de enzima.

A celobiase purificada hidrolisa β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos (Tabela IX) e não hidrolisa α -glicosídeos e α -galactosídeos (Tabela X).

Figura 13 - Efeito do pH sobre a estabilidade e sobre alguns parâmetros cinéticos da celobiase solubilizada por papaína. As amostras de enzimas foram incubadas a diferentes valores de pH em várias concentrações de celobiose e os V e K_m aparentes foram extrapolados a partir de plotes de Lineweaver-Burk. Os ensaios foram realizados a 30°C em tampões citrato-fosfato 50mM (o) ou tampões pirofosfato 50mM (●). Para a determinação da estabilidade ao pH, a enzima foi deixada por 2 h a 30°C em tampões de diferentes pHs, antes de ser diluída 10 vezes pela adição de tampão fosfato 0,1M pH 6,2, seguido por ensaios nessas condições (▲, tampão ácido bórico-NaOH, 0,1M).

Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da celobiase solubilizada por papaína. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se as amostras da enzima em tampão fosfato pH 6,2 (50mM) em diferentes temperaturas por 2 h antes de ensaiá-las. A linha reta do plote de Arrhenius foi ajustada aos pontos entre 21 e 48°C.

Celobiose e pNPβGli são hidrolisados pelo mesmo sítio a tivo, uma vez que pNPβGli é inibidor competitivo linear simples da reação da celobiase sobre celobiose e celobiose é inibidor com petitivo linear simples da reação da celobiase sobre pNPβGli (Fig. 15). Além disso, os valores de K_i do pNPβGli (0,40mM) e K_i da ce lobiose (0,73mM) concordam com os valores de seus respectivos K_m (0,53 e 0,61mM) (Tabela IX).

Afim de verificar se um mesmo sítio da celobiase é ca-
paz de hidrolisar β-glicosídeos, β-galactosídeos e β-fucosídeos
ou se, alternativamente, esses diferentes substratos são hidroli-
sados por sítios ou enzimas diferentes, estudos foram realizados
usando um método que envolve a competição entre dois substratos.

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 a s umindo condições de equilíbrio rápido, cf. SEGEL, 1975):

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

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.

A velocidade da reação de duas enzimas, cada uma catalisan-
do a hidrólise de um substrato diferente, será dada pela equação:

Tabela IX. - Especificidade de substrato da celobiase purificada de cecos gástricos*

Substrato	Km (mM)	V (nmoles/min)	V/Km
Celobiase	0,61 ± 0,08	1,51 ± 0,04	2,48 ± 0,39
ONPβGli	0,90 ± 0,17	2,75 ± 0,15	3,06 ± 0,74
pNPβGli	0,53 ± 0,09	1,00 ± 0,04	1,89 ± 0,39
pNPβFuc	0,50 ± 0,03	1,05 ± 0,06	2,09 ± 0,24
Salicina	0,80 ± 0,12	0,25 ± 0,01	0,31 ± 0,06
pNPβGal	5,3 ± 0,7	1,50 ± 0,12	0,28 ± 0,06
PβGli	3,5 ± 0,5	0,19 ± 0,01	0,05 ± 0,01

* Celobiase purificada (fração 17, 18, 19 do gradiente E, Fig. 10) foi incubada com cinco concentrações diferentes de cada carboidrato listado, em tampão fosfato 50mM, pH 6,2 a 30°C. Os parâmetros cinéticos (médias e desvios padrões) foram determinados usando uma regressão linear ponderada de acordo com WILKINSON (1961), com o auxílio de uma calculadora programável (Texas Instruments TI 59).

Tabela X. - Inibição por glicosídeos da celobiase purificada dos cecos gástricos*

Carboidrato	% Inibição	Carboidrato	% Inibição
Trealose	0,0	NP α Gli	48,6 $\pm$ 3,2
Melibiose	20,2 $\pm$ 3,8	Sacarose	51,0 $\pm$ 5,0
Maltose	44,8 $\pm$ 7,9		

* Celobiase purificada (fração 17, 18, 19 do gradiente E, Fig. 10) foi incubada com cada um dos carboidratos listados (15mM) com e sem celobiose (3mM) em tampão fosfato 50mM, pH 6,2 a 30°C. Nenhum dos carboidratos serviu de substrato para a celobiase ; ao contrário, eles a inibiram em diferentes graus. Os dados são médias mais desvios padrões de três determinações.

Tabela XI. - Competição entre substratos da celobiase purificada dos cecos gástricos*.

Substrato a (10mM)	Substrato b (10mM)	v calculada (nmoles/min)		v observada (nmoles/min)
		1 sítio	2 sítios	
PNP β Gli	NP β Gal	0,522	0,736	0,423 $\pm$ 0,039
PNP β Gli	NP β Fuc	0,313	0,742	0,281 $\pm$ 0,007

* Os substratos a e b foram adicionados juntos e incubados com celobiase purificada (frações 17, 18, 19 do gradiente E, Fig. 10) em tampão fosfato 50mM, pH 6,2 a 30°C. As v observadas correspondem às médias e desvios padrões obtidos de 3 determinações independentes. As velocidades para um e dois sítios foram calculadas a partir dos dados da Tabela IX, fazendo uso das equações apresentadas no texto.

Figura 15 - Competição de substratos da celobiase solubilizada por papaína: inibição da hidrólise de celbio- se por PNPβGII e inibição da hidrólise de PNPβGII por celbiose. Plotes de Lineweaver-Burk foram feitos para diferentes concentrações dos substratos-inibidores. Inserção, replote das inclinações calculadas dos plotes de $1/v$ versus a concentração do substrato-inibidor.

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

onde todos os termos tem o mesmo significado da equação anterior.

Os resultados obtidos com celobiase purificada (Tabela XI) indicam claramente que ela é capaz de hidrolisar β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos em um mesmo sítio.

3.12. Inibição da celobiase solubilizada com papaína por Tris e lactonas

Tris, δ -gliconolactona e δ -galactonolactona são inibidores competitivos lineares simples da celobiase (Fig. 16 e 17) . Tris é um mau inibidor ($K_i = 40\text{mM}$), galactonolactona é um bom inibidor ($K_i = 0,3\text{mM}$), enquanto que δ -gliconolactona é um inibidor excepcional, cujo K_i ($0,4\mu\text{M}$) é cerca de 3 ordens de grandeza menor do que o K_m da celobiase para qualquer de seus substratos. Por outro lado, o ácido glicônico não inibe a celobiase mesmo em concentrações 50 vezes maiores ($0,1\text{mM}$) que as utilizadas com δ -gliconolactona.

3.13. Configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase solubilizada por papaína

Os resultados apresentados na Fig. 18 mostram que a celobiase libera β -D-glicose, embora eles não possam excluir a possibilidade de ocorrer uma liberação conjunta de α -D-glicose. Em vista disso, pode-se assegurar que a hidrólise catalisada pela celobiase não envolve inversão de configuração, embora não se possa decidir se a reação ocorre com retenção total ou parcial de configuração.

Figura 16 - Inibição por Tris da celobiase solubilizada por papaína. Plotes de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de Tris; inserção, replote das inclinações calculadas dos plotes de Lineweaver-Burk contra a concentração de Tris. A força iônica nos ensaios foi mantida constante (250 mM) pela adição de quantidades adequadas de NaCl.

Figura 17 - Inibição por gliconolactona e galatonolactona da celobiase solubilizada por papaína. Plotes de Lineweaver-Burk foram feitos para diferentes concentrações dos inibidores. Inserção, replote das inclinações calculadas dos plotes de Lineweaver-Burk versus a concentração do inibidor.

Figura 18 - Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada pela celobiase solubilizada por papaína. A, D-glicose liberada pela celobiase. Após a anomerização (obtida por fervura) os resultados obtidos foram idênticos; B, α -D-glicose ; C, α -D-glicose após anomerização. As concentrações de glicose, e as demais condições experimentais, em B e C são semelhantes àsquelas em A. Ver detalhes em Material e Métodos.

4. DISCUSSÃO

4.1. O papel das arilamidases dos cecos de *R.americana*

Nossos dados não são suficientes para afirmar que as arilamidases do intestino médio de *R.americana* são aminopeptidases verdadeiras. Entretanto, é muito provável que elas o sejam se levarmos em consideração o fato de que todas as arilamidases de intestino médio estudadas até agora são aminopeptidases verdadeiras (WARD, 1975a, b, c; BAKER & WOO, 1981).

A atividade de arilamidase nas células do ventrículo é baixa (12,3% da atividade total do intestino médio); a maior parte encontra-se distribuída entre as células dos cecos (do total da atividade do intestino, 24,5% acha-se nas microvilosidades e 20% no citossol) e fluido ectoperitrófico (43,2% do total) (TERRA et al., 1979; FERREIRA & TERRA, 1980).

O fluido ectoperitrófico compreende o conteúdo luminal dos cecos e a película de fluido adsorvido externamente à membrana peritrófica (TERRA et al., 1979). O fato de 74,2% da atividade arilamidásica presente no tubo digestivo ser encontrado nos cecos (células e lúmen cf. TERRA et al., 1979) sugere que esse órgão seja o principal local da digestão intermediária e final de proteínas. Isto provavelmente é consequência do fluxo principal do fluido ectoperitrófico, que vai do ventrículo para os cecos (ver discussão no item 4.4). Esse fluxo carrega os peptídeos produzidos pela ação de proteínases sobre as proteínas do alimento, tão logo esses peptídeos tornem-se suficientemente pequenos para atravessar a membrana peritrófica.

As arilamidases do citossol das células dos cecos (com exceção da arilamidase 5) são encontradas no fluido ectoperitrófico e sua atividade nas células dos cecos é somente 14,6% da ativi

dade presente no tubo digestivo. Os cálculos foram feitos a partir das áreas sob os picos, do perfil eletroforético apresentado na Fig. 3b, e da atividade relativa encontrada no citossol das células dos cecos. Por outro lado, o conteúdo luminal dos cecos representa 43,2% da atividade total do tubo digestivo. Essas observações sugerem que as arilamidases do citossol das células dos cecos são enzimas em via de serem secretadas para o lúmen do tubo digestivo (com exceção da arilamidase 5) e, portanto, não devem ter uma função intracelular. Entretanto, a arilamidase 5, que corresponde a 27% da atividade arilamidásica do citossol (5,4% da atividade total do tubo digestivo) e não ocorre no fluido luminal, deve ter uma função intracelular. As arilamidases das microvilosidades dos cecos são muito ativas (24,5% da atividade total do tubo digestivo) e são diferentes das arilamidases luminais. É possível que elas tenham especificidades adequadas para completar a hidrólise de peptídeos iniciada pelas aminopeptidases luminais.

4.2. As células dos cecos gástricos de *R.americana*

A existência de um bordo em escova bem desenvolvido e de criptas profundas entre as células dos cecos gástricos resulta em um enorme aumento da superfície celular voltada para o lúmen. Esse fato, aliado à presença de grande número de mitocôndrias no citoplasma apical e das invaginações da membrana basal com mitocôndrias associadas, pode dar à célula a capacidade de transportar vários compostos (THREADGOLD, 1976). Por outro lado, as invaginações da membrana plasmática basal delimitam um compartimento extracelular com acesso restrito à hemolinfa (devido a existência de poucas aberturas para o espaço extracelular), o que possibilitaria à célula concentrar solutos nesse compartimento, criando um gradiente de pressão osmótica entre o compartimento e o lúmen, o que pode auxiliar na absorção de água (cf. BERRIDGE, 1970). Um

compartimento extracelular semelhante, presente no reto de insetos, está envolvido no transporte de água contra um gradiente de pressão osmótica (cf. BERRIGDE, 1970).

As microvilosidades dos cecos gástricos possuem uma ultraestrutura semelhante a das microvilosidades presentes nos enterocitos de mamíferos. Essas possuem um movimento de sobe e desce devido ao deslizamento dos seus microfilamentos centrais de actina em relação a microfilamentos de miosina presentes no citoplasma apical (MOOSEKER, 1976). Uma vez que há evidências da ocorrência de actina nos microfilamentos das microvilosidades dos cecos gástricos de *R.americana* (FERREIRA, 1979), é possível que essas microvilosidades tenham movimentos similares aos das microvilosidades de enterocitos. As microvilosidades dos cecos gástricos de *R.americana* e dos enterocitos de mamíferos são semelhantes entre si, não apenas ao nível estrutural, mas também funcionalmente, pois ambas desempenham papéis similares nos estágios finais da digestão. Assim, os dois tipos de microvilosidades apresentam hidrolases ligadas à membrana plasmática e que estão envolvidas na digestão terminal de carboidratos e proteínas. As diferenças importantes estão restritas à trealase, que é solúvel nesse inseto e ligada a membrana em mamíferos, e à carboxipeptidase, que só ocorre na forma solúvel em mamíferos e aparece solúvel e ligada à membrana em *R.americana* (BARNARD, 1973; FERREIRA & TERRA, 1980).

4.3. As células do ventrículo anterior e posterior de *R.americana*

As células do ventrículo anterior apresentam microvilosidades pouco desenvolvidas na face luminal e um sistema de invaginações da membrana basal muito desenvolvido e organizado, com mitocôndrias associadas. Essas invaginações, em contraste com aquelas das células dos cecos, apresentam muitas aberturas dispos

tas regularmente para o espaço extracelular subjacente, de modo semelhante ao que ocorre em células secretoras de água, como as células dos túbulos de Malpighi (BERRIDGE, 1970).

As células do ventrículo posterior, principalmente as da região distal, devem ter funções semelhantes às das células dos cecos gástricos, uma vez que possuem uma ultraestrutura e composição enzimática semelhantes. Um outro aspecto em que as células dos cecos gástricos e do ventrículo posterior distal são semelhantes entre si consiste na sua susceptibilidade a infecção por microsporídeos e por vírus (Prof. A.B. CUNHA, comunicação Pessoal). Apesar da grande semelhança entre esses dois tipos de células, algumas diferenças merecem ser mencionadas. Por exemplo, a quantidade de lipídeos e de retículo endoplasmático liso é muito maior nas células do ventrículo posterior do que nas células dos cecos. Essa observação serve de apoio à suposição de que essas células sejam o sítio de oxidação de carotenóides. Essa hipótese é decorrente das observações feitas aqui e de dados anteriores que mostraram que os carotenóides da hemolinfa de *R.americana* são derivados de β -caroteno da dieta, que é absorvido, armazenado em gotas de óleo e oxidado no intestino médio, sendo posteriormente ligado a proteína da hemolinfa (TERRA et al., 1980).

Outras diferenças entre as células de ventrículo posterior e as células do cecos são encontradas nas proporções relativas entre os carboidratos e peptidases presentes nas membranas das suas microvilosidades (ver discussão no ítem 4.4.).

4.4. Função dos cecos e do ventrículo em *R.americana*

Baseando-se na distribuição das enzimas digestivas entre os espaços endo- e ectoperitritrôficos e células do intestino médio, nas taxas de excreção das enzimas que penetram no espaço en-

doperitrófico e em outros dados, foi proposta a existência de uma circulação endo- ectoperitrófica das enzimas digestivas na larva de *R.americana* (TERRA & FERREIRA, 1981, ver também revisão na Introdução). Os dados ultraestruturais e bioquímicos obtidos nesta tese foram combinados em um modelo, mais refinado que o anteriormente proposto (TERRA & FERREIRA, 1981), para os fluxos no intestino médio de *R.americana* (Fig. 19).

Os dados bioquímicos e ultraestruturais obtidos nesta tese e que apoiam o modelo esquematizado na Fig. 19, assim como detalham aspectos específicos, são os seguintes:

a) Uma quantidade muito maior de proteínas (em relação à proteína celular total) é recuperada nas microvilosidades das células dos cecos e ventrículo posterior do que nas microvilosidades das células do ventrículo anterior. Isso concorda com a observação de que os cecos e o ventrículo posterior apresentam células semelhantes com microvilosidades longas (3,8 e 5,4µm, respectivamente) e densamente empacotadas, em contraste com as microvilosidades pequenas (0,6µm) e arranjadas irregularmente que são encontradas nas células ventriculares anteriores (ver itens 3.4 e 3.5).

b) As microvilosidades purificadas das células do ventrículo anterior e da região proximal do ventrículo posterior apresentam atividades muito baixas de hidrolases de oligômeros, o que sugere fortemente que elas não estão envolvidas na digestão terminal.

c) As microvilosidades purificadas das células dos cecos e do ventrículo posterior possuem alta atividade de hidrolases de oligômeros, o que sugere fortemente seu envolvimento na digestão terminal.

d) As microvilosidades das células do ventrículo pos

Figura 19 - 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 terminal e absorção do alimento.

terior proximal apresentam atividades específicas de hidrolases da mesma ordem de magnitude daquelas observadas nas microvilosidades do ventrículo anterior (Tabela VIII) . Esses dados, estão de acordo com a observação (Ítem 3.4 e 3.5) de que a região proximal do ventrículo posterior e o ventrículo anterior possuem células semelhantes.

e) A maior parte da atividade de hidrolases de oligômeros são encontradas nas microvilosidades dos cecos e, conseqüentemente, a maior parte da digestão terminal deve ocorrer nessas células. A maltase e as peptidases solúveis (responsáveis por cerca de 40% da atividade celular total) provavelmente não estão envolvidas na digestão terminal. A maltase solúvel é lisossômica e, provavelmente, está envolvida na digestão do glicogênio presente em corpos autofágicos formados durante a renovação dos constituintes celulares (cf. FERREIRA & TERRA, 1980). As aminopeptidases celulares solúveis parecem ser hidrolases em via de serem secretadas para o lúmen do tubo digestivo (ver ítem 4.1). O fato de que as carboxipeptidases encontram-se em quantidades consideráveis no fluido ectoperitrófico (cf. TERRA et al., 1979), favorece a hipótese que as carboxipeptidases intracelulares solúveis sejam enzimas em via de serem secretadas, como discutido acima em relação às aminopeptidases.

f) Uma vez que é muito pouco provável que digestão ao nível de membrana ocorra na superfície de uma célula envolvida em secreção de água (o substrato seria continuamente arrastado para longe da enzima), pode-se supor que os cecos gástricos e o ventrículo posterior estejam envolvidos em absorção. Por outro lado, o ventrículo anterior (que praticamente não possui enzimas digestivas) secretaria água. Nesse sentido, é interessante notar que os dados ultraestrú

turais mostram que as células dos cecos gástricos e do ventrículo posterior são semelhantes entre si e que ambas diferem das células do ventrículo anterior. Além disso, uma inspeção nas invaginações da membrana basal dessas células levaram a sugestão de que as células do ventrículo anterior seriam secretoras, enquanto as células dos cecos gástricos e do ventrículo posterior seriam absorptivas. Desde que a capacidade dos cecos gástricos para transportar fluido do lúmen para a hemolinfa é muito maior que a região com dobramentos do ventrículo (a superfície transportadora nos cecos gástricos é muito maior do que no ventrículo posterior), o principal fluxo de fluido no espaço ectoperitrófico deve ocorrer do ventrículo para os cecos. Contudo, deve haver também um fluxo menor de fluido da região proximal do ventrículo posterior para a região com dobramentos do ventrículo posterior. O fluxo principal de fluido ectoperitrófico (do ventrículo para os cecos) é o responsável pela circulação endo-ectoperitrófica das enzimas digestivas, que responde pelas baixas velocidades de excreção de enzimas (TERRA & FERREIRA, 1981). Entretanto, as enzimas que permanecerem no espaço endoperitrófico da região posterior do ventrículo são provavelmente excretadas, uma vez que elas não podem ser alcançadas pelo fluxo principal de fluido.

g) Apesar das atividades das hidrolases de oligômeros serem maiores nas células dos cecos do que em qualquer outra região do intestino médio (o que é uma consequência do número de microvilosidades ser maior nos cecos do que no ventrículo posterior), as microvilosidades purificadas das células dos cecos são mais ricas em peptidases e mais pobres em oligossacaridases do que as microvi-

losidades purificadas das células do ventrículo posterior. Esses dados estão de acordo com a observação de que a circulação endo- ectoperitrófica é mais eficiente para a tripsina do que para a amilase e a celulase (cf. TERRA & FERREIRA, 1981). Essa maior eficiência na circulação endo- ectoperitrófica da tripsina deve ser, provavelmente, consequência de uma digestão mais rápida das proteínas, que logo produz oligopeptídeos capazes de sair da membrana peritrófica, em contraste com uma digestão mais lenta de carboidratos, que produziria oligossacarídeos passíveis de atravessar a membrana periférica somente na região mais posterior do ventrículo (cf. TERRA & FERREIRA, 1981; discussão acima).

4.5. A função dos cecos do intestino médio e de estruturas semelhantes nos insetos

Os cecos gástricos são evaginações do ventrículo que podem variar em número e posição ao longo do intestino médio nos diferentes insetos. Principalmente entre as ordens Ortopteróides (Fig. 20), e em larvas de Diptera, há evidências de que os cecos (que nesses insetos localizam-se perto do esôfago, Fig. 21) desempenham um papel importante na digestão e absorção (revisão em WIGLESWORTH, 1972; TERRA et al., 1979; FERREIRA & TERRA, 1980, Introdução). Como esses insetos apresentam uma membrana peritrófica, os cecos só podem estar envolvidos na digestão intermediária e final, pois somente as moléculas poliméricas parcialmente digeridas vão poder passar através dessa membrana e alcançar os cecos (cf. TERRA et al., 1979). Em vista disso, uma importante questão deve ser colocada. Porque um órgão, envolvido em digestão terminal e absorção, estaria localizado na região anterior do intestino médio e não na sua porção terminal, que seria uma a posição mais

Figura 20 - Árvore filogenética de algumas ordens de insetos. Segundo ROSS (1965).

Figura 21 - Tipos anatômicos principais do tubo digestivo dos insetos. A, Orthoptera: Acrididae (ninha e adulto) redesenhado de SNODGRASS (1935); B, Hemiptera: Heteroptera (ninha e adulto) redesenhado de RICHARDS & DAVIES (1977); C, Coleoptera: Scarabaeidae (larva) redesenhado de SNODGRASS (1935), D, Coleoptera: Carabidae (larva) redesenhado de RICHARDS & DAVIES (1977); E, Lepidoptera: Sphingidae (larva) redesenhado de RICHARDS & DAVIES (1977).

"lógica"? Uma explicação poderia ser a de que os cecos teriam se originado como evaginações do intestino médio anterior envolvidos em absorção de água. Essas células, agindo coordenadamente com as do ventrículo posterior, poderiam gerar um fluxo de fluido do ventrículo posterior para os cecos, permitindo a existência de uma circulação endo- ectoperitritrófica de enzimas. Essa circulação parece ser responsável pela baixa taxa de excreção de enzimas digestivas em *R.americana* e também pelo transporte de alimento parcialmente digerido para os cecos (ver acima). A digestão intermediária ocorre no lúmen dos cecos e a digestão terminal na superfície das microvilosidades de suas células (TERRA et al., 1979; TERRA & FERREIRA, 1981; FERREIRA & TERRA, 1980, ver também acima).

Nesse sentido, é interessante notar que insetos mais primitivos que *R.americana*, como os Orthoptera (Fig. 20), tem digestão terminal e absorção nos cecos (cf. WIGGLESWORTH, 1972), sem possuir enzimas ligadas à membrana plasmática e que estejam envolvidas na digestão terminal (cf. DROSTE & ZEBE, 1974). Além disso, cinco meses após termos proposto a existência em *R.americana* de uma circulação de enzimas e fluidos no intestino médio, na sua primeira versão (TERRA & FERREIRA, 1981), uma circulação de fluidos similar foi proposta em um Orthoptera (DOW, 1981).

Os cecos dispostos em três séries anulares ao longo do ventrículo (p.e. larva de Scarabaeidae, Fig. 21) devem ter funções similares aqueles localizados próximo ao esôfago. Outros tipos de cecos provavelmente não tem função digestiva. Assim, os cecos localizados na região posterior do ventrículo de espécies de Hemiptera Heteroptera (Fig. 21) sugadores de seiva (que perderam a câmara de filtração especializada que ocorre nos Homoptera) são órgãos excretores de água não tendo importância na digestão (GOODCHILD, 1963). Os pequenos divertículos papiliformes, frequentemente também chamados de cecos, que cobrem grande parte do ventrículo dos

Coleoptera predadores (Fig. 21), são criptas de células regenerativas, e não cecos verdadeiros (SNODGRASS, 1935).

4.6. Aspectos físico-químicos da celobiase de *R.americana*

As dissacaridases intestinais de membrana melhor estudadas são as de mamíferos. Nesses organismos, essas enzimas possuem geralmente duas subunidades de peso molecular entre 140.000 e 240.000 cada e um segmento ancorador hidrofóbico de baixo peso molecular (de 3.500 a 4.500) contínuo a uma ou às duas subunidades (ver KENNY & MAROUX, 1982 e Introdução).

Até o presente não existem dados sobre dissacaridases ligadas a membranas plasmáticas de células intestinais de insetos, além dos apresentados nesse trabalho.

A papaína reduz o peso molecular aparente da celobiase dos cecos gástricos de *R.americana* de 106.000 para 65.000, sem mudar os parâmetros catalíticos da enzima ou sua estabilidade em relação ao pH e temperatura. Esses dados sugerem que a papaína separa uma região catalítica e hidrofílica da celobiase de uma região catalítica e presumivelmente hidrofóbica, responsável pela inserção da enzima na membrana plasmática das microvilosidades. O peso molecular do presumido segmento ancorador hidrofóbico, juntamente com o detergente a ele associado, seria de 41.000. Este peso molecular é semelhante ao que tem sido encontrado em estudos análogos realizados com enzimas de mamíferos, nos quais foi demonstrado que a maior parte desse peso é devido ao detergente, o peptídeo ancorador contribuindo com apenas 3.500 a 4.500 unidades de peso molecular (cf. KENNY & MAROUX, 1982). É possível que o mesmo ocorra com a celobiase de *R.americana*.

4.7. Especificidade, inibição e mecanismo da celobiase de *R.america*

A celobiase purificada em gradientes de densidade, após solubilização por ação de papaína, hidrolisa β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos e não hidrolisa α -glicosídeos e α -galactosídeos. Experimentos de competição entre substratos mostraram que os β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos são hidrolisados em um mesmo sítio ativo. Isso apóia a afirmação de que a celobiase possui uma especificidade ampla e que os diferentes glicosídeos não estão sendo hidrolisados por enzimas diferentes, contaminantes, presentes na preparação de celobiase.

Os valores de K_i do pNP β Gli (0,4mM), em uma reação onde celobiose é o substrato, e o K_i de celobiose (0,73mM), em uma reação onde pNP β Gli é o substrato, concordam com os valores de seus respectivos K_m s (0,53 e 0,61mM). Como os K_i s de inibidores competitivos lineares simples são as constantes de dissociação verdadeiras dos complexos enzima-inibidores (cf. SEGEL, 1975), o fato deles concordarem com os respectivos K_m s sugere fortemente que esses K_m s são na realidade K_s s, isto é, constantes de dissociação dos complexos enzima-substrato. Em outras palavras, a celobiase deve operar segundo uma cinética de equilíbrio rápido, e não de estado estacionário, como já foi sugerido acima a partir da constância observada do K_m em relação ao pH.

A inibição da celobiase por Tris foi estudada porque Tris é conhecido como bom inibidor competitivo de dissacaridases desde muito tempo (LARNER & GILLESPIE, 1956; WALLENFELS & FISCHER, 1960). Os valores do K_i de Tris para as dissacaridases intestinais de mamíferos são de regra inferiores a 1mM (cf. SEMENZA & von BALTHAZAR, 1974). Entretanto, no caso da celobiase intestinal de *R.americana*, Tris é um mau inibidor (K_i =40mM).

O fato da hidrólise da ligação glicosídica catalisada pela celobiase ocorrer sem inversão de configuração elimina os mecanismos do tipo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), deixando as possibilidades (LEGLER, 1975): (1) um mecanismo com um íon carbonium intermediário capaz de ser atacado pela água por um lado só (isto é, um ataque frontal) ou por ambos lados; (2) qualquer mecanismo que envolva um número par de substituições no C_1 do glicosídeo, formando um intermediário enzima-substrato covalente (Fig. 22).

O mecanismo 2 (Fig. 22) 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 IX 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 já mencionadas que indicam que o complexo enzima-substrato está em equilíbrio com a enzima e substrato livres apoiam a hipótese de que o passo limitante da reação é a saída do aglicone.

O mecanismo 1 (Fig. 22) concorda com os dados experimentais que indicam que o passo limitante da reação é a saída do aglicone, além de explicar a excepcional inibição da celobiase por δ -gliconolactona, como será discutido com detalhes a seguir.

Nos termos da teoria do estado de transição, a catálise enzimática é consequência do fato de que a enzima liga o estado de transição da reação não enzimática correspondente mais fortemente do que o próprio substrato (WOLFENDEN, 1972; LIENHARD, 1973). Assim, análogos do estado de transição, isto é, compostos cujos complexos estáveis com a enzima assemelham-se em estrutura ao estado de transição formado durante a reação, devem ser excelentes inibi

Figura 22 - Possíveis mecanismos de catálise de β -glicosidases que levam a retenção na configuração da glicose. No caminho 1, a catálise ocorreria com a formação de um íon carbônio intermediário, que pode ser atacado estereoespecificamente pela água. No caminho 2, a catálise envolveria a formação de um intermediário enzima-substrato covalente.

dores da catálise enzimática (WOLFENDEN, 1972; LIENHARD, 1973) . Dessa forma, o fato da δ -gliconolactona (mas não ácido glicônico) ligar-se à celobiase, com uma afinidade várias ordens de grandeza maior do que qualquer de seus substratos, sugere que a lactona é um análogo do estado de transição formado durante a catálise. Como a δ -gliconolactona apresenta uma conformação planar na região formada pelos átomos C_2-C_1-O (C_5) (LEVY & SNAITH, 1972), e por isso assume uma conformação em meia cadeia (sofá), o mesmo seria esperado do estado de transição formado durante a reação da celobiase. De acordo com as previsões, o íon carbonium formado no caminho 2 (Fig. 22) apresenta uma conformação em meia cadeia similar à da δ -gliconolactona (cf. LEVY & SNAITH, 1972).

O fato de que lactonas correspondentes aos substratos de enzimas, para as quais existem fortes evidências da ocorrência de um estado de transição tipo carbonium, sejam fortes inibidores dessas enzimas, reforça a argumentação acima (p.ex., lisozima, SECEMSKI et al., 1972).

A galactonolactona possui um K_i cerca de 10 vezes menor que o K_m dos β -galactosídeos, o que sugere que os β -galactosídeos são hidrolisados pela celobiase de *R.americana* por um mecanismo similar ao discutido acima para os β -glicosídeos, além de estar de acordo com a discussão precedente que propõe que os β -galactosídeos são hidrolisados pelo mesmo sítio da celobiase que hidrolisa os β -glicosídeos.

5. RESUMO

Os cecos gástricos de *Rhynchosciara americana* e de outros insetos são órgãos envolvidos em digestão terminal e/ou absorção de nutrientes. Devido a isso, a sua disposição na região anterior do ventrículo é intrigante. Uma explicação para essa localização seria a existência de uma circulação endo-ectoperitrónica de fluidos e de enzimas digestivas, como foi proposto anteriormente em *R. americana*. Afim de procurar reforçar o modelo proposto procurou-se obter dados sobre a ultraestrutura das células do tubo digestivo e sobre a composição enzimática de suas microvilosidades.

As células dos cecos e do ventrículo posterior distal tem uma ultraestrutura bastante semelhante; elas possuem grandes microvilosidades apicais e a membrana plasmática basal apresenta invaginações com mitocôndrias associadas, embora a maioria dessas organelas sejam encontradas no citoplasma apical. O compartimento extracelular delimitado por essas invaginações da membrana basal apresenta poucas aberturas para a hemolinfa, o que dá à célula a possibilidade de concentrar solutos nesse compartimento. As células do ventrículo anterior possuem microvilosidades apicais muito pequenas e um sistema elaborado de invaginações da membrana basal, com muitas mitocôndrias associadas, e que se estendem até quase o ápice das células. O compartimento extracelular delimitado por essas invaginações apresenta, nessas células, grande número de aberturas para a hemolinfa. O ventrículo posterior proximal representa uma região de transição entre o ventrículo anterior e o ventrículo posterior distal. A ultraestrutura dos cecos e ventrículo posterior distal é coerente com uma função na absorção de fluidos, enquanto que aquela do ventrículo anterior é coerente com uma função de secreção de fluidos.

A análise da composição de enzimas nas microvilosidades das diferentes regiões do intestino médio mostrou novamente que as células dos cecos e do ventrículo posterior distal são semelhantes e também que devem estar envolvidas na digestão terminal dos nutrientes, pois possuem alta atividade específica para hidrolases de oligômeros. As células do ventrículo anterior (e do ventrículo posterior proximal) possuem microvilosidades com atividade específica muito baixa para as hidrolases de oligômeros, como seria de esperar para uma célula que estivesse secretando fluidos, pois o substrato seria continuamente arrastado para longe da enzima. Os dados obtidos permitiram reforçar e refinar o modelo da circulação endo-ectoperitritrôfica de enzimas em *R.americana*.

Para melhor compreensão da digestão terminal de proteínas em *R.americana*, aminopeptidases de diferentes regiões do tubo digestivo foram estudadas. As aminopeptidases do lúmen e do citossol das células dos cecos são semelhantes, e ambas diferem daquelas presentes na membrana plasmática dessas células. Os dados obtidos apoiam a hipótese de que a maioria das aminopeptidases solúveis nas células dos cecos são enzimas em via de serem secretadas para o lúmen e somente uma quantidade muito pequena pode ter uma função intracelular.

Para iniciar o estudo das propriedades das enzimas envolvidas na digestão terminal, a celobiase ligada a membrana plasmática dos cecos foi escolhida.

A celobiase solubilizada por Triton X-100 apresenta um peso molecular de 106.000 e um pI de 5,4, enquanto que a solubilização por papaína resulta em uma molécula com peso molecular de 65.000 e um pI de 4,7. A celobiase solubilizada por papaína e purificada por centrifugação em gradientes de densidade hidrolisa β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos em um mesmo sítio ativo. Com base na comparação entre os K_{is} e os K_{ms} para celobio

se e para pNP β Gli e na constância do K_m obtido em diferentes pHs, tem-se uma forte evidência que essa enzima opera segundo uma cinética de equilíbrio rápido e não de estado estacionário. O fato da hidrólise da ligação β -glicosídica ocorrer sem inversão da configuração, ocorrer uma grande inibição da celobiase pela δ -gluconolactona e substituintes do radical aglicone influenciarem a constante catalítica sugere que, no mecanismo de catálise da celobiase, há formação de um íon carbônium intermediário e que não há formação de um complexo covalente enzima-substrato.

6. ABSTRACT

The gastric caeca of *Rhynchosciara americana* and other insects are involved in terminal digestion and/or absorption of nutrients. Due to that, their occurrence near the oesophagus is puzzling. One explanation for this should be the existence of an endo- ectoperitrophic circulation of fluids and digestive enzymes as previously proposed for *R.americana*.

In order to support the proposed model of endo- ectoperitrophic circulation of digestive enzymes, fine structural and enzymological data on the midgut cells were obtained.

Midgut caecal and distal posterior ventricular cells have a similar ultrastructure characterized by large apical microvilli and a basal plasma membrane infolded with associated mitochondria which are, nevertheless, more conspicuous in the apical cytoplasm. The fact that the basal plasma membrane infoldings constitute an extracellular compartment, with few openings into the underlying extracellular space, should permit the cell concentrate solutes in that compartment. The anterior ventricular cells possess small microvilli disposed in the cell apexes and elaborate mitochondria-associated basal plasma membrane infoldings extending almost to the tips of the cells. These infoldings display regular openings into the underlying extracellular space. The proximal posterior ventriculus represents a transition region between the anterior ventriculus and the distal posterior ventriculus. The fine structure of caeca and distal posterior ventricular cells is in accordance to their presumed function in fluid absorption, whereas the fine structure of anterior ventricular cells suggests a function in fluid secretion. Hydrolase assays in microvilli samples prepared from cells of different midgut regions showed that caeca and distal

posterior ventricular cells are alike in displaying high specific activities for digestive enzymes, suggesting a role in terminal digestion. In contrast, very low specific activities of digestive enzymes were found in anterior ventricular cells, in accordance to their proposed function in fluid secretion. The results lend support to the model of the endo- ectoperitrophic circulation of digestive enzymes in *R.americana*.

In order to extend our knowledge on protein terminal digestion, the aminopeptidases from cytosol and lumen were found to be similar and to differ from caecal microvillar aminopeptidases. The data support the assumption that the majority of the soluble aminopeptidases from the caecal cells are enzymes en route to their being secreted and only a minor amount would have a typical intracellular function.

Caecal plasma membrane-bound cellobiase was chosen to initiate a detailed study of the properties of the enzymes involved in terminal digestion.

The Triton X-100-solubilized cellobiase displays a molecular weight of 106.00 and a pI of 5.4, whereas the papain-treated cellobiase shows a molecular weight of 65.000 and a pI of 4.7. The papain-solubilized cellobiase, after being purified by density gradient centrifugation, hydrolyze β -glucosides, β -galactosides and β -fucosides in the same active site. The cellobiase seems to operate according to a rapid equilibrium kinetics, since the K_m for cellobiose is constant over a wide range of pHs and the K_m for cellobiose and pNP β Glu are identical to their K_i s in a experiment of competition between substrates. The hydrolysis of the β -glucosidic bound occurs without inversion of configuration, δ -gluconolactone is a strong inhibitor of cellobiase and substituents in the substrate aglycone affects the catalytic constant of the reaction. These data support the

assumption that the mechanism of the reaction catalysed by cellobiase involves the intermediary formation of a carbonium ion, instead of a glucosyl-enzyme intermediate.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnard, E.A. (1973). Comparative biochemistry of digestive enzymes. In Comparative Animal Physiology (Ed. By Prosser C.L.) pp. 139-146. Saunders, Philadelphia.
- Baker, J.E. (1981). Isolation and properties of digestive carboxypeptidases from midguts of larvae of the black carpet beetle Attagenus megatoma. Insect Biochem 11, 583-592.
- Baker, J.E. & Woo, S.M. (1981). Properties and specificities of a digestive aminopeptidase from larvae of Attagenus megatoma (Coleoptera: Dermestidae). Comp. Biochem. Physiol. 69B, 189-194.
- Benajiba, A. & Maroux, S. (1980). Purification and characterization of an aminopeptidase A from hog intestinal brush-border membrane. Eur. J. Biochem. 107, 381-388.
- Berridge, M. (1980). A structural analysis of intestinal absorption. In Insect Ultrastructure (Eds. by Neville, A.C.). Symp. R. Ent. Soc. London. 5, 135-151.
- 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, 1815-1820.
- Brunner, J.; Hauser, H.; Braun, H.; Wilson, K.J.; Wacker, H.; O'Neill, B. & Semenza, G. (1979). A mode of association of the enzyme complex sucrase-isomaltase with the intestinal brush border membrane. J. biol. chem. 254, 1821-1828.
- Buonocore, V.; Poerio, E.; Silano, V. & Tomasi, M. (1976). Physical and catalytical properties of α -amylase from Tenebrio molitor. L. larvae. Biochem. J. 153, 621-625.

- 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.
- Coiro, J.R.R.; Weige, D.R.; Kisielius, J.; Menezes, H. & Bilotta, J. A.T. (1972). A new embedding medium (Polylite 8001) for biological material. Cienc. Cult. 24, 660-662.
- Crane, R.K. (1968). A concept of the digestive absorptive surface of the small intestine. In Handbook of Physiology. (Ed. by Code, C.F.) Vol. 5, Alimentary Canal Section 6, pp. 2535-2542, Amer. Physiol. Soc. Washington.
- Dadd, R.H. (1970). Digestion in insects. In Chemical Zoology. (Ed. by Florkin, M. & Scheer, B.T.) Vol. 5, Arthropoda Part A, pp. 117-145, Academic Press, New York.
- Dahlman, D.L. (1971). Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larval. J. Insect Physiol. 17, 1677-1687.
- Dahlqvist, A. (1968). Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 22, 99-107.
- Derr, R.F. & Randall, D.D. (1966). Trehalase of the differential grasshopper, Melanoplus differentialis. J. Insect Physiol. 12, 1105-1114.
- Desnuelle, P. (1979). The tenth Sir Hans Krebs lecture. Intestine and renal aminopeptidase: a model of a transmembrane protein. Eur. J. Biochem. 101, 1-11.
- Doumeng, C. & Maroux, S. (1979). Aminotripeptidase a cytosol enzyme from rabbit intestinal mucosa. Biochem. J. 177, 801-808.
- Dow, J.A. (1981). Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. J. Insect Physiol. 27, 579-585.

- Droste, H.J. & Zebe, E. (1974). Carbohydrasen und Kohlenhydratverdauung in Darmtrakt von Locusta migratoria J. Insect Physiol. 20, 1639-1657.
- 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, 604-617.
- Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-278.
- 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.
- Evans, W.A.L. & Payne, D.W. (1964). Carbohydrases of the alimentary tract of the desert locust, Schistocerca gregaria. Forsk. J. Insect Physiol. 10, 657-674.
- Ferracci, H. & Maroux, S. (1980). Rabbit intestinal aminopeptidase N: Purification and molecular properties. Biochim. Biophys. Acta. 599, 448-463.
- Ferreira, C. (1979). Digestão terminal em Rhynchosciara americana. Dissertação de Mestrado, 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, 467-473.
- Fersht, A. (1977). Enzyme structure and mechanism. Freeman, San Francisco.

- Fink, D.E. (1932). The digestive enzymes of the colorado potato beetle and the influence of arsenicals on their activity. J. Agric. Res. 45, 471-482.
- Freeman, M.A. (1967). Proteolytic enzymes of the crop fluid from Locusta migratoria. L. Comp. Biochem. Physiol. 20, 1013-1015.
- Friedman, S. (1980). The purification and properties of trehalase isolated from Phormia regina, Meig. Arch. Biochem. Biophys. 87, 252-258.
- 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, 315-322.
- Giebel, P.E. & Domnas, A.J. (1976). Soluble trehalases from larvae of the mosquito, Culex pipiens, and the fungal parasite, Lagenidium giganteum. Insect Biochem. 6, 303-311.
- Goodchild, A.J.P. (1963). Studies on the functional anatomy of the intestines of Heteroptera. Proc. Zool. Soc. Lond. 141, 851-910.
- 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, 1950-1959.
- Gorvel, J.P.; Benajiba, A. & Maroux, S. (1980). Purification and characterization of the rabbit intestinal brush-border aminopeptidase A. Biochim. Biophys. Acta. 615, 271-274.
- Guilloux, E.; Cortois, J.E. & Percheron, F. (1968). Étude d'une tréhalase purifiée extraite du hanneton (Melolontha vulgaris). Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1915-1931.

- 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, 155-164.
- Hestrin, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.* 180, 249-261.
- Hopsu, U.K.; Mäkinen, K.K. & Glenner, G.G. (1966). Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: aminopeptidase B. *Archs. Biochem. Biophys.* 114, 557-566.
- House, H.L. (1974). Digestion. In The physiology of insecta. (Ed. by Rockstein, M.) 2nd ed. V.5, pp. 63-117, Academic Press, New York.
- 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, 1155-1164.
- 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, 153-164.
- Huber, R.E. & Thompson, D.J. (1973). Studies on a honey bee sucrase exhibiting unusual kinetics and transglucolytic activity. *Biochemistry* 12, 4011-4020.
- 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, 419-428.

- Kalf, G.F. & Rieder, S.V. (1958). The purification and properties of trehalase. J. biol. chem. 230, 691-698.
- Katagiri, C. (1979). α -D-glucosidase in the midgut of the American cockroach, Periplaneta americana. Insect Biochem. 9, 205-209.
- Keilin, D. & Hartree, E.F. (1972). Specificity of glucose oxidase (Notatin). Biochem. J. 50, 331-341.
- Kenny, A.J. & Booth, A.G. (1978). Microvilli: their ultrastructure, enzymology and molecular organization. Essays Biochem. 14, 1-44.
- Kenny, A.J. & Maroux, S. (1982). Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. Physiol. Reviews. 62, 91-128.
- 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 -170.
- Kim, Y.S. & Brophy, E.J. (1976). Rat intestinal brush border membrane peptidases. I. Solubilization, purification, and physicochemical properties of two different forms of the enzyme. J. Biol. Chem. 251, 3199-3205.
- Kim, Y.S.; Kim, Y.W. & Sleisenger, M.H. (1974). Studies on the properties of peptide hydrolases in the brush-border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. Biochim. Biophys. Acta. 370, 283-296.
- Lara, F.J.S.; Tamaki, H. & Pavan, C. (1965). Laboratory culture of R. angelae. Am. Nat. 99, 189-191.
- Larner, J. & Gillespie, R.E. (1956). Gastrointestinal digestion of starch. II. Properties of the intestinal carbohydrases. J. Biol. Chem. 223, 709-726.

- Lasker, R. & Giese, A.C. (1956). Cellulose digestion by the silverfish Ctenolepisma lineata. J. exp. Biol. 33, 542-553.
- 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, 403-409.
- Levy, G.A. & Snaith, S.M. (1972). The inhibition of glycosidases by aldonolactones. Adv. Enzymol. 36, 151-181.
- Lienhard, G.E. (1973). Enzymatic catalysis and transition-state theory. Science 180, 149-154.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, J.J.; Farr, A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the fenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Marques, M.D. (1976). Aspectos anatômicos e fisiológicos dos estágios imaturos de Rhynchosciara americana (Wiedemann, 1821). (Diptera, Sciaridae), Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Maroux, S. & Louvard, D. (1976). On the hydrophobic part of aminopeptidase and maltases which bind the enzyme to the intestinal brush border membrane. Biochim. Biophys. Acta. 419, 189-195.
- Maroux, S.; Louvard, D. & Baratti, J. (1973). The aminopeptidase from hog intestinal brush border. Biochim. Biophys. Acta. 321, 282-295.
- 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, 1453-1455.

- 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, 1372-1379.
- Marzluf, G.A. (1969). Studies of trehalase and sucrase of Drosophila melanogaster. *Archs. Biochem. Biophys.* 134, 8-18.
- Miller, J.W.; Kremer, 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, 117-129.
- Moosecker, M.S. (1976). Brush border motility. Microvillar contraction in Triton-treated brush borders isolated from intestinal epithelium. *J. Cell. Biol.* 71, 417-433.
- Morgan, M.R.J. (1975a). Initial characterization of the gut cellobiase of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides. *Insect. Biochem.* 5, 251-264.
- Morgan, M.R.J. (1975b). Initial characterization of the gut lactase of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides. *Insect. Biochem.* 5, 479-487.
- Morgan, M.R.J. (1975c). Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl β -glucosidase, and aryl β -galactosidase activities of Locusta migratoria. *Insect Biochem.* 5, 609-617.
- Morgan, M.R.J. (1976). Gut carbohydrases in locusts and grasshoppers. *Acrida* 5, 45-58.

- Nicholson, J.A. & Kim, Y.S. (1975). A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Analyt. Biochem.* 63, 110-117.
- Norén, O.; Sjöström, H. & Josefsson, L. (1973). Studies on a soluble dipeptidase from pig intestinal mucosa. I. Purification and specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* 327, 446-456.
- Podoler, H. & Applebaum, S.W. (1971). The α -amylase of the beetle Callosobruchus chinensis : Purification and properties. *Biochem. J.* 121, 317-320.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.
- Richards, A.G. & Richards, P.A. (1977). The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22, 219-240.
- Richards, O.W. & Davies, R.G. (1977). Imm's General textbook of entomology, 10th edn. Chapman, London.
- Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archs. Biochem. Biophys.* 67, 10-15.
- Ross, H.H. (1965). A textbook of entomology, 3th edn. John Wiley & Sons, New York.
- 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 silkworm, Bombyx mori: purification and properties of the enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* 48, 101-109.

- Secemski, I.I.; Lehrer, S.S. & Lienhard, G.E. (1972). A transition state analog for lysozyme. *J. Biol. Chem.* 247, 4740-4748.
- 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, 136-141.
- Segel, I.H. (1975). *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley & Sons, New York.
- Semenza, G. & von Balthazar, A.K. (1974). Steady-state kinetics of rabbit-intestinal sucrase. Kinetic mechanism, Na^+ activation, inhibition by Tris (hydroxymethyl) aminomethane at the glucose subsite. *Eur. J. Biochem.* 41, 149-162.
- Semenza, G.; Curtis, H.C.; Raunhardt, O.; More, P. & Müller, M. (1969). The configurations at the anomeric carbon of the reaction products of some digestive enzymes. *Carbohydr. Res.* 10, 417-428.
- Sjöström, H.; Norén, O.; Christiansen, L.; Wacker, H. & Semenza, G. (1980). A fully active, two-active-site, single-chain sucrase-isomaltase from pig small intestine. Implications for the biosynthesis of a mammalian integral stalked membrane protein. *J. Biol. Chem.* 255, 11332-11338.
- Sjöström, H.; Norén, O. & Josefsson, L. (1973). Purification and specificity of pig intestinal prolidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 327, 457-470.

- Skovbjerg, H.; Sjöström, H. & Norén, O. (1981). Purification and characterization of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur. J. Biochem.* 114, 653-661.
- Snodgrass, R.E. (1935). Principles of Insect Morphology. McGraw-Hill, New York.
- Sterchi, E.E. & Woodley, J.F. (1980). Peptide hydrolases of the human small intestinal mucosa: distribution of activities between brush border membranes and cytosol. *Clin. Chim. Acta.* 102, 49-56.
- Terra, W.R. & De Bianchi, A.G. (1975). Rate of cocoon production by the larva of the fly Rhynchosciara americana and storage sites of precursors. *J. Insect Physiol.* 21, 1547-1550.
- Terra, W.R., De Bianchi, A.G.; Gambarini, A.G. & Lara, F.J.S. (1973). Haemolymph amino acids and related compounds during cocoon production by the larvae of the fly Rhynchosciara americana. *J. Insect Physiol.* 19, 2097-2160.
- 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, 325-331.
- Terra, W.R.; Ferreira, C. & De Bianchi, A.G. (1975). Distribution of nutrient reserves during spinning in tissues of the larva of the fly, Rhynchosciara americana. *J. Insect Physiol.* 21, 1501-1509.
- 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, 201-209.

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, 131-141.

Terra, W.R.; Ferreira, C. & De Bianchi, A.G. (1979). Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of Rhynchosciara and its physiological significance. J. Insect Physiol. 25, 487-494.

Terra, W.R.; Ferreira, C. & De Bianchi, A.G. (1980). Carotenoids from midgut and from haemolymph proteins of Rhynchosciara (Diptera: Sciaridae) and their metabolic implications. Comp. Biochem. Physiol. 66B, 491-497.

Threadgold, L.T. (1976). The Ultrastructure of the Animal Cell. Pergamon, Oxford.

Tipton, K.F. & Dixon, H.B.F. (1979). Effects of pH on enzymes. Meth. Enzymol. 63, 183-234.

Turunen, S. (1979). Digestion and absorption of lipids in insects. Comp. Biochem. Physiol. 63A, 455-460.

Ugolev, A.M. & De Laey, P. (1973). Membrane digestion. A concept of enzymic hydrolysis on cell membranes. Biochim. Biophys. Acta. 300, 105-128.

Wacker, H.; Jaussi, R.; Sonderegger, P.; Dokow, M.; Ghera, P.; Hauri, H.P.; Christen, P. & Semenza, G. (1981). Cell-free synthesis of the one-chain precursor of a major intrinsic protein complex of the small-intestinal brush border membrane (pro-sucrase-isomaltase). Febs. Lett. 136, 329-332.

- Wallenfels, K. & Fischer, J. (1960). Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme. X. Die Lactase des Kälberdarms. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 321, 223-245.
- Ward, C.W. (1975a). Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Aust. J. biol. Sci. 28, 1-23.
- Ward, C.W. (1975b). Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of the enzymes of intermediate electrophoretic mobility. Biochim. Biophys. Acta. 410, 361-369.
- Ward, C.W. (1975c). Aminopeptidases in webbing clothes moth larvae. Properties and specificities of the enzymes of highest electrophoretic mobility. Aust. J. biol. Sci. 28, 447-455.
- Ward, C.W. (1975d). Properties and specificity of the major metal-chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Biochim. Biophys. Acta 384, 215-227.
- Ward, C.W. (1975e). Properties and specificity of a second metal chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. Aust. J. Biol. Sci. 28, 439-445.
- Ward, C.W. (1976). Properties of the major carboxypeptidase in the larvae of the webbing clothes moth, Tineola bisselliella. Biochim. Biophys. Acta. 429, 564-572.
- 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, 947-959.

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, 324-332.

Wolfenden, R. (1972). Analog approaches to the structure of the
transition state in enzyme reactions. Acc. chem. Res.
5, 10-18.

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